

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis* A PARTIR DE EXUDADO NASAL DE BOVINOS DE LECHE EN LA COMARCA LAGUNERA

POR:

OCTAVIO CÁRDENAS PATIÑO

TESIS:

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Enero, 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis* A PARTIR DE EXUDADO NASAL DE BOVINOS DE LECHE EN LA COMARCA LAGUNERA

POR:

OCTAVIO CÁRDENAS PATIÑO

ASESOR PRINCIPAL

Una firma manuscrita en tinta roja que parece decir "Jesús Vázquez Arroyo".

DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "José Luis Fco. Sandoval Elías".

M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS

Torreón, Coahuila, México

Enero, 2009

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis* A
PARTIR DE EXUDADO NASAL DE BOVINOS DE LECHE EN LA
COMARCA LAGUNERA**

TESIS

POR:

OCTAVIO CÁRDENAS PATIÑO

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría



**Dr. Jesús Vásquez Arroyo
PRESIDENTE DE JURADO**



**MC. Ma. Hortensia Cepeda Elizalde
VOCAL**

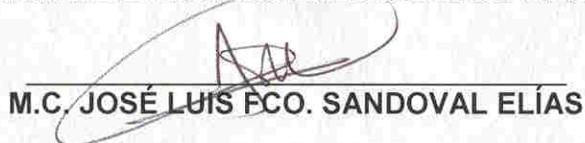


**MVZ. Cuauhtémoc Félix Zorrilla
VOCAL**



**Dr. Agustín Cabral Martel
VOCAL SUPLENTE**

COORDINACIÓN DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELÍAS

Torreón, Coahuila, México

Enero, 2009

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo respeto, cariño y amor a quienes siempre se esforzaron para brindarme su gran apoyo para culminar mi carrera.

A mis padres

Cándido Cárdenas Herrera

Imelda Patiño Andrade

Les agradezco infinitivamente por haberme dado la vida por todo, la comprensión, cariño y amor que me han brindado siempre; por enseñarnos a mis hermanos y a mí a seguir adelante para ser alguien en la vida y no decaer en el camino.

Mil gracias por todos los sacrificios y esfuerzos que han hecho por mí, sin importarles todo lo que han sufrido para darme la educación, y sobre todo por tenerlos a mi lado.

A mis hermanos

Guillermo, Judith, Diego Felipe, Martín, María de los Ángeles, David, Teresa, Graciela, mis cuñadas Claudia, Karina y mi cuñado Felipe, con mucho cariño, amor y con todo el respeto y admiración que se merecen, gracias por darme todo su apoyo, cariño y comprensión en el transcurso de mi carrera, sus consejos brindados durante mi formación profesional, muchas gracias hermanos los quiero mucho.

A mis queridos sobrinos

Luz Ivette, Guillermo y Gabriel por todo el cariño y alegría que me han brindado y compartido en todo este tiempo.

A mis abuelos (†) y tíos

Agradezco infinitamente a mis abuelos por la sabiduría y el cariño inolvidable que me brindaron, a ellos y a mis tíos gracias por su apoyo y sus consejos.

A mis amigos

A mis amigos que siempre estuvieron apoyándome en el transcurso de esta etapa de nuestra vida y todas las personas que me supieron dar un consejo y me dieron ánimos para concluir mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A dios sobre todas las cosas le doy las gracias por haberme dado la vida, por estar conmigo en todos los momentos, por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida.

A mis padres por haberme dado todo su apoyo y que siempre estuvieron conmigo en el transcurso de mi carrera en las buenas y en las malas, y que jamás me han dejado de apoyar, los llevo en mi corazón.

A mis hermanos, mis cuñadas y mi cuñado, les agradezco todo el apoyo incondicional y sus consejos que me brindaron durante mi carrera, gracias hermanos.

A mis sobrinos por su alegría inigualable.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, mi “Alma Terra Mater” por darme la oportunidad de poder terminar mi carrera.

A todos mis profesores gracias por la sabiduría y conocimientos que me brindaron y compartieron a lo largo de mi carrera para mi formación profesional.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila, por la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones.

A mi asesor de tesis Dr. Jesús Vásquez Arroyo, gracias por brindarme la oportunidad de trabajar con él en este trabajo de investigación.

A la MC. Ma. Hortensia Cepeda Elizalde, al MVZ Cuauhtémoc Félix Zorrilla y al Dr. Agustín Cabral Martell por el apoyo que me brindaron en la elaboración y revisión de esta tesis.

A Lea Alonso Rangel gracias por su paciencia y apoyo brindado en el trabajo experimental en el laboratorio al correr mis muestras.

RESUMEN

La Tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto-contagiosa ocasionada por *Mycobacterium bovis* y es un problema que afecta principalmente a la ganadería nacional, genera pérdidas económicas considerables y es un obstáculo para la movilización y comercialización de animales en territorio nacional e internacional, así como un riesgo en salud pública debido a que es una enfermedad zoonótica. El método utilizado generalmente para la detección de animales que han estado en contacto con *Mycobacterium bovis* es la prueba intradérmica de la tuberculina. En el presente estudio se buscó la identificación del agente causal de TBB *Mycobacterium bovis* en exudado nasal mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se recolectaron muestras de exudado nasal de 15 bovinos lecheros considerados como positivos por la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina, provenientes de dos establos comprendidos dentro de La Comarca Lagunera, las muestras se tomaron con hisopos estériles de 15 cm transferidos a tubos con solución reguladora de fosfatos (Agua Peptonada Buferada, Difco) estéril y se inactivaron mediante calentamiento a baño maría hasta hervir durante 10 minutos. Para la realización del diagnóstico, se realizó la extracción de DNA empleando el Kit comercial DNAzol (Invitrogen, Inglaterra). Para el proceso de amplificación del DNA se emplearon un par de primer (CyB1F y CyB2R) para control interno (IC), y otro par (TB1F y TB1R) para la detección del gen de la proteína MPB70 de *Mycobacterium*. Los resultados obtenidos fueron negativos lo cual pudo deberse a no extracción del DNA Mycobacterial y/o la presencia de sustancias que inhiben la PCR bajo las condiciones de trabajo.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, Exudado nasal, Vacas lecheras, Extracción de DNA, PCR anidada.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Págs.
DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. HIPÓTESIS	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
4.1 DESARROLLO HISTORICO.....	4
4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MICOBACTERIAS	6
4.2.1 Naturaleza de la Envoltura de <i>M. tuberculosis</i>	7
4.2.2 Clasificación y Nomenclatura.....	9
4.3 SALUD PÚBLICA.....	11
4.3.1 Pérdidas Económicas por Tuberculosis Bovina.....	12
4.4 TUBERCULOSIS BOVINA.....	13
4.5 ETIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	13
4.6 EPIDEMIOLOGÍA.....	14
4.7 INCIDENCIA	15
4.7.1 Incidencia Mundial	15
4.7.2 Incidencia Nacional.....	16
4.7.3 Incidencia Regional	19
4.8 TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....	19
4.8.1 Reservorios y Periodo de Incubación	20
4.9 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....	21
4.9.1 Periodo de Diseminación	26
4.10 SIGNOS CLÍNICOS DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....	26
4.11 LESIONES DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....	27
4.11.1 Formas de Presentación de la Tuberculosis.....	28
4.12 DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	29
4.12.1 Prueba de la Tuberculina.....	30
4.12.2 Análisis Histopatológico	33
4.12.3 Baciloscopia.....	33
4.12.4 Análisis Microbiológico	34
4.12.5 Cultivo Microbiano	34
4.12.6 El Medio de Cultivo Middlebrook 7H10.....	35

4.12.7 Sistema BACTEC	35
4.12.8 Pruebas Serológicas.....	36
4.12.9 Prueba del Interferón-gamma (BOVIGAM®)	36
4.12.10 Diagnóstico molecular por PCR.....	38
4.13 CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	41
4.13.1 Vacunación y Tratamiento	44
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
5.1 Localización Geográfica de la Comarca Lagunera.....	47
5.2 Sitio de Muestreo	47
5.3 Toma y Procesamiento de Muestras.....	47
5.4 Extracción de ADN Mediante el Kit de DNAzol	48
5.5 Preparación y corrida para PCR simple	48
5.6 Condiciones de corrida de PCR	49
5.7 Electroforesis en gel de agarosa.....	50
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1 Aislamiento de DNA	51
6.2 Amplificación Mediante PCR.....	52
VII. CONCLUSIONES	55
VIII. LITERATURA CITADA.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figuras

1. Incidencia global de la tuberculosis en el año 2002	16
2. Avances y situación actual de la tuberculosis bovina en México bajo la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina según la NOM-031-ZOO-1995.....	18
3. Avances y situación actual de la tuberculosis bovina en México, Clasificación de los Estados o Regiones por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA).....	18
4. Factores atribuidos a la pared celular del complejo <i>Mycobacterium</i> que le permiten escapar de las defensas del organismo	24
5. Consecuencias duales de la activación de los macrófagos	25
6. Resultados de PCR simple negativos de muestras de tejido pulmonar y nódulo linfático de animales con lesiones predisponentes a tuberculosis, así como exudado nasal en animales reactivos a la prueba de la tuberculina.....	52
7. Resultados PCR simple en muestras de exudado nasal de bovinos reactivos a tuberculina	52
8. PCR para confirmar la funcionalidad de los reactivos mostrando resultados satisfactorios	52

Cuadros

1. Clasificación modificada de la original de Runyon que incluye los miembros del género <i>Mycobacterium</i> de importancia humana actualmente	10
2. Interpretación de las medidas de la tuberculina doble comparativa.....	33
3. Situación actual de erradicación y control de la tuberculosis bovina en México	42
4. Clasificación de los Estados o Regiones por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en relación a Tuberculosis Bovina.....	43
5. 1er. Protocolo para una corrida simple 1X	49
6. 2do. Protocolo para una corrida simple 1X.....	49
7. Resultados de análisis de muestras de exudado nasal de animales determinados positivos por La Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina en dos establos que pertenecen a La Comarca Lagunera	51

I. INTRODUCCIÓN

La emergencia de enfermedades ha sido un tema relevante durante los últimos quince años en medicina humana, existiendo también gran interés por aquellas infecciones emergentes que afectan a los animales, pues limitan la producción de alimentos para la población, y por las nuevas zoonosis que amenazan la salud de las personas (Abalos and Retamal, 2004).

Los factores que generan la emergencia de enfermedades son consecuencia del aumento de la población mundial y aquellos de mayor influencia corresponden al movimiento de personas y animales, a disturbios ambientales, al cruce de la barrera inter-especies por parte de algunos patógenos y a cambios de manejo en los sistemas productivos (Abalos and Retamal, 2004)

La tuberculosis es una enfermedad que ha acompañado al hombre a lo largo de su historia y que todavía no se encuentra erradicada. Por el contrario, la tuberculosis produce actualmente el mayor número de muertes teniendo su origen en un solo agente infeccioso. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra afectada con *Mycobacterium tuberculosis*, de entre los cuales un 5-10% del total de infectados desarrollaran la enfermedad según la organización mundial de la salud (Soto-Ospina, 2002)

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más antiguas existentes en nuestro planeta, y sigue siendo un grave problema medicosocial en diversas partes del mundo. Las manifestaciones clínicas de la tuberculosis son variables, dependiendo de la modalidad de la infección y el estado inmunológico del huésped (Baylan et al., 2004)

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica, que se desarrolla en un determinado contexto de riesgo ambiental, social, sanitario e individual. Es prevenible, curable y su prevalencia tiende a disminuir naturalmente; sin embargo, en las últimas décadas hubo un aumento tanto en incidencia como en su severidad (Broglia et al., 2002)

La tuberculosis bovina constituye un grave problema de salud animal y un riesgo en la salud pública (Estrada-Chávez et al., 2004), algunas enfermedades tradicionales endémicas, incluso con programas de control, pueden en determinadas circunstancias aumentar su incidencia (Abalos and

Retamal, 2004). El causante de la tuberculosis en humanos es el *Mycobacterium tuberculosis*, sin embargo, *M. bovis*, el responsable de la tuberculosis en los bovinos, puede ser la causa de entre el 5 y el 10 % de los casos humanos. El riesgo estriba en que de los 7 mil millones de litros de leche que se producen en México, aproximadamente el 30 % no va directamente a pasteurización (NOM-031-ZOO-1995), lo que implica un riesgo para la salud pública; de ahí la importancia de erradicar a la enfermedad en los animales (Zendejas-Martínez et al., 2007).

El agente causal, es el *Mycobacterium bovis*, está ampliamente distribuido en México. En la actualidad la campaña nacional para la erradicación de la tuberculosis bovina considera los estados fronterizos del Norte, Quintana Roo, Yucatán, en etapa de erradicación con excepción de Baja California Norte, y el resto del territorio nacional en control (Estrada-Chávez et al., 2004).

En México, la tuberculosis ha sido foco de atención en los últimos años, no sólo por el hecho del incremento en el número de casos, también por las políticas de comercio que se establecen con otros países, incluidos los programas de inocuidad alimentaria, lo cual ha provocado un renovado interés para el desarrollo y validación de nuevas alternativas de control y mejores métodos de diagnóstico (González-Salazar et al., 2007).

El diagnóstico de la tuberculosis se ha basado fundamentalmente en la identificación del bacilo tuberculoso, la aplicación de la tuberculina y con menor frecuencia el examen histológico; sin olvidar la baciloscopia mediante la tinción Ziehl-Neelsen siendo una de las herramientas más importantes para la detección del bacilo tuberculoso con el inconveniente que requiere 10,000 bacterias y no es específico para el complejo *Mycobacterium*. A pesar de ello, la demostración del bacilo en cultivo el cual tiene gran sensibilidad, son los métodos más usados para el diagnóstico (Soto-Ospina, 2002).

Por otra parte, la biología molecular ha desarrollado herramientas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para el diagnóstico de enfermedades bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento (Díaz-Otero et al., 2003).

II. OBJETIVOS

Determinar la prevalencia de tuberculosis bovina mediante la detección de *Mycobacterium bovis* en exudado nasal de ganado lechero.

III. HIPÓTESIS

La prevalencia de la tuberculosis bovina en ganado bovino lechero de la Comarca Lagunera es ≤ 0.2 %.

IV. REVISION DE LITERATURA

4.1 DESARROLLO HISTORICO

La historia de la tuberculosis es más antigua que la historia registrada y que cualquier documento académico. Es parte integral de la medicina. En el período paleolítico la tuberculosis fue una enfermedad endémica entre animales, especialmente entre mamíferos, posiblemente causada por el *Mycobacterium bovis*. Se estima que data de más de cinco millones de años, como enfermedad y el *Mycobacterium* (*Mycobacterium ulcerans*) más de cien millones de años. (Piñat and Avilán-Rovira, 2007).

La tuberculosis es sin duda una de las enfermedades más antiguas de la humanidad. Entre los años 1907 y 1912 Smith, Rouffer, Fouquet y otros investigadores comprobaron que los huesos de algunas momias egipcias presentaban alteraciones debidas a tuberculosis (Araujo and Waard, 2004), así encontramos descripciones de la enfermedad en civilizaciones antiguas, como en Mesopotamia, donde fue considerada “la reina de las enfermedades”. En Egipto constituyó una de las siete plagas citada en dos oportunidades en el antiguo testamento, en la India se llamó “consunción” para significar cuerpo gastado, los griegos la denominaron tempranamente “tisis” (consunción), subrayando su espectacular característica de emaciación en los casos crónicos no tratados y en Europa “peste blanca”, representando la primera gran epidemia que se desarrolló durante todo el siglo XIX y la primera mitad del siglo XX, que según el Dr. Frank Ryan, afectó a un billón de personas durante la primera mitad del siglo XX, según describió en su libro: “La Olvidada Plaga” (Piñat and Avilán-Rovira, 2007; Reyes-Corcho et al., 2004).

Es posible que el primer agente causal haya sido *Mycobacterium bovis* o una variante, adquiriendo el hombre la enfermedad al consumir carne o leche de animales enfermos. Se cree que el *Mycobacterium tuberculosis* haya surgido posteriormente, como una mutante de *Mycobacterium bovis*; en el siglo XVI Fracastorum hablaba de la transmisión y contagio de la enfermedad. Para 1865 Villemin demostró experimentalmente la contagiosidad y transmisibilidad de la tuberculosis mediante inoculación de material contaminado proveniente de pulmones humanos en conejos. El 24 de marzo de 1882, Roberto Koch

comunicó a la comunidad de fisiología de Berlín que, mediante colaboración de derivado de anilina, había descubierto el bacilo que producía la tuberculosis, del material obtenido de lesiones humanas y de bovino (Senado-Dumoy, 1999), el cual fue aislado en un medio de cultivo de suero y papa; en 1883 Frank Ziehl y Frederich Neelsen modificaron esta tinción utilizando fuccina, desarrollando de este modo la tinción de Ziehl Neelsen que se utiliza actualmente en la detección de *Mycobacterium* (Soto-Ospina, 2002).

El nombre específico de "*Bacterium tuberculosis*" fue propuesto por Zopf en 1883 y, en 1896, Lehman y Neumann asignaron las especies al género *Mycobacterium*. A partir de la observación de pequeñas diferencias entre los microorganismos aislados en humanos y en ganado, se distinguió entre *Mycobacterium tuberculosis hominis* (del latín, hombre) y *Mycobacterium tuberculosis bovis*. Las cepas de *hominis* eran aquellas reconocidas como causantes de enfermedad pulmonar en el hombre, y las de *bovis* aquellas responsables de tuberculosis en el ganado, y que podían dar lugar a enfermedad extrapulmonar en el hombre, como consecuencia de la ingestión de leche de vacas infectadas (Prat-Aymerich et al., s/f).

En 1891, como producto exhaustivo de investigación de más de 10 años encaminado a obtener la cura de la tuberculosis; Koch descubrió una sustancia obtenida evaporando el filtrado de bacilos tuberculosos cultivados entre 6 y 8 semanas en medio glicerinado, a la que se le denominó el fenómeno de Koch y la tuberculina (Soto-Ospina, 2002).

En 1902, Valler y Carre notifican sus investigaciones sobre tuberculosis animal, especialmente bovinos, e introducen la noción de que la tuberculosis pulmonar puede contraerse tanto por vía digestiva como vía respiratoria (Araujo and Waard, 2004). El primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar bovina se describió en 1909, y las investigaciones posteriores concluyeron que, entre el 1 y el 3% de los casos de tuberculosis pulmonar, eran causados por *Mycobacterium bovis*. El nombre fue oficialmente asignado en 1970 por Karlson y Lessel (Prat-Aymerich et al., s/f).

En 1906 Calmette revela el principio de la oftalmoreacción en el diagnóstico de la tuberculosis, utilizando una tuberculina que contiene las exo y endotoxinas del bacilo, preparada en caldo glicerinado. Para 1921 se aplicó por primera vez en el hombre la vacuna del BCG (Araujo and Waard, 2004).

Las sospechas que ligaban la tuberculosis no pulmonar de la niñez debido al consumo de la leche de la vaca fueron destacadas en la literatura científica desde el siglo XIX. Sin embargo, cualquier preocupación científica referente al acoplamiento entre la infección micobacterial de los bovinos y la tuberculosis humana fue disipada solamente después de un informe real. Por lo tanto debido a esto, la tuberculosis de los bovinos en el Reino Unido fue desafiada, con esfuerzos veterinarios y científicos. Las medidas empleadas eran inicialmente voluntarias e inspecciones clínicas rigurosas incluidas con el retiro del ganado enfermo sospechoso de las manadas. Estas prácticas llegaron a ser obligatorias y fueron suplidas eventualmente con la aplicación regular de tuberculina que probaba detectar ganado infectado así como programas nacionales de erradicación para la tuberculosis basado en pruebas, matanza y restricción de movimiento de animales de granjas infectadas. Esto es muy eficaz, pues la enfermedad en ganado se redujo o suprimió en aquellos países que participaban, la incidencia de la tuberculosis humana causada por *Mycobacterium bovis*, particularmente presentaciones del scrofula en niños y jóvenes, declino gramáticamente gracias a estas acciones (Neill et al., 2005).

En 1985, debido a la pandemia del SIDA, la tuberculosis se transforma en un síndrome expansivo tuberculosis-SIDA que con el desarrollo de la multidrogorresistencia, se presenta en los momentos actuales como un grave problema de salud pública, especialmente en los países de bajos recursos económicos (Piñat and Avilán-Rovira, 2007).

4.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MICOBACTERIAS

Las micobacterias, son bacilos ácido-resistentes, su pared celular contiene 60% de lípidos, 10% de péptido-glicósidos; los fosfolípidos en esta pared son importantes en su patogenicidad, son bacterias Gram positivas (aunque con esta tinción no se tiñen bien); son resistentes a la desecación, a los desinfectantes solubles en el agua y al medio ambiente, a las enzimas de los lisosomas; son sensibles a los rayos directos del sol y al calor húmedo (SENASICA, s/f).

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 0.2-0.7µm de grosor y 1-10µm de longitud o ligeramente curvos en forma de maza,

inmóviles, aerobios o microaerófilos, no esporulados ni se encapsulan, con abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido, La tinción más característica de las micobacterias es la de Ziehl-Neelsen (Rodríguez-Cuns, s/f; Soto-Ospina, 2002).

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende micobacterias de crecimiento lento causantes de tuberculosis en animales y humanos, difíciles de diferenciar por métodos bacteriológicos convencionales, el grupo incluye *M. tuberculosis* causante de tuberculosis en humanos; *M. bovis* que infecta principalmente el ganado bovino, pero también causa tuberculosis en humanos; *M. bovis* BCG, el derivado atenuado de la cepa de *M. bovis* comúnmente utilizado como vacuna de protección contra *M. tuberculosis*; *M. africanum*, especie causante de tuberculosis humana en el continente africano; *M. microti*, la cual es patogénica en roedores, recientemente, *M. pinnipedii* y *M. caprae* se han añadido a *M. tuberculosis* y *M. canetti*, descrita como una nueva subespecie de *M. tuberculosis* reportada en tuberculosis humana (Arráiz et al., 2006; Prodingler et al., 2005; Singh et al., 2006).

Los miembros de este grupo son micobacterias altamente relacionadas, que exhiben gran homogeneidad en la secuencia de nucleótidos, a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y algunas características fisiológicas, tales como la morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a inhibidores. La secuencia genómica de *M. bovis* tiene más de un 99,95% de coincidencia con la de *M. tuberculosis*. La supresión de información genética ha dado lugar a un tamaño genómico más reducido. No se han hallado genes únicos de *M. bovis*, hecho que implica que es la diferente expresión génica lo que condiciona el tropismo del bacilo humano y el bovino (Prat-Aymerich et al., s/f).

4.2.1 Naturaleza de la envoltura de *M. tuberculosis*

La envoltura bacteriana provee protección y soporte a las bacterias y también poseen mecanismos que permiten el intercambio de sustancias entre

la bacteria y el medio ambiente. Hay una marcada similitud tanto química como estructural entre las envolturas de la mayoría de las bacterias. *M. tuberculosis* y otras Micobacterias son biológicamente similares a las bacterias Gram+ (aunque frente a la tinción de Gram las Micobacterias son débilmente Gram+ o no se tiñen); pero tienen aspectos distintos. En las Micobacterias, la envoltura es de naturaleza lipídica en vez de proteínas y lipopolisacáridos, como en otras bacterias; estando compuesta por la membrana plasmática, la pared y la cápsula (Rodríguez-Cuns, s/f; Soto-Ospina, 2002).

Membrana plasmática: cumple básicamente la función de protección osmótica y de transporte de iones y moléculas. Está conformada por una bicapa de lípidos a la que se le asocian proteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos (Soto-Ospina, 2002).

Pared celular: La pared celular está constituida por tres capas, brinda soporte mecánico y protección. Con tinciones convencionales su apariencia es:

- **capa interna** moderadamente electrón-densa, compuesta por el péptidoglican cuya estructura es similar a la de otras bacterias;

- **capa media**, más ancha que la anterior y electrón-transparente, compuesta por polisacárido, el arabinogalactano, cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos, de tamaño y estructura única para las Micobacterias (70-90 átomos de Carbono).

- **capa externa** de grosor variable, electrón-opaca, de la cual no puede conocerse con las técnicas actuales, su exacta composición, aunque se le atribuye una estructura glucolípida (Rodríguez-Cuns, s/f).

La cápsula: esta capa externa, constituye la interfase entre la micobacteria y el huésped; tiene entre otras funciones controlar los componentes que pueden entrar al interior de la bacteria, protege del ataque por agentes microbianos, y modula la respuesta inmune del huésped, varía en grosor y apariencia. Está constituida por polisacáridos, proteínas y pequeñas cantidades de lípidos (Soto-Ospina, 2002).

4.2.2 Clasificación y nomenclatura

El género *Mycobacterium* es el único miembro de la familia *Mycobacteriaceae* que a su vez pertenece al orden de los *Actinomycetes* y suborden *Corynebacterineae*. Esta familia se caracteriza por tener en su ADN un contenido de G+C entre 62-70%, similar al encontrado en géneros de otras bacterias Gram positivas filogenéticamente similares como *Nocardia* y *Rhodococcus* (Soto-Ospina, 2002).

Cientos de especies de micobacterias han sido descritas pero sólo 41 de ellas han sido incluidas en la "Approved Lists of Bacterial Names". El género *Mycobacterium* se ha clasificado en dos grandes grupos taxonómicos basados en su velocidad de crecimiento: micobacterias de crecimiento rápido y de crecimiento lento. Las micobacterias de crecimiento rápido, como *M. smegmatis* tienen un tiempo de replicación entre 2-5 horas, sus colonias crecen en menos de 7 días. Por otra parte, las de crecimiento lento que tienen un tiempo de replicación de 13 horas aproximadamente, necesitan más de una semana para producir colonias bajo condiciones similares (Soto-Ospina, 2002).

De acuerdo a su pigmentación las micobacterias se pueden dividir en tres grupos: las fotocromógenas, como *M. kansasii* y *M. marinum*, que necesitan luz para la formación de sus pigmentos, las escotocromógenas como *M. gordonae*, que producen pigmentación incluso en la oscuridad, y finalmente las no cromógenas, que no sintetizan pigmentos como *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Soto-Ospina, 2002).

En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil de *Mycobacterium* en cuatro grupos que se basaba en la velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana), producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno y no cromógeno) y características coloniales (Rodríguez-Cuns, s/f).

Cuadro 1. Clasificación modificada de la original de Runyon que incluye los miembros del género *Mycobacterium* de importancia humana actualmente (Rodríguez-Cuns, s/f).

Grupos y subgrupos	Especies de micobacterias	Patología
I. Fotocromógenos de crecimiento lento	<i>M. kansasii</i> (<i>M. lipophilum</i>) <i>M. asiaticum</i>	Pulmonar, ganglionar, meníngea, osteoarticular, urogenital, generalizada.
II. Escotocromógenos de crecimiento lento		
a	<i>M. lactis</i> ¹	
b	<i>M. scrofulaceum</i> (<i>M. marinum</i>) <i>M. goodii</i> (<i>M. goodii</i>) <i>M. flavescens</i> <i>M. szulgai</i>	Ganglionar, pulmonar, osteoarticular
c	<i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. simiae</i> (<i>M. habana</i>)	Pulmonar, ganglionar, articular Cutánea Cutánea, urogenital Pulmonar
III. No cromógenos de crecimiento lento	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> (<i>M. bovis BCG</i>) <i>M. africanum</i> <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrea</i> (<i>M. novum</i>) <i>M. triviale</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. shimodei</i>	Pulmonar, renal, osteoarticular, meníngea, intestinal, ganglionar, cutánea, etc. Cutánea, ganglionar, generalizada. Ganglionar, pulmonar, osteoarticular, generalizada. Pulmonar
IV. Fotocromógenos de crecimiento rápido	<i>M. marinum</i> (<i>M. balnei</i>)	Cutánea, articular
V. Escotocromógenos de crecimiento rápido		
a	<i>M. engbaekii</i> ²	
b	<i>M. acapulcense</i> ³ <i>M. aurum</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. gadium</i>	
c	<i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. thermoresistibile</i>	
VI. No cromógenos de crecimiento rápido	<i>M. fortuitum</i> (<i>M. peregrinum</i>) <i>M. chelonae</i> <i>M. chitae</i>	Cutánea, pulmonar, osteoarticular, ocular. Cutánea, pulmonar, osteoarticular meníngea.

4.3 SALUD PÚBLICA

Mycobacterium tuberculosis es el agente causal de tuberculosis en humanos, sin embargo, la transmisión zoonótica de *Mycobacterium bovis* de animales a humanos, principalmente a individuos inmunocomprometidos, es de gran impacto en salud pública (Arráiz et al., 2006), probablemente desde sus orígenes, pero hace 40 años se tuvo la esperanza de que la población pronto estaría libre de ella. Ahora que su incidencia aumenta, podemos considerarla una enfermedad re-emergente (Abalos and Retamal, 2004).

Existen datos incompletos y dispersos respecto de la importancia relativa de la infección por *M. bovis* en la tuberculosis humana. Esto es debido a que en la mayoría de los países, especialmente aquellos en desarrollo, el diagnóstico de la tuberculosis en las personas se hace a través de baciloscopia, para iniciar pronto un tratamiento y muchas veces no se llega a definir la especie de micobacteria involucrada en la infección (Abalos and Retamal, 2004).

Con 10 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes al año, la tuberculosis es una de las enfermedades infectocontagiosas más importantes del mundo, anteceditas solamente por la malaria y el virus de inmunodeficiencia adquirido humana, por lo que se mantiene como una de las enfermedades transmisibles de gran preocupación y ocupación para los sistemas de salud (Mariscal-Mendendez et al., 2005).

En una revisión anterior, se indica que la infección por *M. bovis* podría llegar a un 3,1%, con una mayor frecuencia de casos extrapulmonares, aunque en países desarrollados, donde las prevalencias de tuberculosis bovina son bajas y el consumo de leche pasteurizada es generalizado, los casos pulmonares son los mayoritarios. Estudios específicos entregan cifras de infección por *M. bovis* en personas desde 0,4% a 6,2% en Argentina, menos de 0,5% en España y aproximadamente en el 1% de los casos de tuberculosis humana en el Reino Unido. En Australia se informa de una media de 9,6 casos anuales de tuberculosis humana, debida a infecciones por *M. bovis*, durante un período de 25 años (Abalos and Retamal, 2004).

Se estima que entre los años 2002 y 2020 aproximadamente 1.000 millones de personas se infectarán, más de 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones morirán de tuberculosis (Abalos and Retamal, 2004).

La tuberculosis bovina constituye un grave problema de salud animal y humana. El agente causal, *Mycobacterium bovis*, está ampliamente distribuido en México (Estrada-Chávez et al., 2004). Se caracteriza por un periodo de latencia prolongado entre la infección inicial y las manifestaciones clínicas en el que predomina la neumopatía (aunque también puede afectar a otros órganos) y una respuesta granulomatosa con inflamación y lesión de los tejidos (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

La tuberculosis en humanos es un problema creciente en México; en 1997 se reportaron 7,000 casos, con un crecimiento de 100 % en sólo un año para algunos de los estados. Otras dependencias reportan alrededor de 17,000 casos anuales, en la población económicamente activa, de 15 a 44 años. Factores como el crecimiento de la población suburbana, la pobreza, el VIH y enfermedades como la diabetes, que debilitan el sistema inmune, han favorecido el incremento de la prevalencia de la enfermedad (Zendejas-Martínez et al., 2007).

Existe consenso de que un crecimiento de la incidencia de tuberculosis bovina aumentaría el riesgo de la tuberculosis zoonótica, siendo mayores los factores de riesgo asociados al contacto directo con animales enfermos en países desarrollados, y al consumo de leche no pasteurizada en países en desarrollo (Abalos and Retamal, 2004).

4.3.1 Pérdidas Económicas por Tuberculosis Bovina

La tuberculosis sigue siendo una enfermedad infecciosa importante que ocasiona pérdidas económicas importantes en la industria pecuaria sobre todo en el ganado bovino (Ramírez-Casillas et al., 2004).

Los recursos financieros totales necesarios para la lucha mundial contra la tuberculosis (para la aplicación, incluido el desarrollo de capacidades y para la investigación) fueron de 2,200 millones de dólares anuales en 2004 y 2005, con un déficit anual estimado de 800 millones de dólares (OMS, 2005).

Las pérdidas económicas en el ganado son de la siguiente manera:

1. Pérdidas por decomiso parcial o total por reses afectadas 9%.
2. Pérdidas en peso de los animales afectados detectados en producción 36%.

3. Pérdidas en peso de los animales no detectados en producción 18%.
4. Pérdidas en la producción de terneros 12%.
5. Pérdidas en la producción de leche 13%.
6. Costos de las pruebas tuberculínicas a campo 6%.
7. Costo del tratamiento en casos humanos 1%.
8. Disminución de la fertilidad hasta un 6%.
9. Las vacas en ordeña disminuyen la producción láctea en un 10% del total de la producción lechera.
10. La duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia.
11. Lento aumento del peso del animal o disminución gradual del mismo.
12. Se pierde en promedio el 15% del peso normal.
13. Como efecto secundario causa reducción de la inmunidad.
14. La esterilidad aumenta entre el 5% y 10% (Aguilera, 2002).

4.4 TUBERCULOSIS BOVINA

La infección por *Mycobacterium bovis* es la causa de la tuberculosis bovina, un importante problema de salud en el ganado con potencial zoonótico de transmisión a los seres humanos. En el ganado vacuno esta infección puede ser lentamente progresiva, con pocos signos externos de la enfermedad, haciendo el diagnóstico y la erradicación de la tuberculosis difícil (Meade et al., 2007).

4.5 ETIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

La enfermedad es causada por *M. bovis* es un bacilo Gram-positivo, con potencial de zoonosis que afecta una gran cantidad de especies mamíferas al que se le relaciona genéticamente con *M. tuberculosis*, el agente causal de tuberculosis humana (Garnier et al., 2003; Neill et al., 2005).

La tuberculosis en el ganado puede dar lugar a una enfermedad crónica, granulomatosa, principalmente de las vías respiratorias. El ganado puede infectarse de numerosas maneras, con la edad y el comportamiento animal, ambiente y clima existente, y las prácticas de manejo que prevalecen en la granja tienen influencia significativa. La inhalación de *M. bovis* es la ruta más

probable y más importante, pues la distribución y la patología de la lesión en casos del campo demuestran la implicación predominante de las vías respiratorias superiores e inferiores y de los nódulos linfáticos asociados (Neill et al., 2005).

4.6 EPIDEMIOLOGÍA

El agente causal de la tuberculosis es un bacilo, cuyas especies más comunes son *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum* (Complejo de *Mycobacterium tuberculosis*), pero no son las únicas, ya que hasta la fecha se han descrito más de 25 especies de Micobacterias capaces de infectar y desarrollar TB en el humano (Mariscal-Mendendez et al., 2005).

En términos globales se reportan aproximadamente cada año, 10 millones de nuevos casos de TB de los cuales tres millones llegan a fallecer, de forma tal que aproximadamente el 6% de todas las muertes en el mundo son debidas a esta enfermedad. Se estima que la prevalencia global es superior a 70 por cada 100 mil habitantes aunque es mucho mayor en ciertas zonas geográficas y grupos de riesgo, como en algunos países africanos donde llega a ser de 400 por 100 mil habitantes. En cuanto a incidencia, África y Asia ocupan el primero y segundo. América Latina con 250-300 mil casos nuevos se ubica en el tercer puesto. Brasil, Perú y México son los países que tienen las mayores incidencias. Dentro del contexto de México el comportamiento de la tuberculosis en los últimos 10 años ha obedecido a una disminución tanto de su morbilidad como de su mortalidad. De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, para el año 2000 se reportaron 16,281 casos; 15,269 (2001); 14,310 (2002); 14,852 (2003); y para el 2004, 13,392. Los estados de Baja California, Chiapas, Nuevo León y Veracruz, considerados como los de mayores aportaciones (Mariscal-Mendendez et al., 2005).

4.7 INCIDENCIA

4.7.1 Incidencia Mundial

La Tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas que mata a más personas en el mundo entero. La mortalidad mundial por tuberculosis es aproximadamente de 2 millones de personas por año. Alrededor de 8 millones de personas en todo el mundo, enferma de tuberculosis cada año (Nava-Paz et al., 2005).

Los datos obtenidos por la OMS permiten hacer las siguientes afirmaciones:

- Cada segundo una persona es infectada por primera vez por el bacilo tuberculoso.
- Cerca del 1% de la población mundial es infectada por primera vez por el bacilo tuberculoso cada año.
- Un tercio de la población mundial está actualmente infectada por el bacilo tuberculoso.
- Del 5 al 10% de las personas infectadas con el bacilo tuberculoso (pero no infectado con HIV) enfermarán de tuberculosis en algún momento de su vida (Nava-Paz et al., 2005).

Para el año 2002 se produjeron cerca de 2 millones de muertes por tuberculosis en todo el mundo, siendo la región del sur-este asiático quien aportó la mayor proporción con 625 mil, seguida por la región africana con 556 mil. Las Américas aportaron aproximadamente 6 mil muertes por tuberculosis (Nava-Paz et al., 2005).

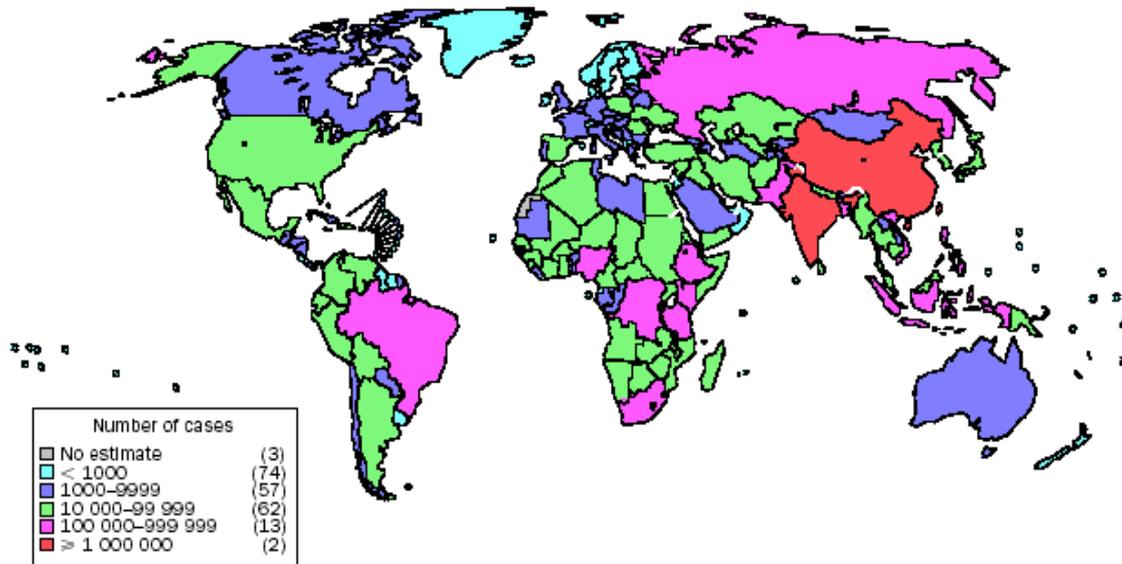


Figura 1. Incidencia global de la tuberculosis en el año 2002 (Soto-Ospina, 2002).

4.7.2 Incidencia Nacional

El inventario nacional bovino es de alrededor de 30 millones de cabezas, de las que poco más del 93% se dedica a la producción de carne (y doble propósito), y casi el 7%, restante, es ganado especializado en la producción de leche (CONASA, 2008).

Antes de 1992, la prevalencia de tuberculosis bovina era prácticamente desconocida en nuestro país, aunque se sospechaba que ésta era alta en ciertas zonas lecheras ya que era frecuente el hallazgo de lesiones generalizadas de tuberculosis, en vacas lecheras de deshecho enviadas a rastro. Se asumía entonces que era baja o nula en la ganadería de carne (CONASA, 2008).

A partir del reconocimiento de regiones en Fase de Erradicación en 1994, por la SAGARPA, se establecieron regiones o estados con una prevalencia menor al 2 % (CONASA, 2008).

Las exigencias cada vez más en aumento, para la exportación de becerros, motivó la creación de regiones de “Baja Prevalencia”, las cuales han ido paulatinamente disminuyendo su prevalencia desde 0.5 % hasta niveles de 0.01 % (CONASA, 2008).

Actualmente se encuentran en fase de erradicación 10 estados y parte de 15 estados.

- Zonas en erradicación, prevalencia menor a 2 %: Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán y parte de Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Durango, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Hidalgo y Zacatecas.
- En Control, prevalencia mayor al 2 % o desconocida: el resto del país (CONASA, 2008).

Sin embargo, la prevalencia real de tuberculosis es menor al 2 % en muchas regiones del país y esto es más palpable cuando vemos la clasificación que para efectos de la exportación de ganado en pie a los Estados Unidos de Norte América, otorga el USDA a estas regiones:

- Acreditado modificado avanzado, prevalencia menor al 0.01%: Norte de Sonora.
- Acreditado modificado, prevalencia menor a 0.1 %: Sur de Sonora, las regiones clasificadas en la categoría "A" de los estados de Baja California, Coahuila, Chihuahua, Jalisco- Zacatecas, Nayarit, Nuevo León, Puebla y Veracruz. Adicionalmente todo el territorio de los estados de Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas y Yucatán.
- Acreditado preparatoria, prevalencia menor a 0.5 %: Las regiones clasificadas en la categoría "A" de los estados de Chiapas, Durango, Guerrero, Michoacán y Tabasco. Adicionalmente todo el territorio del estado de Colima.
- No acreditado, prevalencia mayor a 0.5 % o desconocida: Resto del país (CONASA, 2008).

4.7.3 Incidencia Regional

La Comarca Lagunera constituye una de las regiones con mayor incidencia, a nivel nacional, en lo que se refiere a casos de tuberculosis. Las cifras colocan a La Laguna, según casos reportados, arriba de la media nacional. En esa región 17 de cada cien personas contraen tuberculosis, de cada 130 casos que se reportan en La Laguna se registra un promedio anual de 25 muertes (Gómez, 2005).

4.8 TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

La principal fuente de transmisión de la tuberculosis bovina en las explotaciones agropecuarias, son los bovinos afectados por esta enfermedad, los cuales son capaces de transmitir la enfermedad 90 días después de haber adquirido la infección; los gérmenes salen al exterior con el aire expirado, los esputos, las heces, la leche, la orina, las secreciones vaginales y uterinas, exudados de nódulos linfáticos periféricos, mucosidades nasales y traqueales. Por lo general los gérmenes penetran en el organismo por inhalación o ingestión (Radostits et al., 2002).

La inhalación es la vía de entrada prácticamente invariable en el ganado estabulado y se piensa que también lo es en el que pasta libremente. La ingestión es posible en praderas a través de la contaminación con heces del pasto y los abrevaderos a de los pesebres pero la carga infecciosa debe ser muy elevada; el agua estancada puede causar infección hasta 18 días de haberse contaminado con un animal tuberculoso mientras que una corriente de agua no presenta riesgo (Radostits et al., 2002).

La toma de leche infectada proveniente de una vaca en enfermedad avanzada. La infección intramamaria por el uso de máquinas de ordeño contaminadas. La alimentación a bovinos con harinas mal procesadas provenientes de animales contaminados (Radostits et al., 2002).

La transmisión genital puede ocurrir también si se infectan los órganos reproductivos, pero éste sigue siendo extremadamente raro, al igual que las infecciones transmitidas congénitas y verticales (Neill et al., 2005).

4.8.1 Reservorios y Periodo de Incubación

Los diferentes ecotipos de *M. bovis* tienen una amplia gama de huéspedes, y pueden infectar a una gran variedad de especies como tejones, ciervos, pequeños mamíferos y diversa vida silvestre y especies domesticas. Especies exóticas también pueden estar en riesgo mediante la diversificación de prácticas de cultivo (Taylor et al., 2007).

Los reservorios son de gran importancia ya que son también responsables de la diseminación y mantenimiento de la enfermedad, de los cuales tenemos animales domésticos y especies silvestres infectadas como son: Tejones (*Meles meles*) al contaminar los pastos con orina, zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) en la que se forman adenopatías periféricas que fistulizan y supuran, el antílope caribú (*Odocoileus hemionus*), venado cola blanca (*O. virginianus*), el alce (*Cervus elaphus canadensis*), bisonte (*Bisón visón*), el búfalo (*Syncerus caffer*), carabao o búfalo de agua (*Bulbalis bulbalis*), la oveja, las cabras, los caballos, los cerdos, los perros, los gatos, los hurones, los camellos, los zorros, las ratas, los primates, las llamas, los elefantes, los rinocerontes, las ardillas, las nutrias, las focas, las liebres, los mapaches, los coyotes, leones, tigres, leopardos, y lince (Radostits et al., 2002).

Los tejones y ciervos pueden convertirse en reservorios de la enfermedad, haciendo de la erradicación de campo difícil, a pesar de los riesgos planteados por cada una de las especies son aún objeto de investigación y debate. Los seres humanos rara vez son afectados, pero la gente en algunas profesiones como veterinarios, agricultores y trabajadores de mataderos pueden estar en una situación de mayor riesgo (Taylor et al., 2007).

El periodo de incubación depende del estado inmunológico; que transcurre desde el contagio hasta que sobreviene la reacción inmunológica específica variando en un rango de entre 4 y 90 días (Broglia et al., 2002).

4.9 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

El bacilo tuberculoso no elabora endotoxinas ni exotoxinas, en su lugar, la enfermedad en sí y la destrucción de los tejidos son ocasionados por productos que elabora el huésped durante la respuesta inmune (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

La patogenia de la tuberculosis de los bovinos no se entiende muy bien como lo es para la tuberculosis humana. Como en seres humanos, la tuberculosis en ganado es muy compleja, implicando una multiplicidad de interacciones entre el huésped, los bovinos y *Mycobacterium bovis* dio lugar a la presentación y patología clínica en animales (Tay-Zavala et al., 2003).

Cuando *Mycobacterium bovis* consigue llegar al alvéolo pulmonar, se produce una ligera reacción inflamatoria provocada por éste, al multiplicarse dentro de los macrófagos alveolares. Dando lugar a dos tipos de reacciones; (1) la exudativa, caracterizada por la inflamación aguda o subaguda con exudado o fluido y acumulación de polimorfonucleares y (2) la productiva, donde los macrófagos sufren una dramática transformación a células epiteloideas para formar el tubérculo, lesión característica de la enfermedad (Tay-Zavala et al., 2003).

Las células polimorfonucleares son rápidamente sustituidas por macrófagos alveolares. Cuyo un macrófago alveolar puro, desde el punto de vista inmunitario, envuelve a un bacilo tuberculoso, al principio le suministra el ambiente nutricional que necesita dentro de su fagosoma, donde el bacilo sobrevive y se multiplica. La capacidad de estos macrófagos para erradicar por sí solos al bacilo tuberculoso en estas primeras etapas, parece ser muy escasa, quizás porque su función se ve interferida por factores que han sido atribuidos a diversos componentes de la pared celular del *M. bovis* que le permite a éste escapar de la destrucción inducida por las defensas del organismo, destacándose que:

En primer lugar, está el factor cordonal, un glucolípido de superficie que hace que el *Mycobacterium bovis* crezca *in Vitro* en cordones con configuración de serpentina y sólo lo presentan las cepas virulentas. La virulencia está dada por la capacidad de formar cordones. El factor formador de cordones inhibe la

migración de leucocitos. Además, la inyección del factor cordonal induce la aparición del granuloma característico (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

En segundo lugar, el liporabino-manano (LAM), un heteropolisacárido principal con estructura similar a la de la endotoxina de las bacterias Gram-negativas, inhibe la activación de los macrófagos por el γ -interferón. El LAM también hace que los macrófagos secreten el (TNF- α), que causa fiebre, pérdida de peso y lesión tisular, y la Interleucina 10 (IL-10), que suprime la proliferación de las células T inducida por las micobacterias (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

En tercer lugar, el complemento activado en la superficie de las micobacterias puede dar lugar a la opsonización del *Mycobacterium* y facilitar su captación por el receptor CR3 del complemento existente en los macrófagos (integrina Mac-1). Así la micobacteria ocupa una posición intracelular en los macrófagos, con lo que aumenta la resistencia microbiana y dificulta la quimioterapia (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

En cuarto lugar presenta una proteína llamada proteína de golpe de calor que es intensamente inmunogénica y puede desempeñar un papel importante en las reacciones inducidas por el *Mycobacterium*, el cual reside en los fagosomas, que no son acidificados en los lisosomas (Figura 1). La inhibición de la acidificación se ha asociado con la ureasa secretada por el mismo. Sin embargo el macrófago infectado libera una sustancia que atrae a los linfocitos T, a continuación los macrófagos presentan los antígenos de los bacilos fagocitados a estos linfocitos con lo que se inicia una serie de reacciones efectoras inmunitarias. A su vez, los linfocitos elaboran citosinas que activan a los macrófagos, y aumentan su potencial antimicrobiano (Figura 2) (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

Después de algunas semanas aparece la inmunidad mediada por células T, demostrable por ser positivas a la prueba cutánea con derivado proteico purificado (PPD). Las células T activadas por las micobacterias interactúan con los macrófagos de tres formas: primero, las células T colaboradoras CD4⁺ secretan γ -interferón que activa a los macrófagos para producir una destrucción intracelular de las micobacterias a través de intermedios nitrogenados como NO, NO², y NHO³. Segundo, las células T supresoras CD8⁺ destruyen los macrófagos infectados por las micobacterias

así destruye también las micobacterias. Tercero, las células T doblemente negativas (CD4- y CD8-) lisan los macrófagos sin destruir las micobacterias. De esta forma, las defensas del huésped se fortifican a través de las interacciones complejas que incluyen a los fagocitos mononucleares y distintos subgrupos de células T. En consecuencia, aparecen más competentes que inhiben la multiplicación intracelular de las bacterias al fragmentarse los macrófagos facilitan la multiplicación bacilar, engloban a las micobacterias y limitan el crecimiento (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

La lisis de los macrófagos da lugar a la formación de granulomas caseificantes (reacción de hipersensibilidad retardada). Estos granulomas están constituidos por macrófagos transformados en células epiteloides, que tiene una mayor capacidad microbicida, y en células gigantes multinucleadas tipo Langhans, que son macrófagos cuyos núcleos se disponen periféricamente rodeando al antígeno tuberculoso. Las células epiteloides segregan una sustancia estimuladora de los fibroblastos que producen colágeno y contribuyen a limitar la periferia del granuloma mediante un área de fibrosis. Las micobacterias no son capaces de en este medio extracelular ácido carente de oxígeno, con lo que la infección queda controlada (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

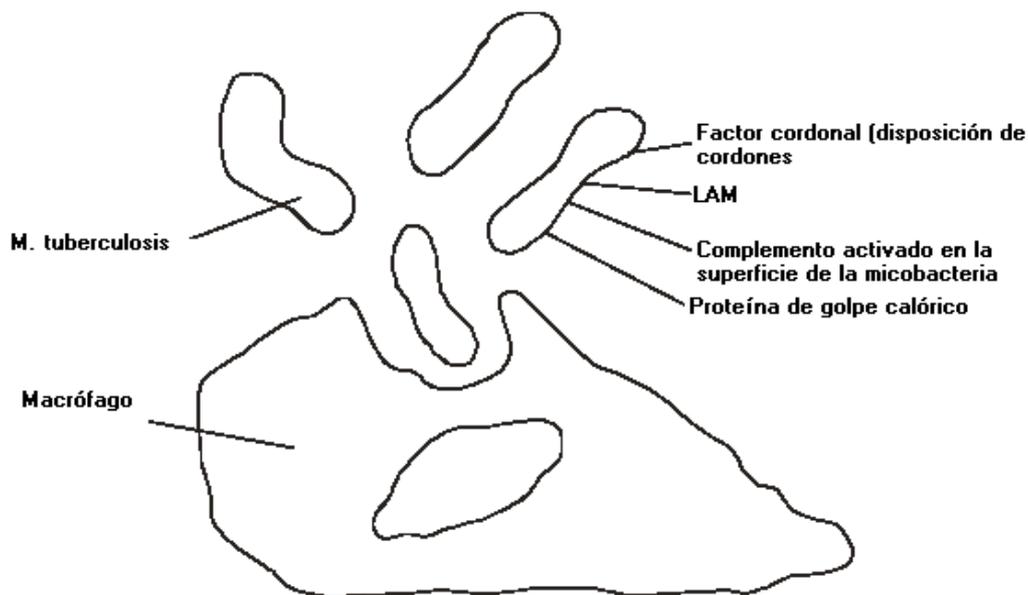


Figura 1. Factores atribuidos a la pared celular del complejo Mycobacterium que le permiten escapar de las defensas del organismo.

FACTORES	EFFECTOS
Factor cordonal	Inhíbe migración de leucocitos Provoca aparición de granulomas
LAM	Inhíbe activación de macrófagos por γ -interferón Hace que los macrófagos secreten: TNF - α pérdida de peso, lesión tisular y fiebre IL - 10 suprime proliferación de células T
Complemento activado en la superficie de la micobacteria	Facilita su opsonización con lo que: Aumenta resistencia bacteriana Dificulta quimioterapia
Proteína de golpe de calor	Dificulta quimioterapia

(Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

Se conocen 2 formas de infección tuberculosa: la primaria que corresponde a la infección inicial por el bacilo, la que se ha explicado anteriormente, la segunda o de reactivación, que es el resultado de la reinfección exógena o de la reactivación de la infección primaria. Esto puede deberse a que la cepa del *Mycobacterium* sea particularmente virulenta o que

el huésped sea especialmente susceptible. Los granulomas de la tuberculosis secundaria suelen localizarse en el vértice de los pulmones, aunque también pueden estar ampliamente diseminados en pulmón, meninges, médula ósea y otros órganos. Estos granulomas que no consiguen contener la expansión de la infección de la micobacteria, son la causa principal de la lesión tisular en la tuberculosis y refleja una hipersensibilidad de tipo retardada. Dos rasgos característicos de la tuberculosis secundaria, son la presencia de necrosis caseosa y de cavidades, que al romperse en los vasos sanguíneos, extienden las Micobacterias por todo el organismo, y cuando se abre a las vías respiratorias liberan Micobacterias infecciosas en aerosoles (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

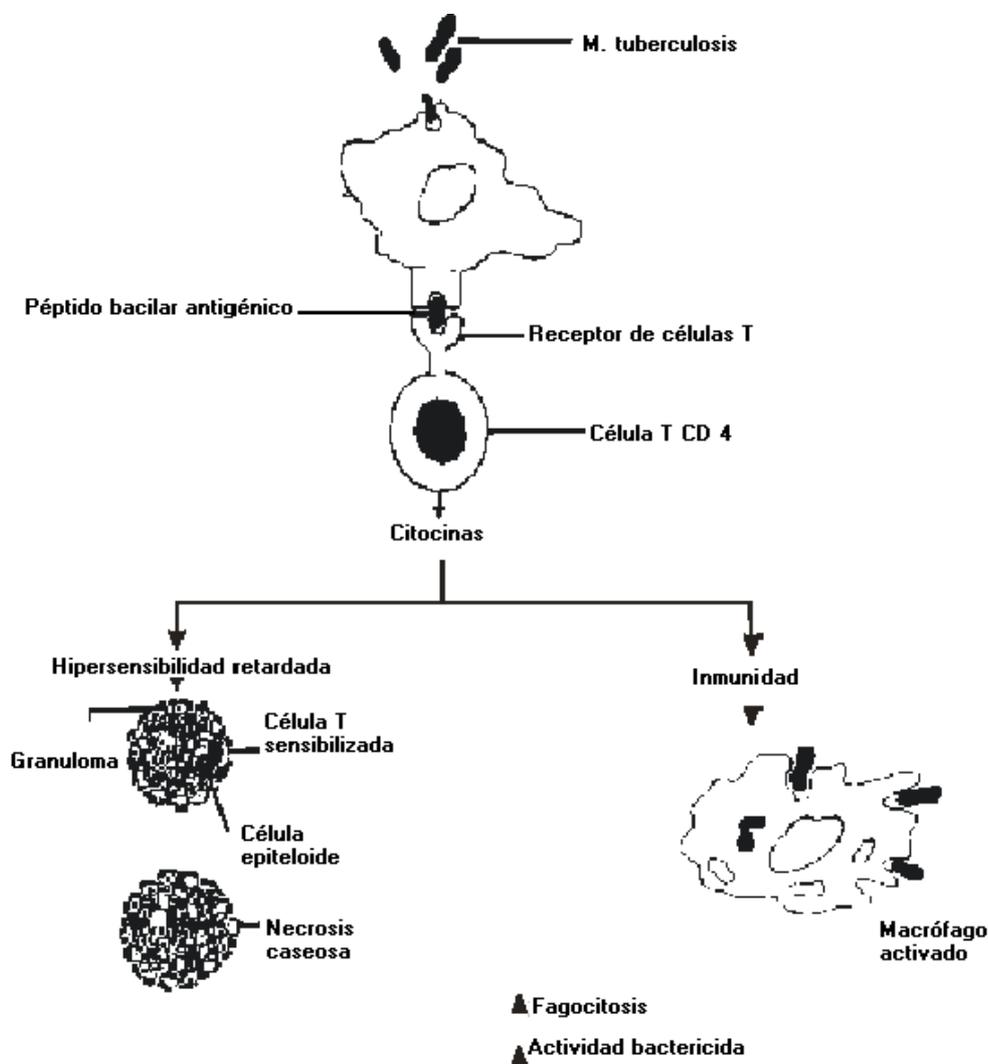


Fig. 2. Consecuencias duales de la activación de los macrófagos (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

4.9.1 Periodo de Diseminación

En la tuberculosis secundaria las lesiones por lo general se tornan necróticas, caseosas y eventualmente aumentan. Con el tiempo la lesión caseosa se licua lo que produce una cavidad en el pulmón que hace más factible la proliferación de microorganismos. Esta eliminación de material caseoso hace posible que la infección se disemine a otras partes del organismo y a su vez son una fuente de infección ambiental. Debido a la gran inflamación que se produce puede haber hemorragias lo que produce, exudado hemorrágico. En la tuberculosis avanzada, los vasos sanguíneos pueden quedar expuestos en las actividades producidas por la necrosis y el paciente muere de hemorragia si se produce ruptura de vasos (Garza and Treviño, 2000).

Una respuesta a la infección de *Mycobacterium tuberculosis* involucra la producción de γ -interferón por las células T antígeno-específicas que activan los macrófagos que están infectados para controlar el crecimiento del bacilo intracelular. Los bacilos intracelulares resisten las defensas del γ -interferón activado por los macrófagos. La acidificación del fagosoma es inhibida por el *Mycobacterium* y la fusión del lisosoma ocurre después de la fagocitosis de los bacilos vivos (Rhoades and Orme, 1997).

4.10 SIGNOS CLINICOS DE LA TUBERCULOSIS EN LOS BOVINOS

La tuberculosis bovina normalmente es una enfermedad debilitadora y crónica, pero rara vez es aguda y rápidamente progresiva. Las infecciones tempranas son a menudo asintomáticas en el ganado por muchos años. Desde el punto de vista clínico la sintomatología de la tuberculosis, se caracteriza por un comienzo lento, es frecuente encontrar debilidad, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna, cefalea y tos persistente. En las fases tardías, los síntomas comunes incluyen emaciación progresiva, fiebre, debilidad, e inapetencia. Los animales con el desarrollo pulmonar normalmente tienen una tos húmeda que es peor por la mañana, durante el tiempo frío, en el ejercicio puede tener disnea o taquipnea. En algunos animales, se agrandan los nódulos linfáticos retrofaríngeos u otros, los nódulos agrandados pueden romperse. Así

como también pueden obstruir los vasos de sangre, vías aéreas, o el tracto digestivo. Si el tracto digestivo está envuelto, pueden verse diarrea intermitente y estreñimiento. La mayoría de los casos se descubren las lesiones al momento de la inspección de la canal (Betancourt et al., 2002; FAO, 2004; Sullivan, 2005).

4.11 LESIONES DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Las lesiones aparecen generalmente como nódulos firmes, en color blanco amarillento, y son con frecuencia muy pequeñas. Dentro de los focos infectados, los macrófagos tienen generalmente aspecto distintivo de la célula del epitelio y se observan a menudo como células gigantes multinucleadas (tipo de Langhans) formadas por la fusión del macrófago, éste epitelio y las células gigantes forman el centro de los tubérculos jóvenes, que son rodeados posteriormente por una zona de linfocitos, de células del plasma y de monocitos. El tubérculo desarrolla una fibroplasia periférica y una necrosis caseosa central; la mineralización se puede observar en el área necrótica caseosa. Las lesiones pueden persistir en ganado, con o sin la progresión, o quizás se pueden curar totalmente. Se han reportado en la mayoría del ganado tuberculoso previamente para tener lesiones del tejido pulmonar; sin embargo, los estudios subsecuentes han demostrado lesiones del pulmón en solamente una proporción pequeña de ganado tuberculoso. Tales lesiones que ocurren generalmente solas, de tamaño pequeño (diámetro <1 cm) y por lo tanto son a menudo difícil de encontrar. Las lesiones tuberculosas se encuentran con más frecuencia posible en los nodos linfáticos bronquiales y/o del mediastino; los nódulos linfáticos de la región principal son el segundo sitio frecuente y en muchos de los casos las son en los nódulos retrofaríngeos y submaxilares. Investigaciones más recientes han revelado la implicación de los tejidos finos como tonsilas. La rareza de estos informes se presenta probablemente por el número limitado de las reexaminaciones principales realizadas en ganado tuberculoso o en la inspección del rastro. No solo es común encontrar lesiones tuberculosas en los nodos linfáticos mesentéricos solamente ya que resultan probablemente de la ingestión de una carga bacteriana pesada, por ejemplo de

beber la leche infectada o presentarse por difusión de lesiones primarias en otros sitios (Aguilera, 2002; Diegel et al., 2002; Neill et al., 2005).

La tuberculosis generalizada es caracterizada por las lesiones en órganos tales como hígado, riñones y ubre o en las meninges y las cavidades serosas que se presentan de lesiones primarias posiblemente en el pulmón o mesenterio, músculos, ocasionando piogranulomas, caseogranulomas, miositis, celulitis y mineralización (Diegel et al., 2002; Neill et al., 2005).

4.11.1 Formas de Presentación de la Tuberculosis

La tuberculosis se suele presentar de diversas maneras, tal y como se describe a continuación:

Forma pulmonar o localizada: cuyo la única localización es el pulmón.

Forma extrapulmonar: cuyo aislamiento del *Mycobacterium* en una única localización (distinta del pulmón, hígado, medula ósea o sangre) sin evidencia clínica o microbiológica de infección tuberculosa en otros órganos.

Forma diseminada: cuyo aislamiento del *Mycobacterium* se realiza en más de una localización no contigua, incluido o no el pulmón, o bien únicamente en la médula ósea, hígado o sangre.

Forma miliar: además del aislamiento de *Mycobacterium*, existen lesiones típicas del tamaño de un mijo en el órgano afectado. Generalmente se trata de un diagnóstico anatomohistológico (Reyes-Corcho et al., 2004).

Forma nodular: se localiza en todos los nódulos linfáticos afectados por el *Mycobacterium*, por eso se le denomina de esta manera.

Forma meníngea: se presenta en forma de meningitis que involucra las estructuras de la base craneana. Además de los signos propios de meningismo, existen alteraciones de la conciencia, irritabilidad, parálisis de nervios craneanos, vómitos y cefalea. Muchas veces la meningitis tuberculosa es una complicación de la forma miliar (Araujo and Waard, 2004).

Forma ósea: generalmente involucra la columna vertebral, comprometiendo frecuentemente 2 cuerpos vertebrales. El disco intervertebral se compromete, estrechando el espacio del mismo nombre. Se forma un absceso que puede extenderse hacia el psoas. La localización más frecuente es la décima vértebra dorsal (Araujo and Waard, 2004).

Forma articular: las articulaciones más afectadas generalmente son las que mayor peso soportan. La tumefacción de las articulaciones se instala lentamente sin presentar signos clásicos de flogosis como en las artritis sépticas. Puede existir drenaje a través de fístulas. Puede afectarse cualquier articulación, siendo más frecuentes las de los miembros posteriores y el hombro (Araujo and Waard, 2004).

Forma ocular: la conjuntivitis generalmente se manifiesta por dolor, fotofobia lagrimeo y manchas alrededor del limbo esclerocorneal. Puede ulcerarse la córnea e infectarse secundariamente. Es producto de una hipersensibilidad a los antígenos del bacilo y no de una infección directa. Otro proceso es la conjuntivitis tuberculosa. Los tubérculos coroidales a nivel del fondo de ojo permiten un diagnóstico rápido en las formas miliar y meníngea. Otras formas son la panoftalmitis aguda, la uveítis y retinitis (Araujo and Waard, 2004).

Forma cutánea: constituye un pequeño porcentaje de la tuberculosis extra-pulmonar puede presentarse la infección primaria de la piel a través de heridas, generalmente acompañada de adenopatías satélites. Otras lesiones son los abscesos y el eritema nodoso, genital y pericarditis tuberculosa (Araujo and Waard, 2004; Baylan et al., 2004).

4.12 DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

Dentro de las estrategias para combatir a la TB (tuberculosis), el diagnóstico representa uno de los pilares importantes debido a que provee la información para que se inicie el tratamiento oportuno y adecuado en un paciente tuberculoso así como la identificación de animales positivos a la enfermedad (Neill et al., 2005), por lo tanto para efectos de la campaña contra la tuberculosis se permiten los siguientes métodos de diagnóstico publicados dentro de la NOM-031-ZOO-1995 (SAGARPA, 1995), prueba intradérmica con Derivado Proteico Purificado (PPD) o tuberculina. Cuando se requiere mayor sensibilidad, como en casos de alta prevalencia se aplica en el pliegue caudal y para el caso de requerir mayor especificidad (baja prevalencia) se utiliza la doble comparativa en el cuello (Estrada-Chávez et al., 2004).

Usualmente en el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar las muestras más utilizadas son: esputos, lavados bronquiales, lavados bronquioalveolares, etc., las cuales presentan flora bacteriana asociada y para ello se necesita de un método de descontaminación que permita el aislamiento del bacilo tuberculoso (Estrada-Chávez et al., 2004).

4.12.1 Prueba de la Tuberculina

La prueba de la tuberculina se hace intradérmica y por lo general es el método más utilizado en los bovinos para detectarles tuberculosis. Pero algunas ocasiones existen animales que no reaccionan a esta prueba y pueden llegar a dar falsos negativos por lo que estos animales se quedan como sanos en la explotación y son un foco importante de infección porque eliminan el *Mycobacterium bovis* al hato en general (Díaz-Otero et al., 2003).

La tuberculina es un extracto de cultivo de bacilos tuberculosos. Tener una reacción a la prueba lo único que indica es que el individuo ha sido infectado en algún momento de su vida por una bacteria del complejo tuberculosis, incluyendo el bacilo vacunal (Morán-López and Lazo-Amador, 2001).

Las tuberculinas autorizadas para efectos de Campaña Nacional contra la tuberculosis son:

- a) PPD bovino: elaborado con *Mycobacterium bovis* cepa AN5, que se utiliza en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple.
- b) PPD aviar: elaborado con *Mycobacterium avium* cepa D4, que se utiliza en la prueba cervical comparativa, la cual debe contener un colorante llamado rojo de Ponceau para diferenciarla de la PPD bovina (SAGARPA, 1995).

Prueba anocaudal

Esta prueba se lleva a cabo para probar hatos sospechosos a tuberculosis bovina, donde se debe limpiar el sitio de la inyección evitando el uso de desinfectantes o productos químicos que irriten la piel. Previamente a la inoculación de la tuberculina, se medirá el pliegue anocaudal interno

(milímetros), los cuales se registran en el protocolo correspondiente (SAGARPA, 1995).

Si se observa cualquier aberración de la piel que se pueda confundir con la lectura del test, se deberá inocular en el pliegue anocaudal interno opuesto, registrándolo en la planilla (SAGARPA, 1995).

Se procede a insertar la aguja intradérmicamente en toda su longitud en las capas superficiales de la piel, aplicada en el tercio medio del pliegue anocaudal, a unos 6 cm de la base de la cola y en el centro del pliegue. La inyección se hará con 0.1 ml de tuberculina PPD bovina de 1.0 mg/ml de concentración (SENASA, 2000) con un porcentaje de sensibilidad del 72 al 91% y especificidad del 78 al 96% (Estrada-Chávez et al., 2004).

Interpretación

La interpretación de los resultados de esta prueba se hace de la siguiente manera.

P = POSITIVO: un engrosamiento de igual o mayor de 5 mm.

S = SOSPECHOSO: un engrosamiento de 3 o más y menos de 5 mm.

N = NEGATIVO: un engrosamiento menor de 3 mm (Torres, 2004).

Prueba cervical simple

Esta prueba se empleará para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis*; o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis*; se debe rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en el tercio medio superior del cuello. El sitio de aplicación será aproximadamente 10 cm debajo de la cresta. Esta prueba se aplica mediante la inoculación intradérmica de 0.1 ml de PPD bovino en la región media cervical, haciendo la lectura el mismo Médico Veterinario que aplicó la prueba mediante la observación y palpación del sitio en donde se practicó, realizándose a las 72 ± 6 horas posteriores a su inoculación (SAGARPA, 1995).

Interpretación

En esta prueba existen solo dos clasificaciones:

P = POSITIVO: un engrosamiento de la piel de igual o mayor de 3 mm.

N = NEGATIVO: un engrosamiento menor de 3 mm.

No existe la clasificación de sospechoso (Torres, 2004).

Doble comparativa

Se debe rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en el tercio medio superior del cuello. El sitio de aplicación superior será cerca de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior será aproximadamente de 13 cm debajo de esta aplicación, se hace inoculando intradérmicamente de 0.1 ml de PPD aviar y 0.1 ml de PPD bovino. Previo a la inoculación, se levanta un pliegue de piel en el centro de las áreas rasuradas y se procederá a medir el grosor de éstos, utilizando el cutímetro. El registro final de las medidas deberá redondearse según el siguiente criterio: de 6.2 baja a 6.0; 6.3 sube a 6.5; de 6.7 baja a 6.5; de 6.8 sube a 7; debiendo registrarse los valores en los formatos para prueba cervical comparativa. El PPD aviar se inocula intradérmicamente en el área rasurada superior y el PPD bovino en la inferior. La lectura de esta prueba se realizará 72 horas (\pm 6 horas), midiendo con el cutímetro el grosor de las reacciones, éstas serán anotadas en el formato oficial de la prueba cervical comparativa, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda; una vez realizada esta operación se procede a graficar los valores obtenidos tanto de PPD aviar como del bovino y el punto de intersección dará el resultado de la prueba. De acuerdo a la gráfica oficial se interpretará los resultados (SAGARPA, 1995).

Interpretación

Por diferencia en milímetros anterior y posterior a las inoculaciones determina la respuesta final de cada PPD.

La interpretación está basada en el tamaño de la respuesta de la tuberculina bovina comparada con la aviar.

A nivel individual, para interpretar la prueba comparativa, se considera reaccionante positivo, aquel bovino con 4 mm o más de respuesta a la PPD bovina que a la PPD aviar.

Cuadro 2. Interpretación de las medidas de la tuberculina doble comparativa. (SAGARPA, 1995; Torres, 2004)

PPD Bovino	PPD Aviar	Respuesta
+ de 4mm	0	Positiva
+ de 1mm	0	Sospechosa
= ó <	0	Negativa

4.12.2 Análisis Histopatológico

Se deberá utilizar la tinción de hematoxilina-eosina. Esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además pueden utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y en cortes o improntas realizados con el material sospechoso a bacilos ácido alcohol resistentes (Estrada-Chávez et al., 2004; SAGARPA, 1995).

4.12.3 Baciloscopia

A través del examen directo de la muestra y coloración con la técnica de Ziehl-Neelsen, no es 100% confiable, pues el bacilo no siempre es detectado en las muestras clínicas examinadas (Nava-Paz et al., 2005).

La baciloscopia es en la mayoría de los laboratorios, la técnica tradicional para el diagnóstico de enfermos con tuberculosis pulmonar que son bacilíferos, esto es, que son fuente de diseminación de la enfermedad; tiene menor sensibilidad que el cultivo, ya que para obtener un resultado positivo requiere que la muestra presente, como mínimo, 5,000-10,000 bacilos/ml de expectoración para que tengan un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio; sólo cuando el número de bacilos alcanza a más de 100.000 por ml. de expectoración, podemos esperar que las baciloscopias sean consistentemente positivas, y se estima que la mitad de los 10 millones de

casos reportados anualmente, son infecciones pulmonares y extra-pulmonares baciloscópico negativas (Broglia et al., 2002; Mariscal-Mendendez et al., 2005; Nava-Paz et al., 2005).

Utilizando la tinción fluorescente, este número puede ser tan bajo como 1.000 bacilos por ml. El rango de sensibilidad de la baciloscopia, oscila entre 50-80% y la especificidad es virtualmente del 100% (Nava-Paz et al., 2005).

4.12.4 Análisis Microbiológico

- a) Examen directo: mediante la tinción de Ziehl Neelsen para microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarían bacilos teñidos de color rojo. Puede utilizarse la microscopía de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante.
- b) Examen indirecto: cultivo, aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con o sin huevo, Middlebrook, Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen (SAGARPA, 1995).

4.12.5 Cultivo Microbiano

El cultivo de *M bovis* constituye el procedimiento óptimo para el diagnóstico confirmativo de TB, pero requiere mucho tiempo, tiene poca sensibilidad y también se obtienen resultados falsos positivos (Romero-Tejeda et al., 2006).

Es el método de elección para el diagnóstico e identificación del bacilo, ya que es la técnica de mayor sensibilidad en la detección de *M. tuberculosis* por requerir la presencia de sólo 10 bacilos/ml en la muestra para obtener un resultado positivo. En las formas de tuberculosis extrapulmonar es quizás la única forma de diagnóstico bacteriológico disponible (Broglia et al., 2002).

Existen diferentes medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias, que garantizan un buen soporte nutritivo para su crecimiento. Estos pueden ser sólidos o líquidos, selectivos y no selectivos. Los medios sólidos pueden ser elaborados a base de huevo o agar. Los medios basados en huevo se caracterizan porque contienen verde de malaquita, que inhibe el crecimiento de la flora bacteriana asociada, pueden guardarse refrigerados por largo tiempo, resisten la desecación y garantizan el crecimiento de la mayoría de las Micobacterias, entre ellas *M. bovis*, ya que se desarrollan en forma adecuada en medios sintéticos simples que contengan una fuente de carbono, nitrógeno e iones de metales esenciales como hierro y magnesio. Sin embargo, para el aislamiento a partir de muestras clínicas se requiere de medios más complejos, a base de papa-suero, agar-suero o huevo. Los integrantes del complejo TB y la mayoría de las Micobacterias capaces de infectar al hombre tienen un crecimiento muy lento, dado por una tasa de duplicación de aproximadamente 18 horas, por lo tanto se requiere un período de incubación que puede durar entre 3 y 6 semanas, a 37 °C. Aunque son aerobios estrictos, el incremento de la tensión de CO₂ puede favorecer la velocidad de crecimiento. El pH óptimo de crecimiento es 7, pero pueden crecer en pH que oscilen entre 6 y 7.6 (Araujo and Waard, 2004).

4.12.6 El Medio de Cultivo Middlebrook 7H10

Este medio es semisintético con base de agar siendo uno de los más utilizados. Debido a la alta hidrofobicidad de la pared de las Micobacterias tienden a crecer en este medio (Soto-Ospina, 2002).

El medio de Middlebrook 7H10 es un medio sólido que da facilidad para la recuperación y cuantificación de *Mycobacterium* (Neill et al., 2005).

4.12.7 Sistema BACTEC

El sistema BACTEC comenzó en la década de los 70's, inicialmente utilizando técnicas radiométricas y posteriormente desarrollando técnicas fluorescentes; en la actualidad se utilizan sensores fluorescentes, que permiten el monitoreo continuo de las botellas las cuales se agitan e incuban

automáticamente detectando la cantidad de bióxido de carbono que se genera por la respiración de las bacterias. Este sistema ofrece crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios así como resinas para inactivación de antibióticos, además permite la recolección directa con un vacutainer de microorganismos para cultivo con mayor seguridad y nula contaminación (Paz-Oplustil et al., 2001; Ynterian, 2000).

El método radiométrico, permite disminuir a 10-15 días las primeras lecturas positivas, disminuye el tiempo de estudio de sensibilidad a drogas y permite diferenciar rápidamente entre *Micobacterias* tuberculosas y otras *Micobacterias*. Sus desventajas son el mayor costo, mayor complejidad en aparatos de bioseguridad, mayor contaminación si no se maneja bien y riesgo para el personal (Broglia et al., 2002).

4.12.8 Pruebas Serológicas

Pruebas de ELISA (Inmunoabsorbencia Ligada a Enzimas) indirecto, para la detección de anticuerpos séricos. Posee baja sensibilidad, pero es muy fiable en la detección de vacas “anérgicas” a las pruebas de la tuberculina y γ -interferón. En su forma “anamnésica” incrementa notablemente su sensibilidad (> 90%) y su fiabilidad en la detección de animales “anérgicos”. Se han introducido varias pruebas (ELISA, Radio Inmunoensayo [RIA], aglutinación del látex) para el diagnóstico serológico de la enfermedad micobacteriana activa. No obstante, las pruebas para detectar los antígenos micobacterianos o los anticuerpos específicos son inespecíficos e insensibles. Se han conseguido resultados mejores mediante el uso de antígenos altamente purificados para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa. Sin embargo, estas pruebas solo tienen utilidad en la enfermedad crónica y extensa (Garza and Treviño, 2000).

4.12.9 Prueba del Interferón-gamma (BOVIGAM®)

En la década de los noventa del siglo pasado, se desarrolló una prueba simple y rápida para detectar bovinos tuberculosos, esta prueba evalúa la inmunidad celular mediante la detección del IFN- γ en respuesta a un antígeno específico bajo un sistema de cultivo con sangre completa. En general, un

animal infectado con *M. bovis*, tiene en la sangre linfocitos que reconocen antígenos micobacterianos presentes en el PPD; como resultado inducen la secreción del IFN- γ , que puede ser detectado por un ensayo inmunoenzimático empleando anticuerpos mononucleares (Díaz-Otero et al., 2003).

Se ha desarrollado para detectar y cuantificar la liberación de citoquinas cuando toda la sangre es cultivada con las tuberculinas bovina y aviar. Los resultados de infecciones experimentales de ganado que se indica el ensayo podría detectar la infección tan pronto como 14 días post-infección, y antes de la prueba de la tuberculina (Gormley et al., 2005).

Esta prueba es comercial para medir el interferón gamma (IFN- γ) (Bovine Gamma Interferon Test- BOVIGAM®). La prueba consiste en incubar sangre completa de bovinos sospechosos de tuberculosis diagnosticados con PPD bovina y PPD aviar, bajo condiciones especiales. Si el animal ha estado en contacto con el microorganismo, sus linfocitos liberarán interferón gamma, el cual será detectado a través de un sistema de ELISA sándwich, donde los anticuerpos anti-gamma interferón unidos a una placa de 96 pozos capturan el gama interferón bovino. La reacción se detecta por la adición de un anticuerpo específico anti-gama interferón conjugado a una peroxidasa, la cual reacciona con un substrato produciendo color. Estudios muestran que esta prueba en general tiene una sensibilidad y especificidad más alta que la prueba de tuberculina (Ward, 2005).

La prueba del IFN- γ posee una serie de ventajas adicionales para el diagnóstico de tuberculosis bovina:

- a) Se manipulan los animales una sola vez
- b) Se puede repetir la prueba tantas veces cuando sea necesaria
- c) La prueba es comparativa y excluye aquellos animales que puedan reaccionar por infecciones con micobacterias atípicas no patógenas
- d) El plasma obtenido del animal para el diagnóstico de tuberculosis bovina puede ser utilizado para el diagnóstico de otras enfermedades como Leptospirosis, Brucelosis, etc.

Las desventajas son que la prueba es relativamente cara y necesita un laboratorio para procesar las muestras. La prueba del IFN- γ se utiliza como prueba de diagnóstico complementario o confirmativa en países como Australia, Nueva Zelanda y los EEUU (Ward, 2005).

4.12.10 Diagnóstico Molecular por PCR

La necesidad de diseñar métodos rápidos y precisos que permitan diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* ha conducido al desarrollo de estrategias de identificación genotípica (Arráiz et al., 2006).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) amplifica por medio de enzimas una región del material genético específico para el microorganismo, el cual puede ser entonces visualizado por técnicas bioquímicas (Ward, 2005).

Existen hoy día técnicas basadas en la biología molecular que han demostrado su eficacia en la caracterización molecular de cepas, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis*; una de estas técnicas (*spoligo*typing) se basa en la amplificación por PCR de la región DR, un locus único y altamente polimórfico presente en el cromosoma de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Esta región contiene múltiples secuencias repetidas de 36 pares de bases (pb) separados por espacios intersecuenciales de una longitud de 35 a 41 pb. Al producto de la PCR de cada aislado individual se le permite hibridarse a 37 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* H37Rv y seis secuencias espaciadoras de *M. bovis* BCG P3. Después de la hibridación y la detección pueden identificarse las secuencias espaciadoras que son comunes al aislado y el conjunto de los oligonucleótidos espaciadores. Por lo tanto, la técnica establece el diagnóstico de la presencia del agente etiológico y también determina la diferenciación de la especie (*M. tuberculosis*/*M. bovis*) y la diferenciación de cepas dentro de cada especie (Pérez-Guerrero et al., 2008).

Uno de los ensayos propuestos inicialmente, se diseñó basándose en el hecho de que *M. tuberculosis* contiene en su genoma mayor número de copias del elemento de inserción IS6110 que *M. bovis*, sin embargo, estudios posteriores demostraron que algunas cepas de *M. bovis* tenían alto número de copias de IS6110 y a su vez, algunas cepas de *M. tuberculosis* exhibían bajo número de copias de este elemento de inserción. Otro intento resultó del estudio del gen *mtp-40*, el cual presumiblemente estaba presente en *M. tuberculosis* y presente en varias cepas de *M. bovis*. En estudios posteriores se han incorporado otros marcadores genéticos para diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, destacándose el diseño de ensayos de PCR que se basan en la caracterización de polimorfismos de DNA que dependen de la

presencia o no de regiones espaciadoras localizadas entre dos secuencias (Arráiz et al., 2006).

La PCR para el gen que codifica la proteína MPB70 ha mostrado buena sensibilidad y excelente especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y bovinos. Se ha demostrado presencia de una sola copia de este gen en cepas de *M. bovis* y bacterias del complejo *M. tuberculosis*, así como su ausencia en 24 especies diferentes de micobacterias y en otros géneros bacterianos. Otras técnicas dirigidas contra secuencias de inserción (IS) que han sido cuestionadas por su especificidad a diferencia de la PCR contra MPB70. Sin embargo, es necesario instrumentar esta técnica en muestras de tejido, analizando su sensibilidad y especificidad bajo distintas situaciones epidemiológicas. La instrumentación de una PCR altamente sensible y específica para confirmar el diagnóstico de TB, permitiría obtener resultados en pocas horas, en comparación con el cultivo que requiere usualmente meses (Estrada-Chávez et al., 2004).

Varios kits diagnósticos basados en esta tecnología están disponibles en el mercado, sin embargo son costosos y la sensibilidad (falsos negativos por inhibición de la reacción) y especificidad (falsos positivos por contaminación cruzada) son objeto de discusión en la literatura científica (Ward, 2005).

Ventajas de la PCR

Teóricamente la PCR origina el doble del ADN blanco por cada ciclo. En la práctica se alcanza un factor de amplificación entre 10^6 a 10^8 de 30 a 40 ciclos. La PCR es extremadamente sensitiva. Bajo condiciones artificiales es posible obtener una copia del ácido nucleico. En la práctica clínica el umbral de detección es de 10 a 1,000 copias de ácido nucleico, produce resultados rápidos en promedio de uno a dos días. Es aplicable en un gran campo como: clínica, patología, muestras forenses (Frothingham, 1996).

El ADN es una molécula muy estable y la PCR puede ser usada con éxito en tejidos fijados en formalina, inactividad bacteriana en cultivos y muestras arqueológicas. Muchas veces proporciona una detección y caracterización simultánea de microorganismos, basándose en el análisis de amplificación de la secuencia de sus ADN entre los dos primers (Frothingham, 1996).

Limitantes de la PCR

La contaminación es un importante problema de diagnóstico para la PCR; típicamente la PCR produce millones a billones de copias de un segmento de ADN por amplificación. Los productos de la PCR son una fuente de futuras reacciones a partir del ADN blanco. Ello puede ser transferido accidentalmente a una nueva muestra o contaminar los reactivos de la PCR. Los productos de la PCR son totalmente estables en el laboratorio resisten el medio ambiente, enjuague e incluso la autoclave. Una vez contaminados los productos de la reacción es difícil de eliminar el problema (Frothingham *et al.*, 1992).

Las limitaciones en el uso de la PCR en el diagnóstico de tuberculosis en estudios histopatológicos son las alteraciones físicas y químicas del ADN que afectan la sencivilidad y especificidad de la PCR (Giulia., 1998).

Factores que inhiben la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR están presentes dentro de los ADN blancos de muchas fuentes. La inhibición actúa en uno o más de tres puntos esenciales en la reacción de la siguiente manera: ellos interfieren con la lisis celular necesaria para la extracción de ADN, interfieren por la degradación o captura del ADN, e inhiben a la actividad de la polimerasa. A pesar de que una amplia gama de inhibidores se han reportado, la identidad y modos de acción de muchos de ellos permanecen sin conocerse. Estos efectos pueden tener implicaciones importantes en las investigaciones de salud pública y en lo clínico, especialmente si las muestras involucran alimentos o muestreos ambientales. Los inhibidores comunes incluyen varios componentes de los fluidos corporales y reactivos encontrados en las ciencias clínicas y forenses (por ejemplo, hemoglobina, urea y heparina), constituyentes de alimentos, (compuestos orgánicos y fenólicos, glucógenos, grasas y Ca^{2+}), y compuestos ambientales (compuestos fenólicos, ácidos húmicos y metales pesados). Otros inhibidores de una amplia distribución incluyen constituyentes de las células bacteriales, DNA no blancos y contaminantes y componentes en el laboratorio como por ejemplo polen, polvo de los guantes, utensilios de plástico y celulosa del laboratorio (Wilson, 1997).

4.13 CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

En la mayoría de los países desarrollados del mundo, la enfermedad en animales estabulados es controlada en la actualidad relativamente bien y las precauciones suplementarias de la inspección de la carne y de la pasteurización regulada de la leche han reducido al mínimo el riesgo de la infección humana de *M. bovis* (Neill et al., 2005).

En países en desarrollo la tuberculosis bovina se caracteriza por ser una enfermedad de patrón endémico, cuya prevalencia es variable según áreas geográficas y tipos de producción. Entre los países desarrollados los programas de control han tenido resultados variables y en algunos casos, las incidencias vuelven a elevarse debido a la presencia de reservorios silvestres de la infección y movimientos de ganado portador no detectado oportunamente. En América Latina la mayoría de los países emprenden iniciativas de control de la tuberculosis, pero aun así se estima que un 24% de la población bovina no está bajo ningún sistema de control de la enfermedad (Abalos and Retamal, 2004).

La estrategia en zonas de baja prevalencia (ganado de carne) son: el diagnóstico y sacrificio de animales positivos, la cuarentena de los hatos infectados, la vigilancia epidemiológica en rastros y mataderos y la constatación de hatos libres. En zonas de mediana y alta prevalencia (ganado lechero y doble propósito) son: el diagnóstico, sacrificio o segregación de reactores, cuarentena de predios positivos, vigilancia en rastros, aplicación de medidas de bioseguridad y el manejo de hatos infectados (SENASICA, 2008).

Cuadro 3. Situación actual de erradicación y control de la tuberculosis bovina en México (SENASICA, 2008).

ERRADICACION	CONTROL
AGUASCALIENTES (A)	AGUASCALIENTES (B)
BAJA CALIFORNIA (A)	BAJA CALIFORNIA (B)
CAMPECHE (A)	CAMPECHE (B)
CHIAPAS (A)	CHIAPAS (B)
DURANGO (A)	DURANGO (B)
GUANAJUATO (A)	GUANAJUATO (B)
GUERRERO (A)	GUERRERO (B)
JALISCO (A1) (A2) (A3) (A4)	JALISCO (B)
MICHOACAN (A)	MICHOACAN (B)
NAYARIT (A)	NAYARIT (B)
OAXACA (A1)	OAXACA (B)
PUEBLA (A1) (A2) (A3)	PUEBLA (B)
TABASCO (A)	TABASCO (B)
ZACATECAS (A)	ZACATECAS (B)
COAHUILA (Excepto La Laguna)	BAJA CALIFORNIA SUR
COLIMA	DISTRITO FEDERAL
CHIHUAHUA	MORELOS
NUEVO LEON	SAN LUIS POTOSÍ
QUINTANA ROO	QUERETARO
SINALOA	HIDALGO
SONORA	MÉXICO
TAMAULIPAS	TLAXCALA
VERACRUZ	
YUCATÁN	05/09/2007

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 21 regiones de baja prevalencia en tuberculosis bovina, de las cuales 11 regiones pueden exportar con una sola prueba de tuberculina del lote, 9 regiones con prueba de hatos y de lotes y una región que no requiere prueba de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos (SENASICA, 2008).

Cuadro 4. Clasificación de los Estados o Regiones por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en relación a Tuberculosis Bovina (SENASICA, 2008).

Estados o Regiones de origen	Clasificación de USDA	Requisitos de movilización para exportación a los EUA de Bovinos Castrados
Norte de Sonora	Acreditado Modificado Avanzado	No requiere pruebas de tuberculina
Sur de Sonora Baja California (A) Coahuila (A) Chihuahua (A) Jalisco (A1)-Zacatecas (A) Nayarit (A) Nuevo León (A)	Puebla (A1, A2) Quintana Roo Sinaloa Tamaulipas Yucatán Veracruz (A)	Acreditado Modificado Requiere prueba de tuberculina al lote a movilizar
Colima Chiapas (A) Durango (A) Guerrero (A)	Michoacán (A) Tabasco (A)	Acreditado Preparatorio Requiere prueba de tuberculina al hato de origen y al lote a movilizar.
Aguascalientes (A) Aguascalientes (B) Baja California (B) Baja California Sur Campeche (A) Campeche (B) Chiapas (B) Chihuahua (B1, B2,B3) Coahuila (B1 y B2) Coahuila (La Laguna) Distrito Federal Durango (La Laguna) Guanajuato Guerrero (B) Hidalgo	Jalisco (A2, A3 y B) Nayarit (B) Nuevo León (B) México Michoacán (B) Morelos Oaxaca Puebla (B) Querétaro San Luis Potosí Tabasco (B) Tlaxcala Veracruz (B) Zacatecas (B)	No Acreditado Movilización para exportación solo a sacrificio inmediato

16 de noviembre de 2007

Estrategias de la Campaña:

1. Difusión y promoción de la Campaña.
2. Capacitación de personal.
3. Diagnóstico de campo (Probar al 100 % de los hatos).
4. Aplicación de cuarentenas en hatos infectados.
5. Eliminación e indemnización de reactores.
6. Inspección en rastros para confirmar y detectar nuevos casos.
7. Control de la movilización.
8. Reconocimiento y protección de regiones de baja prevalencia.
9. Certificación de hatos libres de la enfermedad (SENASICA, 2008).

El control de la tuberculosis bovina está basado en un diagnóstico oportuno y la eliminación de los animales infectados, junto con la prevención de la diseminación de la infección tanto dentro como hacia fuera de los rebaños. Al igual que el control de la tuberculosis humana, las acciones deben

complementarse con un seguimiento, contención y vigilancia de los animales contactos expuestos en el rebaño (Abalos and Retamal, 2004).

4.13.1 Vacunación y Tratamiento

El tratamiento en la actualidad se utiliza principalmente para humanos ya que los bovinos tienen un tiempo muy corto de vida, y los que se encuentran positivos a la enfermedad se espera a que no sea rentable su producción y se mandan a sacrificio; en el pasado, a las personas que padecían tuberculosis, se les aislaba en sanatorios, previniendo así la diseminación de la enfermedad; además se trataba por colapso de pulmón, lo cual era eficaz (Araujo and Waard, 2004).

El descubrimiento de la quimioterapia efectiva para erradicar la tisis (nombre por el cual se conoció durante mucho tiempo la enfermedad) trajo consigo la creencia que la tuberculosis sería fácilmente erradicable. Sin embargo, el tiempo se encargó de demostrar lo contrario y la conjunción de factores psicosociales, epidemiológicos, administrativos, operativos han permitido que la tuberculosis continúe y se halla transformado, actualmente, en una verdadera plaga para el hombre (Nava-Paz et al., 2005).

Actualmente se están evaluando en el Ganado diferentes tipos de vacunas que están en desarrollo, basadas en microorganismos vivos atenuados, microorganismos muertos, vacunas subunitarias compuestas por proteínas o glicoproteínas purificadas y vacunas de DNA (González-Salazar et al., 2007).

Dentro de las vacunas con mayores posibilidades están los preparados de extracto proteínicos de filtrado de cultivo (CFPE), que contienen proteínas de *M. bovis* o *M. tuberculosis*, pues son buenos estimulantes de células T en ratones y ganado experimentalmente infectados con tuberculosis; han demostrado que pueden inducir altos niveles de protección contra desafíos aerógenos con *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Se ha observado que las micobacterias vivas son más eficientes en la generación de la resistencia adquirida específica, comparada con las preparaciones de micobacterias muertas. El objetivo de usar proteínas específicas que estimulen respuesta inmune protectora para la tuberculosis, es que no inducen reacción a la prueba

de tuberculina y la efectividad de la vacuna puede no estar influida por previa sensibilización de micobacterias ambientales (González-Salazar et al., 2007).

La vacuna utilizada extensivamente para proteger a las personas contra la tuberculosis, conocida como BCG (bacilo de Calmette y Guérin), proviene de una cepa atenuada de *M. bovis*, preparada con bacterias vivas liofilizadas, y hoy en día, ante la falta de mejores expectativas, se considera junto con el uso de la biología molecular, como modo de protección del ganado y especies silvestres para desarrollar inmunidad protectora y diferenciar simultáneamente la respuesta vacunal de la infección natural. Sin embargo, se estima que los primeros avances en lograr un producto eficiente estarán disponibles alrededor de 2010 (Abalos and Retamal, 2004).

Desde el desarrollo de esta vacuna, en 1906, se le ha experimentado en el ganado, sin embargo, la protección ha sido de corta duración y muchas veces se ha observado que la BCG no protege contra la infección natural, pero sí contra infecciones experimentales. Se ha visto que la vacunación funciona a menudo en zonas de alta prevalencia, pero los becerros recién nacidos pudieron haber sido expuestos a *M. bovis*, antes de la vacunación, a través del consumo de leche de vacas con mastitis tuberculosa (Abalos and Retamal, 2004).

Una serie de experimentos en los pasados diez años indica que una dosis de BCG con 10^4 - 10^6 unidades formadoras de colonias (UFC), administradas subcutáneamente en becerros recién nacidos, inducen niveles significativos de protección contra desafíos con *M. bovis* virulentos. La vacunación de animales con BCG en el nacimiento tiene eficacia de 100% de protección contra el desarrollo de lesiones macroscópicas, cuando éstos son vacunados a las seis semanas tiene una eficacia de 90% (González-Salazar et al., 2007).

Adicionalmente a la vacunación se están utilizando inmunomoduladores con la finalidad de aumentar la intensidad de la respuesta, principalmente de tipo celular. Dentro de los inmunomoduladores considerados más importantes se encuentran los interferones (IFN), que constituyen una familia de proteínas producidas por las células nucleadas en respuesta precoz, anterior incluso a la respuesta antigénica, a las infecciones víricas u otros estímulos (bacterias, endotoxinas, mitógenos) (González-Salazar et al., 2007).

Asimismo, estudios realizados en modelos animales y en el humano muestran que la administración exógena de IFN- γ , durante la inmunización, incrementa la respuesta inmune celular, comprometida en la eliminación de bacterias intracelulares, debido a que se favorece tanto la presentación de las células T CD4+ específicas y T CD8+ citotóxicas, entre otras funciones (González-Salazar et al., 2007).

Actualmente, la base del tratamiento contra la tuberculosis, son los antibióticos, para lo cual debe tomarse en cuenta lo siguiente:

1. Las micobacterias son bacterias intracelulares, por lo que solo deben utilizarse antibióticos que se acumulen en el interior de las células del huésped.
2. Las micobacterias son de crecimiento lento, por tanto los antibióticos eficaces solo contra bacterias de crecimiento rápido no son útiles.
3. Los antibióticos deben administrarse durante un periodo de tiempo prolongado y en dosis pequeñas para asegurar su cumplimiento (Araujo and Waard, 2004).

Habitualmente se utiliza la combinación de isoniazida y rifampicina, aunque el tratamiento debe elegirse de acuerdo con los resultados de las pruebas de sensibilidad aplicadas al microorganismo y de acuerdo a la fase en que se halla la tuberculosis, también se puede utilizar estreptomycin, pirazinamida, etambutol (Tay-Zavala et al., 2003).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Localización Geográfica de la Comarca Lagunera

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila y en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, con dirección Periférico y carretera Santa Fe S/N, en Torreón, Coahuila, ciudad que forma parte de la Comarca Lagunera.

La Comarca Lagunera se encuentra ubicada entre los meridianos 101° 40' y 104°45' longitud oeste del meridiano de Greenwich y entre los paralelos 24° 05' y 26° 54' latitud norte, con una altura sobre el nivel del mar de 1120 metros (Aguirre, 1981).

5.2 Sitio de Muestreo

El presente estudio se realizó en unas de las Unidades Productivas de la Comarca Lagunera, comprendidos en los municipios de Torreón, Matamoros, San Pedro de las Colonias y Viesca en el Estado de Coahuila y Gómez Palacio, Tlahualilo, Lerdo y Nazas en el Estado de Durango.

Se analizaron 15 animales considerados como positivos por la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina, distribuidos en dos establos de la región, omitiendo los nombres de los mismos por criterios de privacidad.

Se tomó muestras de exudado nasal a cada animal seleccionado.

5.3 Toma y Procesamiento de Muestras

Las muestras fueron tomadas de vacas seleccionadas como positivas a la prueba de tuberculina, después de haber sido atrapadas e inmovilizadas. La toma se realizó introduciendo en su totalidad un hisopo estéril en las fosas nasales del animal, recolectando así exudado y el hisopo se depositó por

separado en un tubo de ensayo con tapón de rosca con teniendo 5 ml de solución reguladora de fosfatos (Agua Peptonada Buferada, Difco) estéril, identificando cada tubo con los datos del animal al que pertenece la muestra. La muestra se mantuvo en hielo durante el transporte al laboratorio para su análisis.

En el laboratorio las muestras se inactivaron mediante calentamiento a baño María hasta hervir durante 10 minutos para posteriormente pasar a la extracción de DNA.

5.4 Extracción de DNA Mediante el Kit de DNAzol

1. Tomar 200 μ l de la muestra, después de haber inactivado a baño María, y depositar en un microtubo.
2. Agregar 1 ml de DNAzol® reagent (Invitrogen, Inglaterra) y agitar para homogenizar la solución.
3. Centrifugar a 10,000 x g, durante 10 minutos.
4. Tomar 200 μ l del sobrenadante de la muestra centrifugada y pasar a otro tubo.
5. Aplicar 1 ml de etanol al 100%, agitar y centrifugar a 10,000 x g, durante 1 minuto.
6. Descartar el sobrenadante, dejando el botón de DNA, y dejar secar.
7. Agregar 50 μ l de TE 1X y almacenar en refrigeración hasta su uso.

Se llevó a cabo la cuantificación del DNA mediante un Espectrofotómetro Nanodrop (ND-1000), siguiendo las instrucciones del fabricante,

5.5 Preparación y corrida para PCR simple

La PCR se llevó a cabo en tubos para microcentrífuga de 0.5 ml, empleando un Termocilador Perkin Elmer 5,500.

Se realizaron 2 corridas distintas con diferentes concentraciones (cuadros 5 y 6) utilizando el Kit, Amplitaq Gold Master Mix de Applied Biosystems. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 25µl.

La PCR simple para MPB 70 utiliza como ADN blanco un segmento de 372 pb del gen que codifica la proteína MPB70 de las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Iniciadores: TB1F 5'-GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA-3' y TB1R 5'-AGC ACG CTG TCA ATC ATG TA-3'

PCR anidada para la MPB70 amplifica un fragmento de 208 pb del gen MPB70, dentro de la región de 372 pb, utilizando una décima parte del producto obtenido en la PCR simple.

Iniciadores: M22/3 5'-GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGG C-3' y M22/4 5'-CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C-3'

Cuadro 5. 1er. Protocolo para una corrida simple 1X

Reactivos	Volumen (µl) para una reacción de PCR
Master Mix	12.5µl
Oligo TB1F	1.0µl
Oligo TB1R	1.0µl
Agua	2.5µl
AND	6.0µl

Cuadro 6. 2do. Protocolo para una corrida simple 1X

Reactivos	Volumen (µl) para una reacción de PCR
Master Mix	22.5µl
Oligo TB1F	0.75µl
Oligo TB1R	0.75µl
ADN	5µl

Para descartar cualquier tipo de inhibición endógena de la reacción, se realizó una PCR control utilizando los oligonucleótidos CyB1F 5'-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3' y CyB2R 5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3'. Que amplifica una región de 375 pb del gen que codifica al Citocromo B mitocondrial.

5.6. Condiciones de corrida de PCR.

Condiciones de PCR simple: precalentamiento a 94°C 12' (para Taq Gold), 13 ciclos de 45'' a 94°C, 1' a 58°C, 1' a 72°C y una extensión final de 72°C 5'

Condiciones para PCR anidada: precalentamiento a 94°C 12' (para Taq Gold), 24 ciclos de 30'' a 94°C, 30'' a 68°C, 30'' a 72°C y una extensión final de 72°C 10'

Condiciones para PCR control: 34 ciclos desnaturalización 30'' a 94°C, alineación 40'' a 58°C, y extensión 30'' a 72°C.

5.7 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de amplificación de la reacción de PCR se visualizan en un gel de agarosa (0.8 %) a través de electroforesis a 85 V durante 50 minutos y teñido con bromuro de etidio para su visualización en fotodocumentador Power Pac-300 (Biorad).

1. Prepare un gel de agarosa al 0.8 %
2. Colocar dentro de la cámara de electroforesis conteniendo TBE 0.5X
3. En un parafilm colocar 1 μ l de azul de bromogenol por cada muestra.
4. Tome de cada tubo 3 μ l y mezclarlo con el azul de bromogenol hasta homogenizar y depositarla en el orificio del gel de agarosa.
5. Repite este paso hasta terminar con la última muestra.
6. Deje correr la electroforesis aproximadamente de 30 a 40 min a 100V.
7. Al terminar la corrida del gel, sumérgir en bromuro de etidio (1×10^{-3} mg/ml) por 3 minutos para teñirlo.
8. Sacar el gel del bromuro de etidio y sumergir en agua durante 10 minutos.
9. Observe en transiluminador con luz ultravioleta.
10. Fotodocumentar el resultado.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del presente estudio en el cual se pretendía establecer la técnica de PCR para la detección de *Mycobacterium* en muestras de exudado nasal provenientes de vacas lecheras determinadas positivas por la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina se encontró lo siguiente.

6.1 Aislamiento de DNA.

En el presente trabajo la extracción de DNA se logró empleando el Kit comercial DNAzol (Invitrogen, Inglaterra), en las 15 muestras analizadas se obtuvieron bajas cantidades de DNA (Cuadro. 7), y los resultados fueron desfavorables.

Cuadro 7. Resultados de análisis de muestras de exudado nasal de animales determinados positivos por La Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina en dos establos que pertenecen a La Comarca Lagunera.

Muestra	# de Arete del Animal	Cantidad de ADN ng/μl	Resultado PCR
1	066	31.2	Negativo
2	349	31.1	Negativo
3	528	31.8	Negativo
4	217	28.5	Negativo
5	379	48.8	Negativo
6	952	31.7	Negativo
7	0039	25.5	Negativo
8	134	34.8	Negativo
9	0160	33.3	Negativo
10	04	29.9	Negativo
11	1203	27.9	Negativo
12	631	69.6	Negativo
13	700	52.4	Negativo
14	863	39.9	Negativo
15	2568	47.9	Negativo

6.2 Amplificación Mediante PCR.

De acuerdo con los resultados encontrados, no fue posible lograr la amplificación del DNA, así como tampoco en el control interno (CI), como en la detección de *Mycobacterium* (Figura 6 y 7), así mismo, se logro demostrar que los reactivos si están funcionales, dado que se logró la amplificación de PCR para un gen de Caspasa 8 desarrollado por el laboratorio de Biología Micológica Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila (Figura 8).

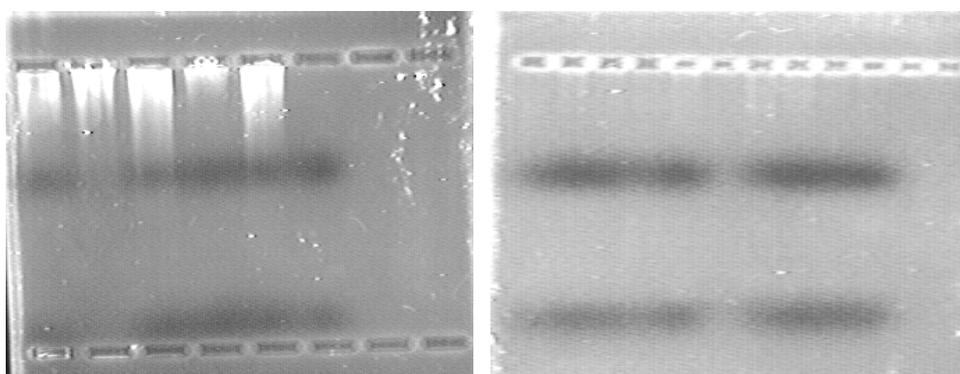


Figura 6. Resultados de PCR simple negativos de muestras de tejido pulmonar y nódulo linfático de animales con lesiones predisponentes a tuberculosis, así como exudado nasal en animales reactivos a la prueba de la tuberculina.

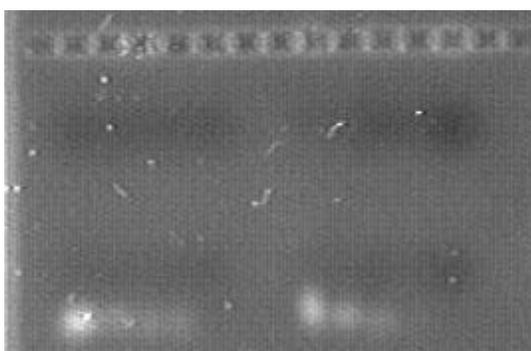


Figura 7. Resultados PCR simple en muestras de exudado nasal de bovinos reactivos a tuberculina.

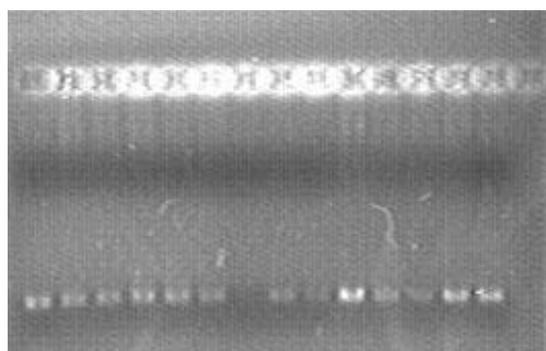


Figura 8. PCR para confirmar la funcionalidad de los reactivos mostrando resultados satisfactorios.

Romero-Tejeda et al., (2006), confirmaron la excreción vía respiratoria de *M. bovis* en ganado lechero infectado naturalmente, mediante un método de PCR anidada, y sugieren la influencia del INF- γ .

Al llevar a cabo la extracción de DNA, observamos que puede haber pérdidas, en los pasos de lavado con etanol al 100% y 75% según el protocolo que tomamos en cuenta, por lo cual se optó por hacer un solo lavado con etanol al 100% en el cual obtuvimos una pastilla de DNA con cantidades más elevadas.

En un estudio realizado por Beige et al., (1995), a partir de muestras clínicas de esputo, la PCR presentó una sensibilidad del 98%, en cambio la PCR simple implementada por Estrada-Chávez et al., (2004), a partir de muestras de tejido de nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio (traqueobronquiales, mediastínicos o retrofaríngeos), donde amplificaron la banda de 372 pb del gen MPB70 en 11 animales encontraron una sensibilidad del 53%, indicando que ello se deba a condiciones inadecuadas de corridas de la técnica, sin embargo, es evidente, que al igual que en nuestro caso, la sensibilidad se tiene que mejorar, a través de la modificación de los protocolos.

Existen una gran cantidad de factores por los cuales se puede ver afectada la amplificación del DNA, puesto que se requiere de medidas muy estrictas, una de ellas es la contaminación durante la manipulación de las muestras o por el material utilizado; el DNA excesivo no-específico derivado del hospedero u otros microbios pueden inhibir la PCR (Vansnick et al., 2007). Se deben tomar muy en cuenta varias recomendaciones para evitar contaminaciones y facilitar el reconocimiento oportuno de los contaminantes, en caso de que se produzcan (Neumaier et al., 1998), en nuestro caso aun no es posible cuáles pueden ser las causas. Se requieren de más estudios.

Un número de ciclos requeridos para la óptima amplificación varía dependiendo de la cantidad de ADN inicial y de la eficiencia de cada etapa de amplificación; generalmente, 25 a 35 ciclos son suficientes para producir de 100 ng a 1 μ g de DNA. Una incubación final a una temperatura de 72° C resulta en secuencias de moléculas de DNA homologas de DNA que les dio origen (Eisenstein, 1990)

Marchetti et al., (1998), menciona que algunos factores que intervienen con la efectividad de la PCR en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina puede ser afectada por interacción de muchos factores como, el tipo de fijación usada, tiempo de fijación, procedimientos de extracción del ADN concentración de DNA blanco amplificada y el protocolo, lo cual indica que existen varias causas por las que se pueden ver afectados los resultados, tomando en cuenta las pocas cantidades de ADN obtenidas siendo un factor importante, además del protocolo que seguimos, así pueden ser una de las causas de que nuestros resultados no fueran favorables, por lo cual, creo necesario seguir trabajando en la sensibilidad del método para propósitos de un diagnóstico certero y rápido como inicialmente propusimos.

Este método de diagnóstico que se está utilizando requiere de tiempo, dedicación y dinero para su procesamiento ya que los reactivos, el material y sobre todo el equipo necesario para la realización de esta técnica son difíciles de conseguir por el monto económico que se requiere.

VII. CONCLUSIONES

- a).- Se logró obtención de DNA
- b).- No se puede asegurar la presencia de DNA de *Mycobacterium*, de acuerdo al control Interno.
- c).- Es posible que existan sustancias inhibidoras que impidan el proceso de amplificación
- d).- Desarrollar técnicas moleculares de diagnóstico son complicadas y una inversión inicial fuerte de tiempo, esfuerzo y dinero.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Abalos, P., and P. Retamal.** 2004. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. **23**:583-594.
2. **Aguilera, L. E.** 2002. Tuberculosis Bovina. Universidad Nacional Río Cuarto.
3. **Aguirre, S. O.** 1981. Guía Climática de La Comarca Lagunera. CIAN-CAELALA-ANIA-SARH, Torreón, Coahuila, México.
4. **Araujo, Z., and J. H. Waard.** 2004. Curso Latinoamericano Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela.
5. **Arráiz, N., Z. Romay, N. Faría, and D. Mujica.** 2006. Identificación Diferencial de Aislados Clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* por un Ensayo de RCP Múltiple. Revista Científica **16**:622-628.
6. **Baylan, O., E. Arca, A. Ozcan, O. Kisa, A. Albay, and L. Doganci.** 2004. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in lupus vulgaris: a case report. Int J Tuberc Lung Dis **8**:1147-1150.
7. **Betancourt, J., N. Ruiz, P. Cruces, and W. Velásquez.** 2002. Sensibilidad de los métodos baciloscopia, cultivo y ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, en pacientes del Edo. Vargas-Venezuela. Kasmera **30**:137-144.
8. **Brogliá, B., E. Bonifachich, M. Cerqueiro, N. Díaz, G. Diez, N. González, G. Laube, I. Miceli, C. Pérez, J. Rey, and R. Silberberg.** 2002. Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. Arch. Arg. Pediatr. **2**:159-178.
9. **CONASA.** 2008. Plan estrategico de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis en México 2008-2012. Disponible en: <http://www.conasamexico.org/conasaplanestrategicotuber.doc> [Online.].
10. **Díaz-Otero, F., V. Banda-Ruíz, L. Jaramillo-Meza, C. Arriaga-Díaz, D. González-Salazar, and C. Estrada-Chávez.** 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. Vet. Méx. **34**:13-26.
11. **Diegel, K. L., S. D. Fitzgerald, D. E. Berry, S. V. Church, W. M. Reed, J. G. Sikarskie, and K. J. B.** 2002. Experimental Inoculation of Nort American Opossums (*Didelphis virginiana*) with *Mycobacterium bovis*. J. Wildlife Dis. **38**:275-281.
12. **Eisenstein, B. I.** 1990. The polimerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The New England Journal of Medicine. **332**:178-183.
13. **Estrada-Chávez, C., F. Díaz-Otero, C. Arriaga-Díaz, N. Villegas-Sepúlveda, R. Pérez-González, and D. González-Salazar.** 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet. Méx. **35**:225-236.
14. **FAO.** 2004. Tuberculosis. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/es/health/diseases-cards/ccpp.html>. [Online.].

15. **Frothingham, R.** 1996. Applications of the polimerase chain reaction to infectius disease diagnosis. *Annals of Saudi Medicine* **16**:657-664.
16. **Frothingham, R., R. B. Blitechington, D. Lee, H. G. Greene, and K. H. Wilson.** 1992. UV absortion complicates PCR decontamination. *Bio Techniques*. **13**:208-210.
17. **Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Meayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, and R. G. Hewinson.** 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:7877-82.
18. **Garza, R., and I. Treviño.** 2000. Tuberculosis Pulmonar. Disponible en: <http://mneomonica.org/docs/patologia/Tuberculosis.doc> unica. [Online.].
19. **Giulia, M., A. Gori, L. Catozzi, L. Vago, M. Nebuloni, C. M. Rossi, A. Degli, A. Bandera, and F. Franzetty.** 1998. Evluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assay. *Clinical Microbiology*. **36**:1512-1517.
20. **Gómez, A.** 2005. Foco rojo por la tuberculosis en la Laguna. Vanguardia, saltillo, Coah. México vol. **2005**.
21. **González-Salazar, D., F. Díaz-Otero, L. Jaramillo-Meza, R. Pérez-González, J. Padilla-Urbina, M. A. Santillán-Flores, C. Arriaga-Díaz, and L. Bojórquez-Narváez.** 2007. Evaluación de diferentes inmunógenos contra la tuberculosis bovina mediante la presencia de lesiones a la necropsia. *Vet. Méx.* **38**:271-284.
22. **Gormley, E., M. B. Doyle, T. Fitzsimons, K. McGill, and J. D. Collins.** 2005. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam) assay. *Veterinary Microbiology*:1-9.
23. **Mariscal-Mendendez, A., C. Ramírez-Palacios, L. González-Sánchez, and R. Zenteno-Cuevas.** 2005. Pobreza, resistencia a los medicamentos, diagnóstico, VIH-SIDA y su impacto en la evolución de la tuberculosis en México. *MedUNAB* **8**:37-42.
24. **Meade, K. G., E. Gormley, M. B. Doyle, T. Fitzsimons, C. O'Farrelly, E. Costello, J. Keane, Y. Zhao, and D. E. MacHugh.** 2007. Innate gene repression associated with *Mycobacterium bovis* infection in cattle: toward a gene signature of disease. *BioMed Central Genomics* **8**:1-15.
25. **Morán-López, E., and Y. Lazo-Amador.** 2001. Tuberculosis. *Rev. Cub. Estomatol.* **38**:33-51.
26. **Nava-Paz, O., M. Hassanhi, and L. Prieto.** 2005. Evaluación de la baciloscopia, cultivo y reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de tuberculosis pulmonar. *Kasmera* **32**:119-131.
27. **Neill, S. D., R. A. Skuce, and J. M. Pollock.** 2005. Tuberculosis-new light from and old window. *J. Appl. Microbiol.* **98**:1261-1269.
28. **Neumaier, M., A. Braun, and C. Wagener.** 1998. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. *Clinical Chemistry* **44**:12-26.
29. **OMS.** 2005. Financiación sostenible de la prevención y el control de la tuberculosis. 58a Asamblea Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. **58**:2-4.

30. **Paz-Oplustil, C., S. R. Teixeira, S. Kimie-Osugui, and C. F. Mendes.** 2001. Impact of Automation in the Diagnosis of Mycobacterial Infection. *J. Bacteriol. Patol. Med. Laborat.* **36**:402-408.
31. **Pérez-Guerrero, L., F. Milián-Suazo, C. Arriaga-Díaz, C. Romero-Torres, and M. Escartín-Chávez.** 2008. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública de México* **50**:286-291.
32. **Piñat, F. M., and Avilán-Rovira.** 2007. Panel Foro "Estado actual de la lucha antituberculosa en Venezuela". *Gac Méd Caracas* **115**:325-334.
33. **Prat-Aymerich, C., J. Domínguez-Benítez, and V. Ausina-Ruiz.** s/f, posting date. *Mycobacterium bovis*. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Micobac/pdf/Mbovis.pdf [Online.].
34. **Prodinger, W. M., A. Brandstätter, L. Naumann, M. Pacciarini, T. Kubica, M. L. Boschioli, A. Aranaz, G. Nagy, Z. Cvetnic, M. Ocepek, A. Skrypnyk, W. Erler, S. Niemann, I. Pavlik, and I. Moser.** 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* Isolates from Europe by Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* **43**:4984-4992.
35. **Radostits, O. M., C. C. Gay, D. C. Blood, and K. W. Hinchclitt.** 2002. Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino. 9ª ed, vol. 1. Mc Graw Hill Interamericana, México, D.F.
36. **Ramírez-Casillas, I. C., M. A. Santillán-Flores, C. Arriaga-Díaz, B. Arellano-Reynoso, and F. Morales-Álvarez.** 2004. Using a Multiplex PCR to differentiate Between *M. bovis* BCG-Vaccinated and pathogenic *M. bovis*-infected goats. *Tec. Pecu. Mex.* **42**:419-428.
37. **Reyes-Corcho, A., M. Díaz-Jidy, and A. Pérez-Rodríguez.** 2004. Tuberculosis y SIDA: algunos aspectos clínicos y epidemiológicos en 72 enfermos cubanos. *Rev. Cub. Med. Trop.* **56**:35-41.
38. **Rhoades, E., and I. Orme.** 1997. Susceptibility of a Panel of Virulent Strains of *Mycobacterium tuberculosis* to Reactive Nitrogen Intermediates. *Infect. Immun.* **65**:1189-1195.
39. **Rodríguez-Cuns, G.** s/f, posting date. Género *Mycobacterium*. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf> [Online.].
40. **Romero-Tejeda, A., C. Arriaga-Díaz, J. Guevara-Vivero, J. A. García-Salazar, R. A. Torres-León, and C. Estrada-Chávez.** 2006. Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero. *Vet. Méx.* **37**:137-143.
41. **SAGARPA.** 1995. NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
42. **Senado-Dumoy, J.** 1999. El Riesgo de Enfermar de Tuberculosis. *Rev. Cub. Gen. Integ.* **15**:168-175.
43. **SENASA.** 2000. Pruebas Tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación) Preguntas y Respuestas. Argentina.
44. **SENASICA.** 2008. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. Disponible en: http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud_animal/camp

- anas_zoosanitarias/campana-nacional_contra_la_tuberculosis_bovina.html. [Online.].
45. **SENASICA.** s/f, posting date. Tuberculosis Bovina. Disponible en: http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud_animal/campanas_zoosanitarias/Tuberculosis_Bovina/FT_tuberculosis_bovina_300107.pdf [Online.].
 46. **Singh, J. P. N., R. Verma, and P. Chaudhuri.** 2006. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Mycobacterium tuberculosis strains in India. *J. Vet. Sci.* **7**:181-187.
 47. **Soto-Ospina, C. Y.** 2002. Caracterización de la reacción citoquímica de *Mycobacterium tuberculosis* con rojo neutro. Correlación con el contenido de Sulfolípido. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
 48. **Sullivan, H. M.** 2005. Bovine Tuberculosis. New Mexico State University p. 1-2, New Mexico, USA.
 49. **Taylor, G. M., D. R. Worth, S. Palmer, K. Jahans, and R. G. Hewinson.** 2007. Rapid detection of Mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BioMed Central Veterinary Research* **3**:1-11.
 50. **Tay-Zavala, J., M. Gutiérrez-Quiroz, and R. López-Martínez.** 2003. Microbiología y Parasitología Médicas. 3ª ed. Mendez Editores.
 51. **Torres, P. M.** 2004. Pruebas Diagnósticas de Campo. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File1012-9.pdf> [Online.].
 52. **Vansnick, E., P. de Rijk, F. Vercammen, L. Rigouts, F. Portaels, and D. Geysen.** 2007. A DNA sequence capture extraction method for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in feces and tissue samples. *Veterinary Microbiology* **122**:166-171.
 53. **Ward, J. H.** 2005. Tuberculosis Bovina. Manual de Ganadería Doble Propósito. Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela.:364-369.
 54. **Wilson, I. G.** 1997. Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *App. Environ. Microbiol.* **63**:3741-3741.
 55. **Ynterian, C. G.** 2000. Bactec 9050. Disponible en: http://www.interlabdist.com.br/news_htm/internews_junho.htm_107 [Online.].
 56. **Zendejas-Martínez, H., F. Milián-Suazo, L. García-Casanov, G. Cruz-Bello, A. M. Anaya-Escalera, and G. Huitrón-Márquez.** 2007. La utilidad de los sistemas de información geográfica en la predicción de la distribución regional de la tuberculosis bovina en Jalisco, México. *Téc Pecu Méx* **45**:279-287.