

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA EN  
EXUDADO NASAL POR REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR) EN BOVINOS PRODUCTORES DE  
LECHE**

**P O R**

**J. JESUS ESPINO DIAZ**

**T E S I S**

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.**

**NOVIEMBRE DE 2005**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA EN  
EXUDADO NASAL POR REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR) EN BOVINOS PRODUCTORES DE  
LECHE**

**T E S I S**

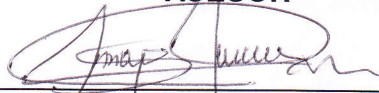
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**J. JESUS ESPINO DIAZ**

**ASESOR**



---

**DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA**

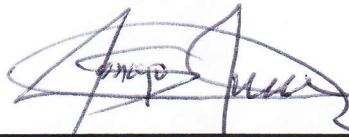
**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**TESIS**

**DETECCIÓN TUBERCULOSIS BOVINA EN EXUDADO  
NASAL POR REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR) EN BOVINOS PRODUCTORES DE  
LECHE**

**APROBADA POR EL COMITE PARTICULAR DE  
REVISIÓN**

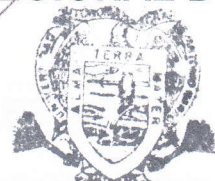
**PRESIDENTE DEL JURADO**



---

**DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE  
CIENCIA ANIMAL**



---

**M.S.P. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**

Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

UAAAN - UE

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.

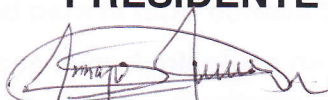
NOVIEMBRE DE 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO "  
UNIDAD LAGUNA**

**TESIS ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE  
ASESORIA Y APROBADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESIDENTE**



---

**DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO**

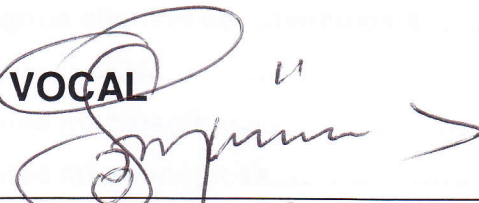
**VOCAL**



---

**MVZEP. MARIA HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE**

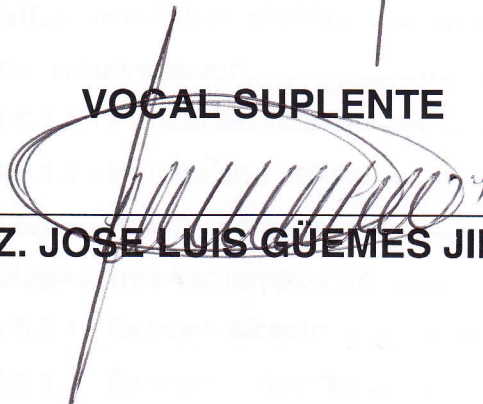
**VOCAL**



---

**M.V.Z. SILVESTRE MORENO ÁVALOS**

**VOCAL SUPLENTE**



---

**M.V.Z. JOSÉ LUIS GÜEMES JIMÉNEZ**

# ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
I.- Introducción.....	1
II.- Objetivos.....	3
III.- Hipótesis.....	4
IV.- Revisión de literatura.....	5
4.1.- Historia de la tuberculosis.....	5
4.2.- Normatividad para la tuberculosis bovina.....	6
4.3.- Características microbiológicas de las micobacterias.....	8
4.4.- Clasificación y taxonomía de las micobacterias.....	10
4.5.- Tuberculosis bovina.....	17
4.5.1.- Definición.....	17
4.5.2.- Etiología de la tuberculosis bovina.....	18
4.5.3.- Prevalencia de la tuberculosis bovina.....	18
4.5.4.- Transmisión.....	19
4.5.5.- Patógenia.....	22
4.5.6.- Síntomas y signos clínicos de tuberculosis.....	27
4.5.7.- Lesiones.....	28
4.5.7.1.- Lesiones macroscópicas.....	28
4.5.7.2.- Lesiones microscópicas.....	29
4.5.7.3.- Lesiones post-mortem.....	29
4.6.- Diagnóstico de la tuberculosis.....	30
4.6.1.- Tuberculinización.....	31
4.6.1.1.- Prueba cervical simple.....	32
4.6.1.2.- Prueba ano caudal.....	32
4.6.1.3.- Prueba comparativa.....	32
4.6.2.- Diagnóstico bacteriológico.....	33
4.6.2.1.- Examen directo.....	33
4.6.2.2.- Examen indirecto.....	34
4.6.3.- Diagnóstico histológico.....	35

4.6.4.- Toma de muestras para el diagnóstico histopatológico y bacteriológico.....	35
4.7.- Otras formas de diagnóstico.....	36
4.7.1.- Radiométrico.....	36
4.7.2.-Prueba Serodiagnóstica de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA).....	37
4.7.3.- Diagnóstico molecular.....	38
4.7.3.1.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
4.7.3.1.1.- Materiales.....	40
4.7.3.1.2.- Equipo.....	43
4.7.3.1.3.- Mecanismo.....	44
4.8.- Ventajas de la PCR.....	47
4.9.- Limitantes de la PCR.....	48
4.10.- Control de la tuberculosis.....	49
4.11.- Prevención.....	50
4.12.- Erradicación.....	50
4.13.- Implicaciones en salud pública.....	51
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
5.1.- Localización geográfica de la Comarca Lagunera.....	56
5.2.- Sitio de muestra.....	56
5.3.- Toma de muestras.....	56
5.4.- Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN).....	57
5.4.1.- Protocolo para la extracción del ADN por exudado nasal.....	57
5.5.- La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	58
5.6.- Preparación de corrida para PCR anidada.....	60
5.7.- Electroforesis en gel de Agarosa.....	61
VI.- RESULTADOS.....	63
VII.- DISCUSIÓN.....	66
VIII.- CONCLUSIÓN.....	67
IX.- LITERATURA CITADA.....	68

## ÍNDICE DE CUADROS

1. La situación actual para México según SENASICA, reportando los estados en erradicación y control.....	7
2. Clasificación hecha por Timpe y Runyon de las Micobacterias por velocidad de crecimiento y fotoluminosidad.....	13
3. Micobacterias que son patógenas tanto para el hombre como para los animales.....	14
4. Clasificación de las micobacterias desde el punto de vista clínico según la capacidad de producir patologías en humanos.....	15
5. PCR anidada, concentraciones para la 1ª Reacción con iniciadores externos.....	60
6. Concentraciones para la 2ª Reacción con iniciadores internos.....	60
7. Volumen para la PCR sencilla.....	60
8. Resultados obtenidos de los diferentes tipos de pruebas.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Clasificación de México por estados y regiones según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.....	8
2. Microfotografía electrónica del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	9
3. Representación de la pared celular.....	10
4. Representación de la transmisión.....	21
5. Factores atribuidos a la pared celular del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> que le permite escapar de las defensas del organismo.....	25
6. Consecuencias duales de la activación de los macrófagos.....	26
7. Termociclador ( <i>Mastercycler® gradient thermal cycler</i> ).....	43
8. Desnaturalización del ADN en la PCR. ....	44
9. Alineamiento de los cebadores en la PCR.....	45
10. Extensión de la PCR.....	46
11. Explicación de las copias por cada ciclo.....	46
12. Con las tres etapas juntas y la multiplicación geométrica de los tramos de ADN elegido.....	47
13. Resultados de la PCR, utilizando 6 µl de DNA blanco.....	64
14. Sensibilidad de la PCR de las diluciones del DNA control.....	64
15. Pruebas de PCR sencilla.....	64



**DEDICATORIAS**

**CON CARIÑO**

**A MIS PADRES  
LEOCADIA DÍAZ BECERRA  
LIBRADO ESPINO GARCÍA**

**A MIS HEMANOS  
VÍCTOR, FEDERICO, CESAR,  
FRANCISCO JAVIER Y LIBRADO**

**A LA MUJER MÁS ACHACOSA  
TERESA ELIZABETH FLORES ROMÁN**

**DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (**COECYT**) por haberme otorgado una beca para la realización de esta tesis.

En primer lugar a **DIOS** por darme la vida, su bendición y fuerza para permanecer en el camino correcto y no dejarme doblegar ante ningún problema, gracias por ponerme gente buena en mi camino.

A mis **PADRES** a las dos personas que amo y que nunca me abandonaron en este largo camino, que ante cualquier circunstancia siempre conté con ellos, **Librado Espino García y Leocadia Díaz Becerra**. Hoy, en estos pequeños pero significativos párrafos quiero darle las gracias y decirles que estoy eternamente agradecido por todo lo que me han brindado sin pedir nada a cambio, ¡gracias por ser mis padres!

A mis **HERMANOS: Víctor, Federico, Cesar, Francisco, Librado** por ser mis amigos, estar siempre ahí para escucharme y darme alientos para seguir adelante.

A mi **NOVIA, Teresa Elizabeth Flores Román;** por estar siempre conmigo cuando mas lo necesitaba, por apoyarme en mis decisiones, por el cariño y amor incondicional que me ha dado, ¡gracias achacosa!

A la **Familia, Tenorio Pineda (Doña Ofelia, Ana y Jaime)** muchas gracias por hacerme parte de su familia.

A todas **aquellas personas** que participaron en forma directa en mi largo, difícil pero bendito camino, que me dieron alientos para seguir adelante, **la Familia Díaz Saucedo** (Tía Elvira, Gerardo, Bruno, Mercedes, Mari, David) en especial a mi tío José Díaz que Dios lo tenga en su gloria, a las **Familias, Espino Valdovinos, Espino Villa, Espino Díaz** y a todas aquellas personas allegadas a mi familia que me animaron a seguir adelante.

A la **Familia Flores Román (Ernesto, Cesar, Lesli)** por soportarme estos largos años, gracias por permitirme ser parte de sus vidas, **mamá Aurora**, ¡gracias!

A mis **COMPAÑEROS** de clases y **AMIGOS Rodolfo Mendoza, Jaime Tenorio, Dandriwch Zambrano, David Izazaga, Erick Huerta, Mario García, Octavio Muñoz**, que estuvieron conmigo en esta etapa llena de logros y dificultades que se rieron, lloraron, pelearon pero que sobre todo cosechamos una gran amistad.

A mi **UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO** que dentro y por medio de ella hice realidad un sueño.

A mis **Maestros** por enseñarme, en especial agradezco MVZEP. María Hortensia Cepeda Elizalde, MVZ José Luis Güemes Jiménez, MVZ Silvestre Moreno Avalos, por ayudarme en la revisión de tesis.

Al **Dr Jesús Vázquez Arroyo y Familia**, por ayuda en la realización de esta tesis, por ser antes que mi asesor, un amigo.

Agradezco las facilidades del Centro de Investigaciones Biomédicas (**CIB**) para la realización de mi trabajo experimental, en especial a las personas que me apoyaron **Dr Pablo Ruiz Flores, a la QFB Lea Alonso Rangel, QFB Perla Karina Espino Silva**.

## RESUMEN

En México, la tuberculosis bovina es un problema en el ganado lechero, con una prevalencia del 16 % en establos que no participan en campaña, afecta la producción y la salud pública, el diagnóstico se realiza con la prueba de tuberculina, histopatología y cultivos, según la Norma Oficial Mexicana, así mismo ésta contempla pruebas alternativas entre las que destaca la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En esta investigación se utilizó la técnica de PCR anidada para amplificar la secuencia IS6110 del complejo *M. tuberculosis* a partir de 70 muestras de exudado nasal en reactores positivos y 15 bovinos negativos de tres establos de la Comarca Lagunera. Solamente se analizaron 20 muestras por las técnicas de PCR simple y PCR anidada. De los resultados obtenidos, 10 reactores positivos, resultaron negativos a la PCR anidada, con una sensibilidad de detección del DNA control de  $1 \times 10^{-3}$ , mientras que por la PCR simple, las pruebas estandarizadas resultaron negativas, sin embargo, no fue posible confirmarse por problemas de amplificación del DNA control.

**Palabras claves:** Reacción en Cadena de la Polimerasa, *Mycobacterium bovis*, Tuberculosis bovina, Ácido desoxirribonucleico, Extracción del ADN, Tuberculina.

## ABSTRACT

In Mexico, the bovine tuberculosis is a problem in the dairy cattle production, with prevalence of 16% in stable whitout capagne participate which affects the comercial and the public health, the one diagnoses was carried out with the tuberculin test, histopatological and cultivations, according to the Mexican Norma Oficial, likewise this contemplates alternative tests among those that it highlights the Reaction in Chain of the Polimerasa (PCR). In this study, the nested PCR technique used to amplify the sequence IS6110 of the complex *M. tuberculosis* starting from 70 samples of having perspired nasal in positive reactors and 15 bovine negative in 3 stable at the Comarca Lagunera. Twenty samples were only recorded by the techniques of simple PCR and nested PCR. The result showed that 10 positive reactors out of 20 were negative to the nested PCR, however, the sensibility of detection of the DNA control was  $1 \times 10^3$ , while for the simple PCR the standardized tests were negative, however, they were not possible to be confirmed by problems of amplification of the DNA control.

**Key words:** Polymerase Chain Reaction, *Mycobacterium bovis*, bovine tuberculosis, Deoxyribonucleic Acid, Extraction of the DNA, Tuberculin.

## I.INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB), que es causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) está presente en los animales en la mayoría de los países en vías de desarrollo, donde las actividades de vigilancia y supervisión enzoóticas son inadecuadas o inexistentes (Sechi *et al.*,1999). La TBB es clínicamente indistinguible de la Tuberculosis (TB) (Cosivi *et al.*,1998). Esta enfermedad ha contribuido a crear barreras arancelarias, al impedir la venta, libre comercio de ganado y productos cárnicos implementados por acuerdos de comercio nacionales e internacionales (Sreevatsan *et al.*,2000).

La tuberculosis humana que es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) es la causa que lleva a la muerte en adultos por un solo agente infeccioso, mata alrededor de tres millones de personas cada año a nivel mundial. Se considera que un tercio de la población esta infectada y alrededor de 200 millones están en riesgo de desarrollar la enfermedad en los próximos 20 años de continuar las tendencias actuales. El desarrollo mundial de los medios de transporte y migración contribuyen a globalizar el problema (Mazars *et al.*,2001).

Hasta 1987, la opinión general mantenía que la transmisión de humano a humano de *M. bovis* podría ser un evento muy raro si es que llegara a presentarse. En países donde la tuberculosis del ganado ha sido común, alrededor del 10% de los casos de las tuberculosis clínica en humanos fueron asumidas como debidas a *M. bovis* (O'Reilly y Daborn, 1995).

La TBB es un problema grave en ganado lechero, con una prevalencia del 16 % y tendencia creciente en establos que no participan de la campaña. Varios estudios han demostrado diversidad genética en cepas de *M. bovis* en poblaciones bovinas, con resultados controversiales en cuanto a su origen (Milián-Suazo *et al.*,2004b).

En México, tenemos que reconocer los esfuerzos que realizan los Sistemas Nacionales y Estatales de Salud, gracias a los cuales se ha mantenido bajo control y en constante decremento la TB en México, sin embargo se hace necesario hacer una profunda revisión a la norma oficial mexicana y a los programas de diagnóstico de la tuberculosis bovina (Mariscal-Méndez *et al.*,2005).

El diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis se lleva a cabo por cultivo y examen directo de frotis con tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) o auramina. El cultivo es sensible, pero consume mucho tiempo, dado por el lento crecimiento del complejo de *M. tuberculosis*. La detección microscópica de ZN es rápida en frotis, pero no muy sensible (son necesarias al menos  $10^4$  bacterias) y no es específico para micobacterias patógenas. Por lo tanto, las técnicas de amplificación de Ácido desoxirribonucleico (DNA) se han introducido recientemente para un diagnóstico rápido y sensible de *M. tuberculosis* en especímenes clínicos (Bascuña y Belák., 1996; van der Zanden *et al.*, 1998).

Debido a las limitaciones que presentan los métodos de diagnóstico para tuberculosis actualmente utilizados, existe la necesidad de incorporar nuevos métodos que permitan mejorar la sensibilidad, especificidad y rapidez del diagnóstico. Una alternativa es el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de exudado nasal de bovino, mediante la cual se puede detectar de manera específica en sólo unas horas el DNA del organismo a identificar. De esta manera se obtendrá un diagnóstico específico y temprano en animales en pie, el cual permitirá iniciar acciones fundamentales en los programas de prevención y control de esta enfermedad (Peñuelas-Urquides, 2004).

## II.OBJETIVOS

- ❖ Detectar la presencia de Tuberculosis bovina mediante la técnica de PCR en exudados nasales de bovino.
- ❖ Determinar la sensibilidad y especificidad que tiene la técnica de PCR para detectar el microorganismo de Tuberculosis bovina, en bovinos positivos a la prueba de tuberculina.



### III. HIPÓTESIS

Es posible diagnosticar la tuberculosis bovina a partir de exudados nasales mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

## IV. REVISION DE LIERATURA

### 4.1. Historia de la tuberculosis

Las Micobacterias son agentes de enfermedades infecciosas que han acompañado al hombre a lo largo de su historia. Desde un punto de vista histórico evolutivo (Rodríguez-Cuns.,s/f), existen evidencias que la Tuberculosis (TB), desde el periodo neolítico, ha acompañado al hombre por lo menos durante los últimos 5000 años, según revelan estudios realizados en momias egipcias, mesopotámicas, Incas y del Asia Central. Es probable que en esa época la enfermedad haya sido producida principalmente por *M. bovis* transmitido por el del ganado doméstico, debido a esto se presentó en comunidades nómadas y agrícolas (Araujo y Waard, 2004), pero es a partir de la revolución industrial donde la enfermedad adquiere carácter endémico, debido a una mayor aglomeración de la población en las urbes, lo cual facilitó su diseminación (Rodríguez-Cuns, s/f).

Esqueletos pertenecientes a momias egipcias entre 8000 y 5000 años antes de Cristo, tenían características de lesiones óseas tuberculosas. Los paleontólogos han descrito las deformaciones características de la TB en fósiles de la fauna paleolítica y neolítica, algunos correspondían a animales que habitaban la tierra, antes del advenimiento de la humanidad (González-Montaner y González-Montaner, 1995).

No fue hasta que Robert Khoch médico alemán fundador de la bacteriología científica. Al cabo de centenares de ensayos, tratando con diferentes métodos hizo accesible el bacilo al colorante y lo llamaron el bacilo de Khoch (González-Montaner y González-Montaner, 1995). Fue hasta 1882 que descubrió el bacilo de la TB, que constituyó un impresionante confirmación de los criterios que el había establecido para identificar el agente etiológico de una enfermedad infecciosa (Wolinsky, 1999).

La TB, es la infección más difundida en la humanidad, la más mortal de las infecciones, está en la tierra desde antes que la haya habitado el hombre. Si la raza humana está desde hace 20 o 30,000 años en el planeta es probable que tenga una sobre vivencia de 200.000 años y que haya evolucionado a partir del *Mycobacterium bovis*. De ellos pasó, quizás, al hombre en las cuevas primitivas por consumo de leches infectadas, sufriendo la transformación

evolutiva. El *M. bovis* es una especie más primitiva que el *M. tuberculosis*, ya que tiene una sola copia del trasposoma *IS6110*, que es un elemento muy antiguo y que marca la diferenciación entre estas dos especies. Sugieren también que los casos encontrados antes del año 1.000 a.C comprometen al *M. bovis* como agente patógeno (González-Montaner y González-Montaner, 1995).

Histológicamente se caracteriza por la formación de granulomas. Puede afectar a personas en cualquier etapa de la vida y no hay predilección por un sexo u otro. La prevalencia es más alta en poblaciones pobres con mala higiene y hacinamiento y actualmente es una de las enfermedades asociadas al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Campillo-Paez *et al.*, 2001).

#### **4.2. Normatividad para la tuberculosis bovina**

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995), Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina, Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de Agosto de 1996 y Modificada el 27 de Agosto de 1998, pone de manifiesto que la estrategia para 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; para 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, 2005a). La presente Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto, regular y establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias, técnicas y características para el control y erradicación de la tuberculosis bovina. Su campo de aplicación serán todas las explotaciones pecuarias que manejen bovinos, inclusive para aquellas personas que posean únicamente un animal. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA) y a los gobiernos de los estados en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos (SAGARPA, 1995).

El adecuado sistema de investigación y vigilancia epizootiológica permitirá reducir considerablemente la prevalencia y diseminación de la tuberculosis bovina, mediante la observación y análisis rutinario, tanto de la ocurrencia y distribución de esta enfermedad como de las actividades zosanitarias para su control y erradicación, lo cual permitirá progresivamente áreas en control, en erradicación y libres de tuberculosis (SAGARPA, 1995).

Es importante señalar que en la actualidad la mayoría de los estados de México participan en mayor o menor grado en la campaña nacional, y que en un futuro no lejano podrá conocerse la prevalencia de esta enfermedad incluso a nivel de municipio, cuando se logre conjuntarse toda la información nacional como se observa en el cuadro 1 (Milián-Suazo *et al.*, 2004a).

**Cuadro 1.** La situación actual para México según SENASICA, reportando los estados en erradicación y control.

ERRADIACIÓN	CONTROL	
Sonora	Aguascalientes	Michoacán
Chihuahua	Baja California norte	Morelos
Coahuila	Baja California sur	Nayarit
Nuevo León	Campeche	Oaxaca
Tamaulipas	Colima	Puebla
Yucatán	Chiapas	Querétaro
Quintana Roo	Distrito federal	San Luis Potosí
	Durango	Sinaloa
	Guanajuato	Tabasco
	Guerrero	Tlaxcala
	Hidalgo	Veracruz
	Jalisco	Zacatecas
	México	

(Estrada-Chávez *et al.*, 2004; SENASICA, 2005a)

En el ámbito internacional el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 18 regiones de baja prevalencia (figura 1) en tuberculosis bovina, de las cuales 12 pueden exportar con una sola prueba de tuberculina del lote, 5 con prueba de hato y de lote y 1 región que no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos (SENASICA, 2005a).

**Tuberculosis bovina**  
Clasificación de los Estados o Regiones por el  
Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

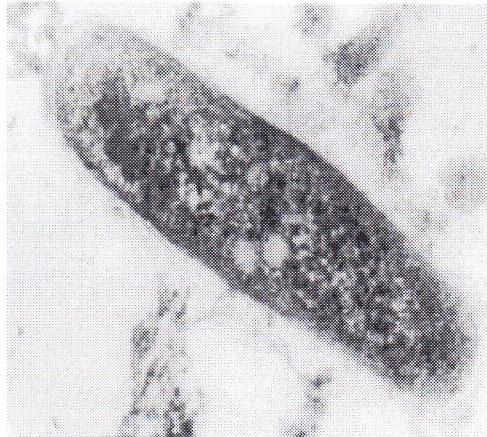


**Figura 1.** Clasificación de México por estados y regiones según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

### 4.3. Características microbiológicas de las micobacterias

El genero *Mycobacterium* incluye varias especies. Existen dos muy similares que son las responsables de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis* que es el bacilo de la tuberculosis humana y *Mycobacterium bovis* que es el bacilo de la tuberculosis bovina). *M. bovis* es patógeno para los mamíferos y en particular para los bovinos. La infección en el hombre por esta micobacteria por lo general es extra pulmonar, siendo mas común en huesos y articulaciones (Tay-Savala, 2003). Las micobacterias son bacilos Gram positivos delgados (0.2 a 0.4 X 2 a 10  $\mu\text{m}$  (Plorde James, 1994). El bacilo tuberculoso obtenido a partir de los animales presentan un aspecto típico de bacilo delgado ligeramente incurvado o curvado y tiene una longitud de 2-4  $\mu\text{m}$  y de 0.2-0.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Wolinsky, 1999), en forma de masa, inmóviles, no esporulados (Figura 2) (Rodríguez-Cuns, s/f), son relativamente impermeables a diversos colorantes básicos, pero una vez teñidos conservan los colorantes de forma persistente. Resisten la decoloración con disolventes orgánicos acidificados, y de ahí que reciban el nombre de acidorresistentes (Wolinsky, 1999). Esta propiedad y su crecimiento relativamente lento son debidos a la presencia de una pared celular rica en lípidos (Wolinsky, 1999), con una estructura que lleva el 20-60% de lípidos. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunos son aerobios y otros microaerófilos. El contenido de bases de guanina - citosina en la molécula de ADN es de 62 a 70

% molar. El género comprende 50 especies, entre ellas patógenos primarios, oportunistas y saprofitas (Rodríguez-Cuns, s/f).



**Figura 2.** Microfotografía electrónica del *Mycobacterium tuberculosis*.

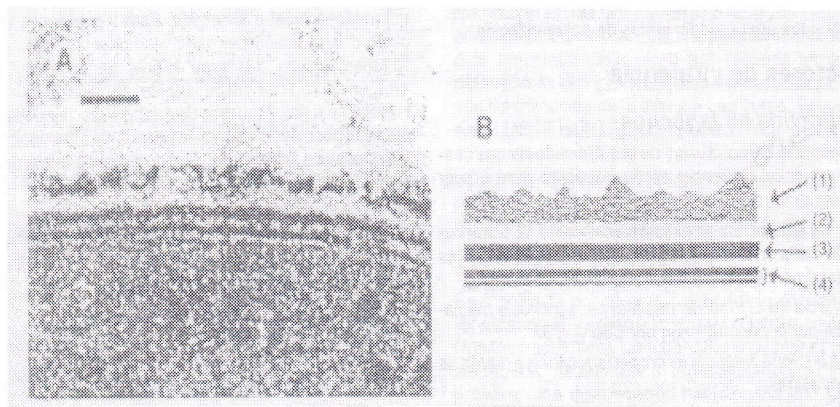
*Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*. Como todas las células procariotas, las Mycobacterias poseen un citoplasma, la membrana celular y un espacio periplásmico que lo separa de una gruesa y compleja pared celular (Figura 3). La pared celular está constituida por tres capas. Con tinciones convencionales su apariencia es:

Capa interna moderadamente electrón-densa, compuesta por el peptidoglican cuya estructura es similar a la de otras bacterias (Figura 3);

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 Mycobacterias (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.

La membrana plasmática de las Mycobacterias aparece en cortes ultra finos como una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, dos capas electrón-densas separadas por una capa transparente. Sin embargo, tiene como característico la presencia de moléculas de lipopolisacáridos, lipoarabinomananos (LAM), lipomonanos y fosfatidil-inositol-manósidos (Rodríguez-Cuns, s/f).



**Figura 3.** Representación de la pared celular.

- (1) capa externa
- (2) capa electrón-transparente
- (3) capa electrón-densa
- (4) membrana plasmática

#### 4.4. Clasificación y taxonomía de las micobacterias

Los estudios de anatomía comparada del siglo XVII y XVIII integraron el conocimiento comprendido de la forma, estructura y organización de los organismos. En la era de Linneo, la sistemática tenía un enorme prestigio y dominaba todas las investigaciones contemporáneas. Linneo y sus colaboradores creían que los géneros y taxonomía superiores era creación de Dios y por lo tanto su sistemática representaba un sistema natural. Esta se basó en propiedades esenciales y originadas por un pensamiento creativo en ausencia de teoría evolucionista (Drews, 2000).

Ferdinan Cohn (1828-1898), enfatizaba que en el campo de la sistemática bacteriológica, tenía que iniciar de un punto cero. Sus trabajos taxonómicos estuvieron basados en el excelente conocimiento de las algas unicelulares, hongos inferiores, protozoarios y bacterias. Él notó que la organización celular y otros detalles estructurales de bacterias no podrían resolverse, aún cuando las bacterias pudieran observarse con el mejor microscopio. Únicamente unas pocas características fueron suficientes para la clasificación y no se conocía si éstas eran estables u específicas a la especie o variaciones causadas por el medio ambiente. La reproducción sexual de bacterias fue desconocida (Drews, 2000).

El aislamiento de células sencillas y la técnica de cultivo fue lentamente desarrollada, del cultivo en medios sólidos y medios enriquecidos. El crecimiento de bacterias que desarrollan color sobre alimentos que contenían

almidón fueron descritas por Hoffmann. La separación bacteriana por el método de estriado de bacterias sobre gelatina solidificada fue introducida por Robert Koch en 1877, así como el uso de placas de gelatina por Koch y Esmarch. Frankland (1886) y Petri (1887), desarrollaron una pequeña cámara de cultivo práctica, la caja Petri, para mantener cultivos libres de contaminación ambiental a través del aire. La introducción del agar como medio solidificante, mejoró el aislamiento y cultivo bacteriano, dado que el agar es inerte para la mayoría de las bacterias y permanece sólido aun a 37 °C, la temperatura a la que la mayoría de las bacterias fueron cultivadas (Drews, 2000).

Un logro importante de Cohn fue el concepto de especie, fundado sobre la hipótesis de que las poblaciones específicas de diferente especie tienen diversas características heredables en común, las cuales las hace diferentes de otras especies. El concepto de bacteria como un grupo independiente de microorganismos con diferentes características heredables y su relación con Schizophyceae (cianobacterias) fueron confirmados y extendidos por R. Stanier y C.B. Van Niel, quienes propusieron el término de organización celular Procariota, la cual difiere de la Eucariota. La fructificación del concepto fue rápidamente aceptado por la comunidad científica y finalmente ampliado por el descubrimiento de las archaeobacterias como un grupo independiente distinto de eubacterias y cianobacterias (Drews, 2000).

La clasificación filogenética será el objetivo final de la sistemática, aunque actualmente no hay un acuerdo general acerca de los conceptos de *dominio* propuesta por Woese (Bacteria, Archaea y Eucaria), la clasificación de los cinco reinos de Margulis (Procariotas [Monera], Eucariotas [Plantas, Animales, Hongos, Protistas], o la división de procariotas en monodermata que tienen una membrana celular única (gram positivas) y Didermata que tienen una membrana celular doble (gram negativas) (Drews, 2000).

Por otra parte, perspectivas sobre la diversidad microbiana han mejorado enormemente en las últimas décadas, en parte esto se ha debido a los estudios moleculares filogenéticos que objetivamente relaciona los organismos. Los árboles basados en la secuencia de los genes son mapas que articulan el concepto total de biodiversidad. Así, los análisis comparativos de las pequeñas subunidades rRNA (16S o 18S) y otras secuencias de genes demostrando que la vida se encuentra organizada en tres principales dominios, bacteria, archaea y eucaria (Hugenholtz *et al.*, 1998).



Por tanto, la clasificación sistemática para las micobacterias es como sigue:

Dominio: *Bacteria*.

Phyllum: *Actinobacteria*.

Clase: *Actinobacteria*.

Subclase: *Actinobacteridae*.

Orden: *Actinomycetales*.

Suborden: *Corynebacterineae*.

Familia: *Mycobacteriaceae*.

Genero: *Microbacterium*.

Especie: *Mycobacterium bovis*. (Prescott *et al.*, 2002).

En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil de *Mycobacterium* en cuatro grupos que se basaba en la velocidad de crecimiento, como se muestra en el cuadro 2, (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. En la siguiente tabla se presenta una clasificación modificada de la original de Runyon que incluye los miembros del género *Mycobacterium* de importancia (Rodríguez-Cuns, s/f).

**Cuadro 2.** Clasificación hecha por Timpe y Runyon de las Micobacterias por velocidad de crecimiento y fotoluminosis.

Grupos y subgrupos	Especies de Micobacterias	Patología
I. Fotocromógenos de crecimiento lento.	<i>M. Kansasii</i> ( <i>M.licopenogenos</i> ) <i>M. asiaticum</i> .	Pulmonar, ganglionar, meníngea, osteoarticular, urogenital, generalizada.
II. Escotocromógenos de crecimiento lento. a b c	<i>M. lacticus</i> . <i>M. scrofulceum</i> ( <i>M. Marinum</i> ) <i>M. gordomae</i> ( <i>M. Aquae</i> ) <i>M. flavescens</i>  <i>M. ssulgai</i> <i>M. ulceraus</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. simiae</i>	Ganglionar, pulmonar, osteoarticular.  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. novium</i> ) <i>M. triviale</i> <i>M. aemophihum</i> <i>M. shimodei</i>	Pulmonar, renal, osteoarticular, meníngea, intestinal, ganglionar, cutánea, etc. Cutánea, ganglionar, generalizada. Ganglionar, pulmonar, generalizada, osteoarticular.  Pulmonar.
IV. Fotocromógenos de crecimiento rápido.	<i>M. marinum</i> ( <i>M. balnei</i> )	Cutánea, articular.
V. Escotocromógenos de crecimiento rápido. a b c	<i>M. engbaekii</i> <i>M. acapulcense</i> <i>M. aurum</i> <i>M. gilvium</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. gadium</i> <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. chelonei</i> <i>M. chitae</i>	Cutánea, pulmonar, osteoarticular, ocular, Cut. pulm. osteoarticul. ocul. y menín.

(Rodríguez-Cuns, s/f).

Pero Quinn *et al* (2002) se propusieron ir más en concreto con el estudio de las especies de Micobacterias que afectaban tanto al hombre como a los animales, mencionando la enfermedad que produce, huésped principal y especies infectadas ocasionalmente (Cuadro 3) (Quinn *et al.*,2002).

**Cuadro 3.** Micobacterias que son patógenas tanto para el hombre como para los animales.

<b>Especies de Micobacterias</b>	<b>Huésped principal</b>	<b>Especies infectadas ocasionalmente</b>	<b>Enfermedad</b>
<i>M. tuberculosis</i>	Hombre, primates cautivos	Perros, vacas, canarios,	Tuberculosis (mundialmente)
<i>M. bovis</i>	Vacas	Ciervo, tejon, hombre, gato y otras especies de mamíferos.	Tuberculosis
<i>M. africanum</i>	hombre		TB (regional en África)
<i>M. avium complejo</i>	La mayoría de las aves excepto las sitacitas	Puercos, vacas	TB
<i>M. microti</i>	Ratas de agua	Ocasionalmente otras especies de mamíferos.	TB.
<i>M. marinum</i>	Pescado.	Hombre, mamíferos acuáticos, anfibios.	TB.
<i>M. leprae</i>	Hombre.	Armadillos y chimpancé.	Lepra.
<i>M. lepraemurium</i>	Ratas y ratones.	Gatos.	Lepra de ratas y Lepra de gatos.
<i>M. avium Subs. paraTB.</i>	Vacas, oveja, cabra y ciervo.	Otros rumiantes.	ParaTB (Enfermedad de Johne´s)
<i>Bacterias inespecíficas ácido-resistentes.</i>	Vacas.		Asociada con TB cutánea.
<i>M. senegalense, M. farcinogenes.</i>	Vacas.		Implicado en bovinos

(Quinn *et al*, 2002)

Desde el punto de vista clínico Mar-Casal et al, hace otra clasificación de las micobacterias las clasifica como patógenos estrictos, normalmente también llamados de Grupo de Riesgo III, con alto riesgo de transmisión por el aire (Cuadro 4). La enfermedad suele ser grave para el individuo y a veces fatal y de riesgo variable para la comunidad. Otro grupo de micobacterias se consideraran como patógenos oportunistas, que son patógenos potenciales con riesgo individual moderado y de variable gravedad para la comunidad. A su vez estas micobacterias que se encuadran dentro del Grupo de Riesgo II se consideran como oportunistas mayores u oportunistas menores según la mayor o menos frecuencia en que ocasionan patologías al hombre (Mar-Casal y Casal, 2000).

Por ultimo el tercer gran grupo que seria el Grupo de Riesgo I ubica mycobacterias que nunca o excepcionalmente han sido descritas como causantes de patología en adultos normales. Estas especies se denominan también como saprofitas (Mar-Casal y Casal, 2000).

**Cuadro 4.** Clasificación de las micobacterias desde el punto de vista clínico según la capacidad de producir patologías en humanos.

Grupo	Patógenos	Oportunistas mayores (4)	Oportunistas menores (5)	saprofitas
I		M. kansasii	M. intermedium M. buckleli M. asiaticum	
II		M. scrofulaceum M. szulgai M. xenopi M. simiae M. ulcerans	M. gordonae M. lentiflavum M. interjectum M. bohemicum M. tusciae	M. flavescens
III	M. tuberculosis M. africanum M. bovis M. canetti	M. avium M. intracellulare M. malmonense M. haemophilum M. shimodei	M. bovis BCG M. celatum M. genavense M. braderi M. conspicum M. heidelbergense	M. grastri M. terrae M. triviale M. nonchromogenicum
IV		M. marinum	M. novocastrense	
V			M. godoi M. wolinski M. smegmatis	M. acapulcense M. aurum M. confluentis M. duvalii M. gadium M. hasiaticum M. gilvum M. phlei M. vaccae
VI			M. fortuitum M. chelonae M. mucogenicum M. septicum M. immunogen	

(Mar-Casal y Casal, 2000)

El género *Mycobacterium* comprende más de 70 especies. Muchas especies de micobacterias se encuentran en el medio ambiente y raramente están asociadas con enfermedades con animales o humanos. Un número de especies de micobacterias son patógenas para animales y humanos (FSAI., 2003).

El complejo *M. TB* está compuesto de cuatro especies, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*. (Feizabadi *et al.*,1996) y actualmente se incluyen las especies *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *bacillus dassie* (Mostowy *et al.*,2005).

El género *Mycobacterium* tiene un gen antigénico específico 65-kDa que puede ser amplificado de *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. Paratuberculosis* (Jae-Hoon *et al.*,2002).

*M. Tuberculosis* y *M. bovis* son considerados patógenos importantes para humanos (Caimi *et al.*,2001). El resto de las micobacterias han recibido como grupo diversas denominaciones, basándose en las características principales de las especies de este grupo como son: a) no ser patógenas primarias en condiciones habituales; b) hallarse distribuidas por diversos ecosistemas, y c) en ocasiones ser capaces de que las personas desarrollen la enfermedad cuando tienen inmunodeficiencia, comportándose entonces como micobacterias oportunistas (Ruiz-Manzano *et al.*,1998).

La european society for micobacteriology en su *Manual of Diagnostic y Public Health Mycobacteriology* de 1991 las denomina "micobacterias oportunistas". Este nombre remarca la menor virulencia para las personas y su capacidad patógena oportunista en sujetos con inmunodeficiencias. Pero todas las micobacterias incluidas *M. TB* y *M. leprae* (patógenos primarios) actúan en parte como oportunistas ya que no siempre producen enfermedades clínicas. Además, algunas especies de micobacterias ambientales no se consideran oportunistas, porque hasta el presente no han causado el desarrollo de la enfermedad (*M. chlorophenicum*, *M. brumae*, etc.) (Ruiz-Manzano *et al.*,1998).

## 4.5. Tuberculosis bovina

### 4.5.1. Definición

La Tuberculosis bovina, es la enfermedad infecciosa, generalmente crónica, causada por el *Mycobacterium bovis* que se encuentra dentro del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *dassie bacilli*), que se transmite del enfermo al sujeto sano por inhalación de material infectante, ingestión de leche de vaca infectada por dicho complejo, contacto con personas enfermas bacilíferas o animales bovinos enfermos (SSA, 1995).

La *Tuberculosis bovina* es un tipo de enfermedad que puede afectar tanto a los humanos como a los animales (ganado, venados y cerdos), que es muy parecido al agente que comúnmente causa la TB en humanos, produciendo síntomas similares (Bontá, 2004). A pesar de que el bacilo tuberculoso bovino y humano puede ser diferenciado por su rango de hospederos, las bases genéticas de su virulencia y características fisiológicas para esta diferencia se desconocen (Garnier *et al.*, 2003).

La TB es primeramente una enfermedad del aparato respiratorio que se transmite en diversas especies de mamíferos principalmente por vía aérea (Lopez-Artuñano, 1997). La tuberculosis bovina es una de las infecciones más importantes en el ganado bovino. Es ampliamente conocida como una enfermedad crónica, por sus efectos sobre la producción animal y salud pública (Kantor y Alvarez, 1991). Se caracteriza por un período 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 y Lazo-Amador, 2001).

La TB es causada por *Mycobacterium spp.* siendo una enfermedad crónica progresiva, reportada en aves y varias especies mamíferas como humanos, bovino, cerdos y ocasionalmente carnívoros. Es sabido que *M. bovis* causa TB en humanos transmitiéndose a través de la leche y productos lácteos (Jae-Hoon *et al.*, 2002).

El *M. bovis* es un bacilo Gram positivo con potencial zoonótico que esta relacionado genéticamente a *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis humana (TB). A pesar de que el bacilo tuberculoso bovino y humano puede ser diferenciado por su rango de hospederos, las bases genéticas de su virulencia y características fisiológicas para esta diferencia se desconocen (Garnier *et al.*,2003).

La tuberculosis bovina se clasifica como una enfermedad de la lista B por la Office International des Epizooties (OIE) (Wedlock *et al.*,2002), lo que quiere decir que está considerada una enfermedad importante por sus repercusiones socioeconómicas o de salud pública dentro de los países y también por su incidencia en el comercio internacional de animales o productos de origen animal (Cousins, 2001).

#### **4.5.2. Etiología de la tuberculosis bovina**

El agente causal de la tuberculosis bovina es *Mycobacterium bovis*, que se caracteriza por producir una enfermedad crónica progresiva con el desarrollo de tubérculos en muchos tejidos, sobre todo en pulmón y nódulos linfáticos (Scanlon y Quinn, 2000), siendo un miembro del complejo de *M. tuberculosis* (Wedlock *et al.*,2000), *M. bovis* no solo causa la tuberculosis bovina en el ganado, también es muy virulento para el hombre (Wolinsky, 1999), así como cabras, búfalos asiáticos, camellos, llamas, primates no humanos (Badillo-Rosales, 2004).

#### **4.5.3. Prevalencia**

Hace más de un siglo, Robert Koch identificó que la causa de la TB es *Mycobacterium tuberculosis*. En aquel momento la enfermedad proliferaba, y causaba 1/7 de todas las muertes en Europa, 1/3 de las muertes en los adultos jóvenes en edad productiva. En la actualidad, la TB continúa siendo un problema de salud universal de dimensiones descomunales. Se calcula que en el mundo esta infectado el 20% de la población mundial, con 10 millones de casos nuevos y mas de 3 millones de muertes anuales (Prescott *et al.*,2002) por lo que lo convierte a este bacilo en la causa infecciosa de muerte más importante en el mundo (Ramzis Cotran *et al.*,2000).

Las enfermedades bacterianas de relevancia nacional por ser de campaña, como en el caso de TBB muestran una promedio de prevalencia alta en México con un gran número de registros que involucra a varios estados (Milián-Suazo *et al.*,2004a). Dentro del contexto de México, el comportamiento de la TB 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; para el año 2001, 15,269 casos; para el año 2002, 14,310 casos, en el año 2003, 14,852 y para el 2004, 13,392, y los estados de Baja California, Chiapas, Nuevo León y Veracruz, como aquellos con las mayores aportaciones (Mariscal-Méndez *et al.*,2005). La TBB es un problema grave en ganado lechero, con una prevalencia del 16 % y tendencia creciente en establos que no participan de la campaña. Varios estudios han demostrado diversidad genética en cepas de *M. bovis* en poblaciones bovinas, con resultados controversiales en cuanto a su origen. Algunos dicen que ésta se debe a la alta tasa de mutaciones no letales de las micobacterias por el tipo de reproducción clonal que manifiestan, otros, que se debe a la indiscriminada movilización de animales entre explotaciones. Milián-Suazo *et al.* 2004 basan su hipótesis en el hecho de que en un análisis discriminante de *M. bovis* encontraron un índice de asociación de  $1.13 \pm 0.14$ , muy parecido al de otras bacterias de reconocida reproducción clonal, y en que a través de un cuestionario a productores se encontró que menos del 5 % de las explotaciones lecheras encuestadas (n=76) en diferentes regiones de México, venden o compran animales de otras explotaciones lecheras, lo que hace poco probable la mezcla de animales. Perumaalla *et al.* (2000) por su parte, aseveran que en un estudio en una sola explotación lechera se encontró la misma cepa de *M. bovis* después de 10 años, estudio que no coincide con los resultados de otros (Milián-Suazo *et al.*,2004b).

#### **4.5.4. Transmisión**

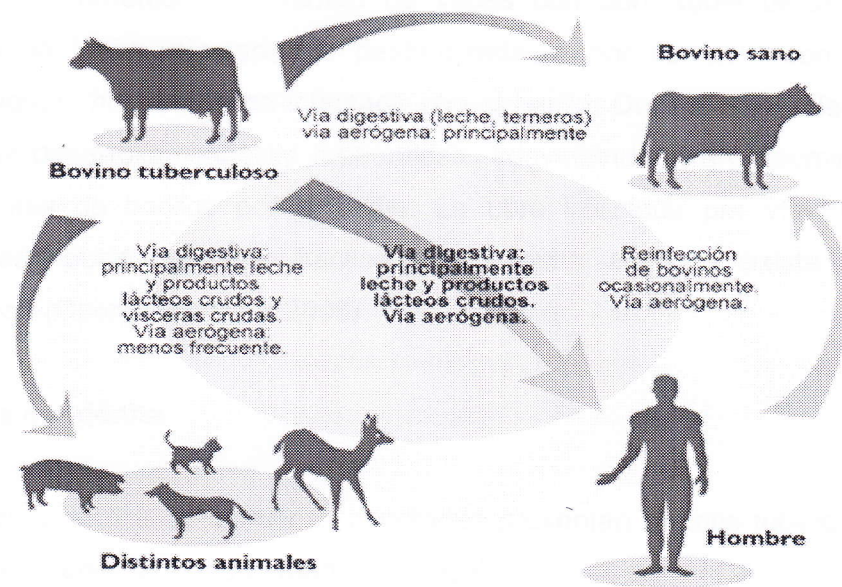
*Mycobacterium bovis* es una enfermedad rara en humanos en países industrializados, probablemente por la pasterización de la leche y los programas de erradicación en vacas, los humanos son infectados de *M. bovis* por consumir productos derivados de la leche contaminada, por muchos años



se creía que la transmisión de humano a humano ocurría por vía aérea, ya que era difícil demostrar su transmisión, pero recientemente, al obtener el DNA se han proporcionado nuevas evidencias, al realizar el estudio del paciente con los avances de la genética se ha logrado identificar el agente causal y saber de donde proviene (LoBue *et al.*,2004). Sin embargo Senado Dumoy comenta en su investigación que la enfermedad se trasmite de persona a persona. La fuente más importante y habitual de contagio son las personas con lesiones activas o en comunicación con las vías aéreas (cavernas abiertas), es decir, con TB Pulmonar, quienes al estornudar, toser, hablar o expectorar, eliminan y dispersan partículas de secreciones respiratorias que vehiculizan al bacilo tuberculosos (gotas de *flugge*) que quedan suspendidas hasta varias horas, en su forma viable y son inhaladas por otras personas. Un enfermo puede infectar un promedio de 10-15 personas sanas (Senado-Dumoy, 1999). Los animales susceptibles normalmente adquieren la infección con el *M. bovis* por la ruta respiratoria, ocasionalmente la infección se transmite por vía oral, en la fase de tubérculo o de otras excreciones puede durar mucho tiempo en las fosas de depósitos de desechos o expuesto en la tierra (Scanlon y Quinn, 2000), por otro lado, la supervivencia prolongada de bacterias patógenas aumenta el riesgo de que los animales adquieran la infección de las fuentes medioambientales (Figura 4). Este patógeno también pueden infectar otros animales domésticos y especies de la fauna como los tejones, Alce, Bisonte, Búfalo, el ciervo que pueden servir como los organizadores del depósito para el *M. bovis* con la posible diseminación al ganado Bovino (Scanlon y Quinn, 2000). Los animales enfermos constituyen la principal fuente de transmisión de la enfermedad dentro de un establo. El microorganismo es eliminado del hospedador a través del aire que exhalan y también por las excreciones y secreciones. La inhalación es la principal vía de entrada de la bacteria y para los terneros, la leche infectada es también una importante fuente de infección, así como, en los comederos donde los animales ingieren alimento. Una vez producida la infección, el microorganismo se distribuye a través de:

a) un complejo primario de infección (lesión en el punto de entrada y del linfonódulo local) y,

b) una diseminación a partir del complejo primario de infección (FAO, 2005).



**Figura 4.** Representación de la transmisión.

### Vía respiratoria

Se ha demostrado que 30% de las vacas tuberculosas expulsan *M. bovis* a través del tracto respiratorio (Díaz-Otero Fernando *et al.*, 2003). Pero del 80% al 90% de los casos la transmisión ocurre por vía aerógena; con la tos o espiración de un animal infectado se expelen gran cantidad de microgotitas que contienen la bacteria, las cuales al ser inhaladas por otro bovino llegan al sistema respiratorio dando comienzo a una nueva infección. Esto se ve favorecido por contacto directo diariamente de los bovinos en el pastoreo, comederos, corrales y salas de ordeño. La vía digestiva es muy importante en terneros que se alimentan con leche cruda proveniente de las vacas enfermas, debido a que del 1% al 2% de las vacas infectadas eliminan el microorganismo en la leche. Otras vías no usuales pero probables son: la vía cutánea, congénita y genital (Milena-Baron, 2005).

### Vía digestiva

El bacilo de la tuberculosis bovina es sensible al calor y acidéz gástrica, por lo que se hace excepcional la infección por vía digestiva (Senado-Dumoy, 1999). Del 10 al 20% de los casos ocurren por esta vía. La transmisión se

presenta en terneros que maman de vacas con ubre tuberculosa, por la ingestión de leche infectada no pasteurizada, y por contacto con suelos, pastos, aguas, heces u orina infectada con el bacilo. De 1 a 3% de las vacas infectadas desarrollan mastitis tuberculosa, convirtiéndose en diseminadoras permanentes de bacilos por la leche. La ubre infectada por vía hemática (sanguínea) puede eliminar bacilos en la leche sin que exista mastitis tuberculosa (Osorio-Martínez, 2005).

#### **Vía congénita**

Cerca de 5% de las vacas infectadas presentan metritis tuberculosa, y 50% de ellas abortan (Osorio-Martínez, 2005).

#### **Vía genital**

Los toros se infectan montando vacas con metritis tuberculosa, la transmisión más importante se produce por medio de la inseminación artificial, al utilizar semen de toros infectados (Osorio-Martínez, 2005).

#### **Vía cutánea**

Por introducción del bacilo en lesiones de piel con material infectado (Osorio-Martínez, 2005).

#### **4.5.5. Patógenia**

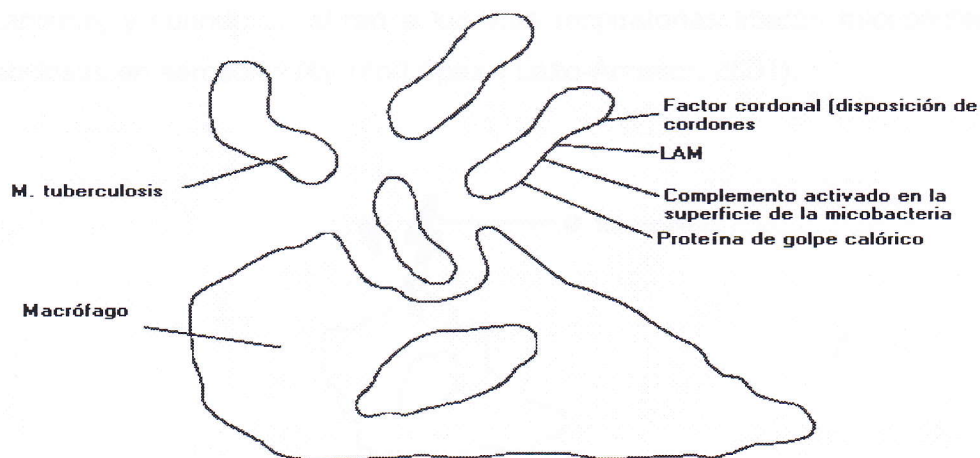
Factores de manejo, edad y nutrición son determinantes en la vía de infección, así como en el periodo de incubación, proceso de la enfermedad y diseminación. A partir de la puerta de entrada los bacilos se localizan en el complejo primario de los nodulos linfáticos regionales, luego se diseminan por vía linfática a la cadena ganglionar. Posteriormente la diseminación se da por vía hematológica a órganos parenquimatosos por ultimo el microorganismo es eliminado en exudados y secreciones de órganos infectados. La eliminación de *Mycobacterium bovis* por parte de los animales infectados es intermitente y no esta en relación con el grado de infección presente. Se ha comprobado que los

animales infectados recientemente eliminan el microorganismo en las etapas tempranas de la enfermedad cuando a veces no son detectadas por pruebas diagnósticas (Milena-Baron, 2005).

El bacilo tuberculoso no elabora endotoxinas ni exotoxinas, en su lugar, la enfermedad en sí y la destrucción de los tejidos son ocasionadas por productos que elabora el huésped durante la respuesta inmunitaria a la infección. Cuando el *Mycobacterium tuberculosis* consigue llegar al alvéolo pulmonar, se produce una ligera reacción inflamatoria en la que predominan los glóbulos blancos polimorfonucleares. Estas células son rápidamente sustituidas por macrófagos alveolares. Cuando 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 *Mycobacterium tuberculosis* que le permite a éste escapar de la destrucción inducida por las defensas del organismo. En primer lugar, está el factor cordonal, un glucolípido de superficie que hace que el *Mycobacterium tuberculosis* 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. En segundo lugar, el lipoarabinomano (LAM), un heteropolisacárido principal con estructura similar a la de la endotoxina de las bacterias gramnegativas, inhibe la activación de los macrófagos por el interferón-g. El LAM también hace que los macrófagos secreten el (TNF-a), que causa fiebre, pérdida de peso y lesión tisular, y la IL-10, que suprime la proliferación de las células T inducida por las micobacterias. 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. En cuarto lugar, presenta una proteína llamada proteína de golpe de calor del *Mycobacterium tuberculosis* que es

intensamente inmunogénica y puede desempeñar un papel importante en las reacciones autoinmunitarias inducidas por el *Mycobacterium tuberculosis*, el cual reside en los fagosomas, que no son acidificados en los lisosomas. 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. De esta manera se establece una lucha complicada entre el huésped y el parásito. Entre los adultos sanos el huésped triunfa en el 95 % de los casos. Sin embargo, es típico que este encuentro inicial se extienda durante semanas o meses, y en este tiempo, la población de bacilos prolifera de manera masiva y se disemina. Después de algunas semanas aparece la inmunidad mediada por células T, demostrable por ser positiva la prueba cutánea con derivado proteico purificado (PPD). Las células T activadas por las micobacterias interactúan con los macrófagos en 3 formas: primero, las células T colaboradoras CD4+ secretan interferón- $\gamma$ , que activa a los macrófagos para producir una destrucción intracelular de las micobacterias a través de intermedios nitrogenados como NO, NO<sub>2</sub> y HNO<sub>3</sub>. Segundo, las células T supresoras CD8+ destruyen los macrófagos infectados por las micobacterias y así destruyen 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 vivifican a través de interacciones complejas que incluyen a los fagocitos mononucleares y distintos subgrupos de células T. En consecuencia, aparecen macrófagos más competentes que inhiben la multiplicación intracelular de las bacterias al fragmentarse los macrófagos que facilitan la multiplicación bacilar, engloban a las micobacterias y limitan su crecimiento. 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 epitelioides, que tienen 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 epitelioides segregan una sustancia estimuladora de los fibroblastos que produce colágeno y contribuye a

limitar la periferia del granuloma mediante un área de fibrosis. La toxicidad directa de las micobacterias sobre los macrófagos también puede contribuir a la aparición de los centros necróticos. Las micobacterias no son capaces de crecer en este medio extracelular ácido carente de oxígeno, con lo que la infección queda controlada. El residuo final de la infección primaria es una cicatriz calcificada en el parénquima pulmonar y en el ganglio linfático hiliar, conjunto denominado complejo de Ghon (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).

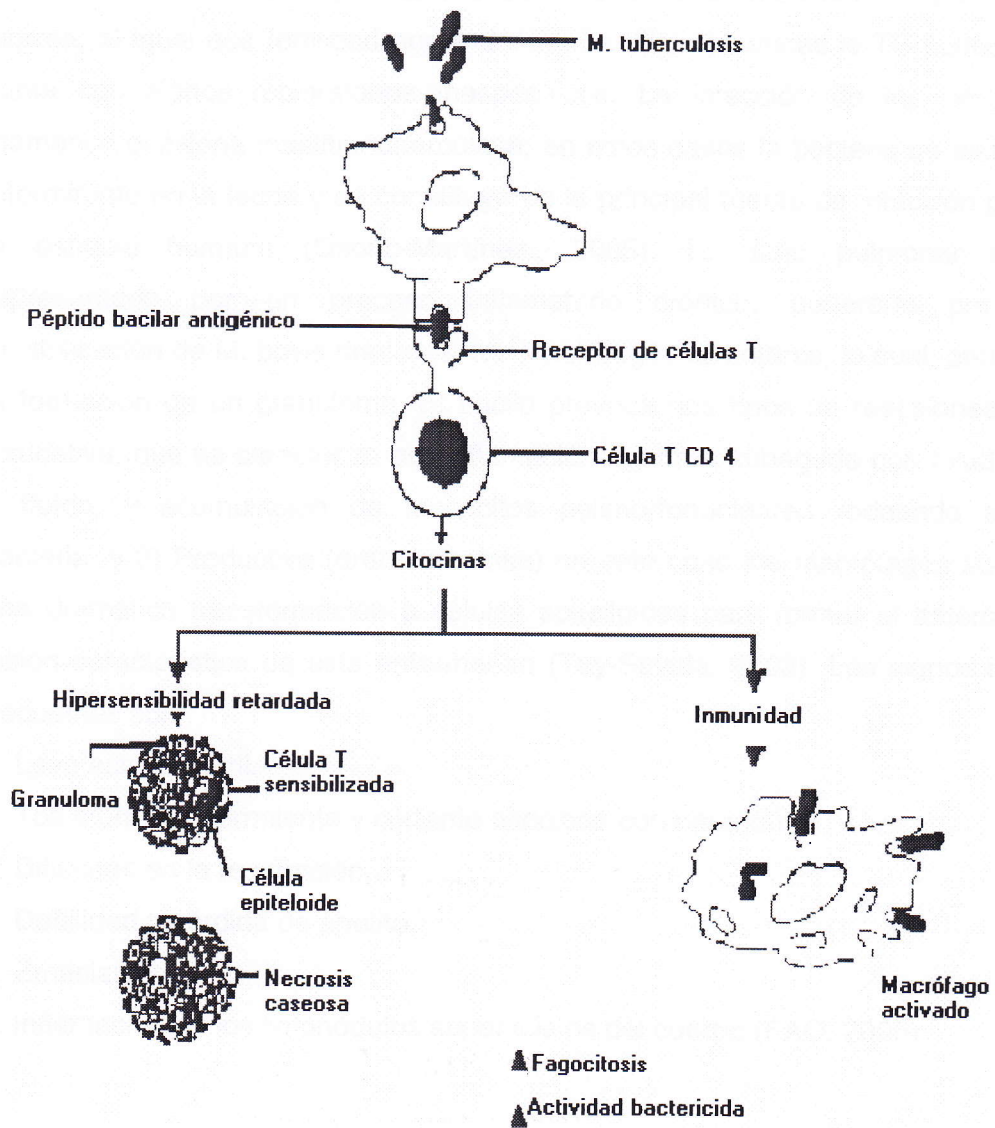


FACTORES.	EFFECTOS
Factor cordonal	Inhibe la migración de leucocitos. Provoca la aparición de granulomas.
Lipoarabinomano (LAM)	Inhibe la activación de macrófagos por interferón- $\gamma$ . Hace que los macrófagos secreten: TNF- $\alpha$ pérdida de peso, lesión tisular y fiebre. I1-10 suprime proliferación de células T.
Complemento activado en la superficie de la micobacteria.	Facilita su opsonización por lo que: Aumenta resistencia microbiana Dificulta quimioterapia.
Proteína de golpe de calor.	Reacciones autoinmunes.

**Figura 5.** Factores atribuidos a la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis* que le permite escapar de las defensas del organismo.

Se conocen 2 formas de infección tuberculosa: La primaria que corresponde a la infección inicial por el bacilo, la que se ha explicado anteriormente, y la secundaria 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 TB 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 mycobacteria, son la causa principal de la lesión tisular en la TB y reflejan una hipersensibilidad de tipo retardada. Dos rasgos característicos de la TB 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 abren a las vías respiratorias liberan micobacterias infecciosas en aerosoles (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).



**Figura 6.** Consecuencias duales de la activación de los macrófagos.

#### 4.5.6. Síntomas y signos clínicos

Los síntomas son poco manifiestos en el bovino, pero en algunos puede presentarse. La vía de ingreso del *M. bovis* y la localización de la lesión están íntimamente relacionadas con esta enfermedad (Milena-Baron, 2005).

La TBB, la mayoría de las veces tiene un curso crónico. Los síntomas son tan variados como los órganos y sistemas afectados. Como en cualquier enfermedad crónica, la pérdida progresiva de peso y la reducción en la producción de leche o carne son constantes, pero inespecíficas. Con alguna frecuencia se observa una tumefacción no dolorosa de los nódulos esplórales clínicamente; cuando hay una infección hepática o intestinal se presenta diarrea, al igual que fertilidad por endometritis. Algunas veces la TB pulmonar cursa con signos respiratorios inespecíficos. La infección de los nódulos mamarios ocasiona mastitis tuberculosa; en estos casos la bacteria se elimina intermitente en la leche y se constituye en la principal fuente de infección para la especie humana (Osorio-Martínez., 2005). El daño pulmonar esta representado por un proceso inflamatorio crónico, generado por la multiplicación de *M. bovis* dentro de los macrófagos alveolares, lo cual, permite la formación de un granuloma. El bacilo provoca dos tipos de reacciones: 1) Exudativa, que se caracteriza por inflamación aguda o subaguda con exudado o fluido, y acumulación de leucocitos polimorfonucleares rodeando a la bacteria, y 2) Productiva (granulomatosa) en este caso los macrófagos sufren una dramática transformación a células epitelioides para formar el tubérculo, lesión característica de esta enfermedad (Tay-Savala, 2003). Los signos mas frecuentes son:

1. Leve estado febril.
2. Tos crónica, intermitente y cortante asociada con neumonía
3. Dificultad en la respiración.
4. Debilidad y pérdida de apetito.
5. Emaciación.
6. Inflamación de los linfonódulos superficiales del cuerpo (FAO, 2005).



#### 4.5.7. Lesiones de la tuberculosis bovina

Las lesiones aparecen generalmente como nódulos firmes, en color blanco amarillento, y son con frecuencia muy pequeñas. 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 pueden curar totalmente. Se han reportado en la mayoría de 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, son extremadamente pequeñas de tamaño (diámetro <1 cm) y por lo tanto son a menudo difícil de encontrar. Las lesiones tuberculosas se encuentran con mas frecuencia posible en los nodulos linfáticos bronquiales y/o del mediastino; los nódulos linfáticos de la región principal son el segundo sitio frecuente y en muchas de los casos son en los nódulos retrofaringeos y submaxilares. Investigaciones más recientes han revelado la implicación de los tejidos finos como tonsilas (Diegel *et al.*,2002; Neill *et al.*,2005).

##### 4.5.7.1. Lesiones Macroscópicas

Las lesiones pueden variar dependiendo de la localización anatómica y la forma de diseminación de tubérculos (Milena-Baron, 2005). Generalmente el hallazgo pulmonar es en áreas de tamaño considerable con apariencia caseificada y zonas de mineralización. En las superficies serosas incluyendo las cápsulas de los órganos como pulmón, hígado, bazo, riñones, se observan nódulos firmes de superficie lisa, varían de 2 a 10 centímetros de diámetro. También pueden presentarse zonas caseificadas en las áreas profundas (TB perlada), nódulos firmes de aspecto gránulomatoso con áreas de calcificación caseificación en ganglios linfáticos y órganos parenquimatosos como el hígado y el riñón.

Otra de las características que se presenta es un exudado de apariencia purulenta en meninges.

Focos muy pequeños menores de 1 centímetro en cualquier órgano (TB miliar) (Milena-Baron, 2005).

#### 4.5.7.2. Microscópicas

Se puede detectar bacilos ácido alcohol resistentes libres en el citoplasma de los macrófagos, histiocitos y células gigantes de la lesión granulomatosa (Milena-Baron, 2005).

Las lesiones tuberculosas encontradas en la inspección post mortem se presentan principalmente en nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio.

El método de inspección post-mortem se considera práctico, si se utiliza conjuntamente con la histopatología para identificar lesiones compatibles con presencia de bacilos ácidos-alcohol resistentes a la tinción de Ziehl-Neelsen (Estrada-Chávez *et al.*,2004).

#### 4.5.7.3. Lesiones post-mortem

1. Granulomas tuberculosos en los linfonódulos de la cabeza, pulmones, intestino y resto del cadáver. Los granulomas tienen usualmente una cápsula definida y contiene en su interior una masa caseosa con el centro calcificado. En los bovinos, los granulomas son generalmente amarillentos, blancos en los búfalos y blanco-grisáceos en otros animales.

2. Las lesiones activas pueden presentar un aspecto rojizo en la periferia de la masa caseosa que se encuentra en el centro del linfonódulo.

3. Las lesiones inactivas pueden estar bien encapsuladas y calcificadas.

4. Presencia de nódulos granulomatosos sobre la pleura y peritoneo.

5. Lesiones localizadas en los pulmones, hígado, bazo y riñones.

6. Bronconeumonía.

7. Glándula mamaria firme y agrandada, afectando particularmente a los cuartos traseros de la ubre.

8. Lesiones en las meninges, médula ósea y articulaciones (FAO, 2005).

Las formas de tuberculosis se clasifican en dos:

✓ Tuberculosis pulmonar:

Es la localización más frecuente de la infección. Esto es debido a que la vía habitual de infección es la inhalada, y al hecho de que es en el árbol respiratorio bajo donde se produce la extensión del complejo primario de la infección.

✓ Tuberculosis extra pulmonar;

- a).- Forma ganglionar: generalmente involucra los nódulos cervicales; menos frecuentemente se afectan los axilares y los inguinales.
- b).- Forma miliar o diseminada: Constituye la diseminación hematógica del bacilo, que tiende a sembrarse en diversos órganos, como pulmones, hígado, bazo y sistema nervioso. Generalmente los síntomas pulmonares son escasos y tardíos, comportándose como una infección generalizada, con fiebre, pérdida de peso, decaimiento y mal estado general.
- c).- 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 craneales, vómitos y cefalea.
- d).- Forma ósea: Generalmente involucra la columna vertebral, comprometiendo frecuentemente 2 cuerpos vertebrales.
- e).- Forma articular: se localiza más frecuentemente en la cadera, generalmente presentándose después de los cinco años de edad. Las articulaciones más afectadas generalmente son las de miembros inferiores que las de miembros superiores, debido a que se involucran las articulaciones que soportan peso.
- f).- Forma ocular: La conjuntivitis generalmente ocurre en el primer año de infección. Generalmente se manifiesta por dolor, fotofobia, lagrimeo y manchas alrededor del limbo esclerocorneal.
- g).- Forma cutánea: 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 (Araujo y Waard, 2004).

#### **4.6. Diagnóstico de tuberculosis**

En México, tenemos que reconocer los esfuerzos que realizan los Sistemas Nacionales y Estatales de Salud, gracias a los cuales se ha mantenido bajo control y en constante decremento, la TB en México, sin embargo se hace necesario hacer una profunda revisión a la norma oficial mexicana y a los programas de control de TB con la finalidad de hacerlos más preventivos que

correctivos (Mariscal-Méndez *et al.*,2005). Un reporte interesante es la detección de animales reactivos a la tuberculina en grupos de animales Holstein provenientes de los Estados Unidos y de Canadá en un corral de cuarentena en Tzayuca, Hidalgo (Milián-Suazo *et al.*,2004a), como lo confirma el Department of Health Services de California que a pesar de que fue erradicada a un se confirman casos de TBB en algunos condados de California y muy probable en algunos otros de norte de América (Bontá, 2004). Lo que indica que a pesar de que estos países se consideran libres de la enfermedad, algunas poblaciones pueden no estarlo, por lo que el tener un método de diagnóstico confiable y de rápida realización es de suma importancia para el país (Milián-Suazo *et al.*,2004a).

De acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana –NOM-031-ZOO-1995-, vigilada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, pesca y alimentación (SAGARPA), para efectos de Campaña, el diagnóstico de la TBB se debe llevar a cabo por medio de las siguientes pruebas (SAGARPA, 1995).

#### **4.6.1. Prueba de Tuberculina**

Es el método utilizado generalmente para la detección de animales que han estado en contacto con el *M. bovis*. Sin embargo, en explotaciones donde se lleva a cabo un control de la TBB con esta prueba, la mayoría de los animales reactivos se eliminan, pero algunos animales no reactivos que se encuentran en fases terminales de la enfermedad, con lesiones abiertas, permanecen dentro del hato y constituyen un foco potencial de infección para la población susceptible (Díaz-Otero Fernando *et al.*,2003).

Las pruebas de tuberculinización autorizadas por la Secretaría y que serán aplicadas por Médicos Veterinarios aprobados en TBB y/o personal oficial aprobado, son:

- Prueba en el pliegue caudal.
- Prueba cervical comparativa.
- Prueba cervical simple

Las tuberculinas autorizadas para efectos de Campaña son:

- PPD bovino: elaborado con *Mycobacterium bovis* cepa AN5, que se utilizará en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple.
- PPD aviar: elaborado con *Mycobacterium avium* cepa D4, que será utilizada en la prueba cervical Comparativa (SAGARPA, 1995).

#### **4.6.1.1. Prueba de Tuberculina Cervical Simple**

En esta prueba el lugar de inoculación es el tercio medio del cuello. Esta zona se debe depilar con maquina o tijera a 5 cm. de diámetro aproximadamente. Se mide con un calibre el espesor de la piel previamente y se inyectan 0.1 ml de tuberculina PPD bovina de un miligramo por mililitro. La lectura se hace mediante un calibre a las 72 horas (más o menos 6 horas). Cuando la lectura se ve impedida por razones climáticas u otras causas, esta puede hacerse hasta 24 horas mas tarde. Si la lectura se realiza mas tarde de esto la prueba no tiene validez por lo que el diagnostico no será confiable y debe repetirse la prueba a los 60 días. Positivo: 3mm o mayor, Negativo: menos de 3mm (Milena-Baron, 2005; SAGARPA, 1995).

#### **4.6.1.2. Prueba de Tuberculina ano-caudal**

Esta prueba se realiza en el pliegue ano-caudal interno a unos 6 cm. de la base de la cola y en el centro del pliegue. Esta zona es menos sensible a la tuberculina que la piel del cuello. Se inyectan 0.1 ml de PPD bovina de un miligramo por mililitro. La lectura se hace mediante un calibre a las 72 horas (más o menos 6 horas). Positivo: 5mm o mayor. Sospechoso: 3mm/ más o menos de 5mm. Negativo: menos de 3mm. Hay que tener en cuenta que todo animal sospechoso en un establecimiento donde se hayan detectado animales reactivos positivos en pruebas anteriores o en la que se esta realizando se le debe considerar positivo (Milena-Baron, 2005; SAGARPA, 1995).

#### **4.6.1.3. Prueba de Tuberculina Comparativa**

La prueba intradérmica comparativa se utiliza para la realización de un diagnóstico diferencial entre animales infectados por *Mycobacterium bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina por exposición a otras micobacterias.

Este tipo de sensibilización puede ser atribuido a la gran reactividad antigénica cruzada existente entre las especies de micobacterias y otros géneros afines. Esta prueba consiste en la inyección de tuberculina bovina y tuberculina aviar en diferentes puntos del cuello y en la subsiguiente evaluación de la respuesta, transcurridos 3 días. Para esta prueba comparativa la dosis de tuberculina no debe ser inferior a 2.000 UI de tuberculina bovina ni a 2.00 UI de tuberculina aviar. La distancia entre ambas inyecciones debe ser de aproximadamente 12 a 15 cm. Positivo: 4mm mayor que la tuberculina aviar. Dudoso: entre 1 y 4mm mayor que la tuberculina aviar. Negativo: cuando no hay reacción o cuando la reacción es igual o menor que la tuberculina aviar. En todas las inyecciones se realiza introduciendo la aguja oblicuamente en las capas profundas de la piel e inyectando la dosis de tuberculina. Después se comprueba que la inyección ha sido bien realizada detectándose al tacto una pequeña inflamación en el lugar de la misma (Milena-Baron, 2005; SAGARPA, 1995).

#### **4.6.2. Diagnóstico bacteriológico**

La metodología más ampliamente aceptada consiste en la baciloscopía para la detección de bacilos ácido alcohol resistente mediante coloraciones especiales y el aislamiento en medios de cultivo e identificación mediante características fenotípicas y bioquímicas (Araujo y Waard, 2004).

*4.6.2.1. Examen directo:* Esta es una de las principales técnicas usadas en toda investigación microbiológica de tuberculosis. Se basa en la capacidad de las micobacterias para formar complejos estables con ciertos colorantes de Arylmetano como la fucsina, la cual penetra en la pared celular uniéndose a los complejos micolil-arabinogalactano. Este complejo retiene el colorante aún después de su exposición al alcohol ácido o ácidos minerales. Esta condición es requerida para que un microorganismo sea denominado ácido alcohol resistente (Araujo y Waard, 2004), Mediante la tinción de Ziehl Neelsen o de nueva fucsina (fucsina básica 3 gramos y alcohol etílico al 95° 100 ml) esta es la tinción mas apropiada para los microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo. Puede utilizarse la microscopia de fluorescencia mediante la tinción con auramina-

rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante (Estrada-Chávez *et al.*,2004).

4.6.2.2. *Examen indirecto:* Cultivo, es el método bacteriológico de rutina mas sensible y específico de los que se conocen para descubrir en una muestra determinada, micobacterias y en particular M. tuberculosis, por ser un germen que necesita medios enriquecidos especiales, por ser aerobio, la temperatura óptima para su crecimiento y desarrollo esta entre 35 y 37° C, con un pH de 6.7 a 6.9 (Blancarte-Melendres *et al.*,1992). El aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso se realiza por medios especiales como Herrolds con o sin huevo, Middlebrook y Stonebrink, Petragnani, y Lowenstein Jensen (Estrada-Chávez *et al.*,2004). 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. Sin embargo, presentan desventajas como dificultad en la recuperación de las colonias aisladas, si existe contaminación, ya que se afecta todo el medio; no deben usarse para pruebas de sensibilidad ya que durante su elaboración se requiere de calentamiento a altas temperaturas que puede inactivar parte de la droga. Los medios a base de Agar Middlebrook 7H10 y 7H11, contienen 10 veces menos verde de malaquita que los medios con base de huevo, lo que explica la mayor incidencia de contaminación. El medio 7H11 contiene caseína, que mejora la velocidad y el rendimiento de crecimiento de las micobacterias resistentes a la isoniazida (Araujo y Waard, 2004).

Para facilitar la recuperación de micobacterias de muestras clínicas, esta debe someterse a procesos de descontaminación, homogeneización (fluidificación o digestión) y concentración. La descontaminación se realiza en muestras que probablemente contengan flora bacteriana mixta como el esputo y la orina, para reducir el sobre crecimiento bacteriano no deseado. La homogeneización tiene por finalidad fluidificar la muestra, licuando el mucus o tejidos que rodean los microorganismos para que el agente contaminante pueda destruir a las bacterias no deseadas. Estos procesos se realizan usando ácidos y álcalis fuertes, a los cuales las micobacterias son resistentes debido al contenido lipídico de su pared celular. Sin embargo, la utilización inadecuada de estas sustancias, o la exposición prolongada a estas, podrían afectar la

viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra (Araujo y Waard, 2004).

El cultivo de *M. bovis* es el procedimiento óptimo para el diagnóstico definitivo de TB. Sin embargo, requiere de mucho tiempo, equipo y personal calificado y se pueden obtener resultados falsos positivos. La poca sensibilidad del cultivo en trabajos anteriores se debe a la escasez de microorganismos viables o cultivables en las lesiones crónicas (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

La forma de enviar las muestras para el examen bacteriológico es necesario sumergir los tejidos en solución saturada de borato de sodio, si se trata de nódulos aparentemente afectados se deberán enviar completos sin grasa; si se trata de otro tejido, se deberá seleccionar la posible lesión y enviar muestras no mayores de 2 cm por lado. El tiempo máximo en que debe permanecer el tejido en la solución de borato de sodio es de 10 semanas, si el tiempo es mayor la muestra se deshidrata (SAGARPA, 1995).

#### **4.6.3. Diagnóstico histopatológico**

Se realiza en muestras de aproximadamente 2 cm. por lado con lesiones sugestivas a tuberculosis fijadas con formol al 10% amortiguado con fosfatos en una relación de 1:10, es decir una parte de tejido por nueve partes de formol. Se realiza la técnica de rutina de inclusión en parafina, y las tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE), Ziehl Neelsen (ZN). Son técnicas relativamente rápidas que duran de tres a cinco días y las muestras se conservan por muchos años en esta preparación (SAGARPA, 1995). Se observan al microscopio, se interpretan y se describen de acuerdo a los hallazgos. Histológicamente la tuberculosis se aprecia en forma clásica con una necrosis central mineralizada, fibroplasia periférica o difusa e infiltración de macrófagos, células epitelioides y células gigantes tipo Langhans (SAGARPA, 1995).

#### **4.6.4. Toma de muestras para el diagnóstico histopatológica y bacteriológico**

Se seleccionarán y tomarán muestras de los siguientes órganos que presenten lesiones compatibles con TB o secreciones sugestivas:



- ✓ Nódulos linfáticos. Tomando muestras preferentemente de los nódulos de la cabeza, preescapulares, mediastínicos anteriores y posteriores y bronquiales derecho e izquierdo. En el caso de TB miliar tomar muestras de nódulos mesentéricos.
- ✓ Pulmones. La lesión tuberculosa puede ser caseosa o calcificada o una cavidad franca. De este órgano se tomarán muestras de 2 cm. por lado de las lesiones presentes.
- ✓ Útero en caso de metritis tuberculosa. Se caracteriza por secreción continua de grandes cantidades de pus amarilla teniendo el aspecto de leche cuajada. Se tomarán las muestras del órgano y de este exudado.
- ✓ Otros órganos. También se tomarán muestras de los siguientes órganos cuando presenten lesiones sugestivas de TB: bazo, hígado, riñón, médula ósea, ovarios, testículos y glándula mamaria (SAGARPA, 1995).

En el laboratorio las muestras serán sometidas a las pruebas de diagnóstico bacteriológico e histopatológico.

#### **4.7. Otros formas de diagnóstico**

Existen muchas pruebas de laboratorio pero no tienen una especificidad y sensibilidad confiable por lo que cada día se buscan nuevas técnicas y se tratan de perfeccionar con las que ya se cuentan, una alternativa puede ser el uso de métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimeraza (PCR). Talbot *et al* desarrollaron una PCR-Múltiplex, llamada así porque se pueden obtener varios productos de amplificación en una sola reacción, y se basa en la identificación de diferencias genéticas observadas en un segmento de ADN de 9.5 kilodaltones, denominado RD1 (Ramírez Casillas *et al.*,2004), otras pruebas pueden ser la Radiométrica y la prueba de ELISA.

##### **4.7.1. Radiométrico**

La técnica radiométrica de cultivo líquido (BACTEC), es la más rápida y requiere en promedio, 13 días para que se consideren como positivos (Blancarte-Melendres *et al.*,1992; Moore y Curry, 1998), detectan automáticamente el crecimiento Mycobacteriano midiendo la cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  producido por la metabolización de sustratos (ácidos grasos) marcados

con C. Se utilizan viales que contienen 4 ml de medio 7H12 de Middlebrook que admiten inóculos de hasta 0,4 mL en relación con los sistemas tradicionales de cultivo el sistema BACTEC® tiene las siguientes ventajas:

a) Mayor sensibilidad, tanto para el aislamiento de *M. tuberculosis* como de otras micobacterias.

b) Posibilidad de identificar *M. tuberculosis* en 4-5 días y de realizar antibiogramas a los fármacos de primera elección (incluyendo la pirazinamida) en tiempos medios de 3-6 días, en lugar de los 21-42 días que exigen los métodos convencionales (José-Gutiérrez, 2004).

El principal inconveniente del sistema BACTEC® reside en tener que trabajar con 14C, lo que requiere disponer de los permisos necesarios para la manipulación y almacenamiento de este compuesto. Para laboratorios de nivel II y III el sistema BACTEC® es hoy día, sin duda, el avance diagnóstico más contrastado y útil en micobacteriología clínica (Badillo-Rosales, 2004).

#### **4.7.2. Prueba serodiagnóstica de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA)**

La prueba de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, por sus siglas en inglés) es una técnica de laboratorio muy sensible que es usada para detectar la presencia de antígenos o anticuerpos. Una aplicación común del ELISA es adsorber anticuerpos a las paredes de una placa de plástico (poliestireno), a la que posteriormente se le agregará antígeno para la prueba problema. Si el antígeno está presente en la muestra, éstos serán inmovilizados a las paredes de la placa. Un segundo anticuerpo unido a una enzima que reconoce el antígeno inmovilizado es agregado posteriormente. La presencia en cada pocillo de la placa del complejo anticuerpo (-) antígeno (-) anticuerpo (+) enzima es revelado por el cambio de color que ocurre al aplicar un sustrato cromogénico que es utilizado por la enzima conjugada al segundo anticuerpo. El cambio de color, y por lo tanto la presencia del antígeno, es cuantificado por medio de la medición de absorbancia que es efectuado es un lector de placa de ELISA (Rosales, 2003).

Delgado y Gonzáles en el 2000 evaluaron la prueba de ELISA empleando el Derivado Proteico Purificado (PPD) como antígeno en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, con la finalidad de adecuarlo en la

detección rápida de la infección, encontrando una sensibilidad de 69.81 y una especificidad de 71.84 al final del estudio la prueba de ELISA mostró una sensibilidad y especificidad baja (Delgado y González, 2000).

#### 4.7.3. Diagnóstico molecular

Esta es una ciencia cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de uno seres a otros y se exprese en los nuevos individuos, este conocimiento nos permite cruzar las barreras naturales que existen entre las especies y "colocar" genes de un organismo otro llamado hospedero, empleando técnicas de ingeniería genética. Gracias a este avance, se pueden producir fragmentos de ácidos nucleicos a gran escala, abriendo así las puertas a la secuenciación de los ácidos nucleicos y por ende a nuevas disciplinas como el diagnóstico molecular, la terapia génica o la obtención de organismos superiores recombinantes (Lozada-Méndez, 2005).

La biología molecular ha desarrollado herramientas como la reacción en cadena de la Polimeraza (PCR), para el diagnóstico de enfermedades bacterianas intracelulares y de difícil crecimiento. En el método conocido como spoligotyping se amplifica por PCR, una región repetitiva (DR) presente únicamente en miembros del complejo *M. tuberculosis*, que flanquea la secuencia IS6110 (Díaz-Otero *et al.*,2003), también conocida como IS986, se ha colocado como una regla estandarizada para la epidemiología molecular de la TB (Sue Wall *et al.*,1999), por lo que, los marcadores más utilizados y comunes siguen la IS6110 (Haddad *et al.*,2004).

Esta región consiste en una serie de secuencias idénticas de 36 pares de bases (pb), separadas entre sí por regiones variables de 34 a 41 pb. Los productos de amplificación se hibrida con oligonucleótidos sintéticos, fijados a una membrana de nailon, que corresponden a las regiones espaciadoras de DR. Este método se ha empleado en la tipificación de aislados, no hace mucho se ha utilizado esta técnica en muestras clínicas con fines diagnósticos (Díaz-Otero *et al.*,2003).

Algunos de los métodos moleculares para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* se basan en la amplificación de secuencias repetidas de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa o PCR (de las

siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) obteniendo resultados en 24 a 48 horas. La PCR es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN Mycobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de TB, en muestras con resultado negativo a la tinción de Ziehl-Neelsen o en el cultivo (Loera-Castañeda *et al.*,2003).

La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida, sensible y versátil para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

#### **4.7.3.1. Reacción en Cadena de Polimerasa**

Un gran salto tecnológico ocurrió en 1983, cuando Kary Mullis desarrolló una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN sin tener que clonarlo: la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés). Esta técnica es considerada la más revolucionaria del último cuarto del siglo XX (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

La PCR tiene la virtud de producir resultados en forma específica, sensible y en pocas horas, permitiendo por ello el diagnóstico en la fase aguda de la infección (Martínez *et al.*,2005). Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el ADN (los nucleótidos de adenina, timina, citosina y guanina), y una pequeña cadena de ADN que pueda unirse a la molécula que queremos copiar para que sirva como cebadora (el cebador, en inglés "primer") (AMGEN., 2005).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y

temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. Así se obtienen en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada del ADN (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

Mediante PCR es posible monitorear infecciones bacterianas y virales. Los procedimientos convencionales de detección se basan en la posibilidad de crecer los microorganismos en cultivo o en detectar su presencia en el paciente mediante anticuerpos. La desventaja de estos métodos es que pueden tardar semanas. La PCR detecta directamente los patógenos tradicionalmente difíciles de cultivar, tales como *Chlamidia trachomatis*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae*. Así como a aquellos que requieren de largos períodos para su cultivo y que se encuentran en muy baja concentración en los líquidos biológicos, como el caso del *Mycobacterium tuberculosis* (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

El diagnóstico convencional de las micobacterias tiene como desventajas la baja sensibilidad y especificidad del análisis microscópico, su límite inferior de detección es de 10<sup>4</sup> bacilos por mililitro de muestra, y el lento crecimiento de las micobacterias patógenas en cultivo. Sin embargo, la reacción en cadena de la Polimerasa (RCP) permite la identificación rápida y específica de las micobacterias con un límite inferior de detección que varía de 1 a 100 bacilos por mililitro de muestra (Rodríguez *et al.*, 2000).

#### **4.7.3.1.1. Materiales**

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua ultra pura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100  $\mu$ l), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

## **Magnesio**

Tanto el ión magnesio como el manganeso tienen una función crítica en la reacción, requiriéndose a una concentración que oscila regularmente entre 0.5 y 2.5 mM. La concentración de  $MgCl_2$  debe optimizarse para cada ensayo en particular, ya que puede tener efecto tanto en la especificidad como en el rendimiento de la reacción. En general, concentraciones insuficientes de  $Mg^{+2}$  dan lugar a bajo rendimiento, mientras que en exceso se obtienen amplificaciones inespecíficas (Morales-Loredo y Martínez-Vázquez, 2004; Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

## **Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs)**

Los cuatro dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP; distinguibles por sus bases nitrogenadas) son los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN. La variación en su concentración afecta la especificidad y fidelidad de la reacción. Concentraciones altas de los mismos hacen disminuir la fidelidad con la que la polimerasa efectúa su trabajo, e incluso pueden llegar a inhibir su actividad. También afecta a la fidelidad de la reacción el uso de concentraciones desbalanceadas de estos cuatro ingredientes, siendo las concentraciones usuales, en la mayoría de los casos, entre 0.2 a 1 mM. Los dNTPs pueden captar iones de magnesio por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación, aconsejándose que la concentración de  $Mg^{+2}$  sea 0.5 a 1 mM superior a la concentración de los dNTPs (Morales-Loredo y Martínez-Vázquez, 2004; Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

## **Cebadores o iniciadores (Primers)**

Éstos son el componente más sensible que determina el éxito de un ensayo de PCR. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos, y su contenido en G+C entre 40-75 % G+C. La concentración a la que suelen emplearse en una PCR está en el intervalo de 0.1-0.5  $\mu$ M. Los iniciadores normalmente se diseñan para ser exactamente complementarios al molde de

ADN (Morales-Loredo y Martínez-Vázquez, 2004; Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

### **Enzima**

Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* y la *Vent* de la bacteria *Thermococcus litoralis*. Sus temperaturas óptimas de catálisis oscilan alrededor de los 72 °C, temperatura a la cual incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, siendo estables a altas temperaturas, incluso por encima de 92° C (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004). Son enzimas que tienen la habilidad de polimerizar nucleótidos trifosfatidos que sean complementarios a los nucleótidos presentes en una cadena molde, esta cadena molde o templado tiene que ser de cadena sencilla (esto implica que la molécula de ADN de cadena doble, del genoma de un organismo, debe de convertirse en cadena sencilla para que sirva de templado en una reacción de síntesis de ADN) (Montes de Oca, 2004).

El descubrimiento de una bacteria (*Thermus aquaticus*) que vive en aguas termales junto a geissers a 75° C, la cual tiene una ADN polimerasa que funcionaba bien a altas temperaturas (72° C) e incluso es estable a 94° C, supuso un gran avance, ya que sólo tenía que ser añadida al principio y se mantenía activa durante todo el proceso, la concentración de enzima afecta la sensibilidad y especificidad; muy poca enzima genera insuficiente producto y demasiada disminuye la especificidad, la concentración de enzima recomendada va desde 1 a 2.5 U para reacciones de 100 µl (Morales-Loredo y Martínez-Vázquez, 2004; Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

### **Ácido Desoxirribonucleico (ADN)**

La cantidad de ADN molde puede ser de tan sólo 1 ng en el caso de material genético clonado (en virus o plásmidos), o de un mínimo de 20 ng, cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. Hay muchas formas posibles de preparar el molde para PCR (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

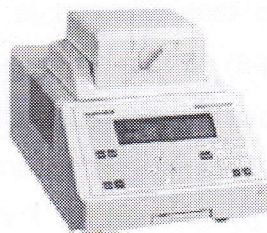
En general, no es necesario purificar el molde, porque la reacción puede tolerar la presencia de impurezas, pero hay que tener mucho cuidado de eliminar, lo más posible, la presencia de inhibidores de la polimerasa, sobre todo en las muestras clínicas. Si el material son suspensiones celulares, puede ser suficiente con romper las células por calor (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

## **Agua**

El agua se usa como solvente del resto de los ingredientes y se requiere al menos destilada (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

### **4.7.3.1.2. Equipo**

La reacción es una mezcla rápida de calor y frío realizada en un equipo llamado termociclador. Son fabricados en gran variedad donde los costos varían entre US \$ 2,000 a \$ 15,000. los modelos actuales de termocicladores pueden completar de 30 a 40 ciclos de amplificación en aproximadamente dos horas (Frothingham, 1996). Las inconsistentes temperaturas a través del block del termociclador se ha encontrado es el responsables de la pobre amplificación y estos resultados han sido sobrepasados por la adición de formamida, la cual reduce la temperatura de fusión del DNA. Una Excelente consistencia térmica es importante para las pruebas de sensibilidad y especificidad y deberá de considerarse cuando uno seleccione entre los múltiples modelos de termocicladores existentes (Wilson, 1997).



**Figura 7.** Termociclador (Mastercycler® gradient thermal cycler).

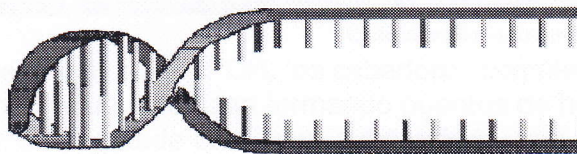


#### 4.7.3.1.3. Mecanismos

La reacción consta, por lo regular, de una treintena de ciclos repetitivos conformados cada uno de tres pasos (Figura 12):

##### **Desnaturalización**

Consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno del ADN para desnaturalizarlo, para lo que se incuba a una temperatura de alrededor de 95° C, por un minuto (Figura 8). Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. El sustrato de la enzima de la PCR es el ADN de simple cadena que actúa como molde para la síntesis de su nueva cadena complementaria. Mediante un calentamiento a 94° C, el ADN de doble cadena logra que sus cadenas se separen o desnaturalicen (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).



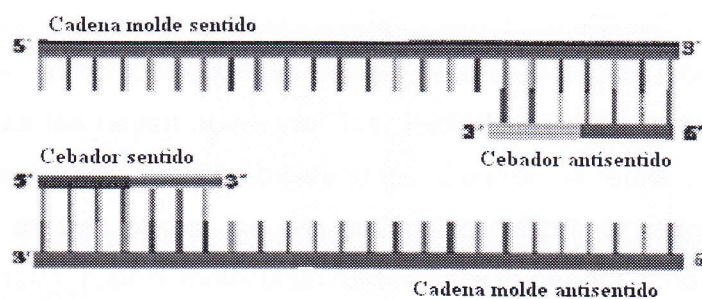
**Figura 8.** Desnaturalización del ADN en la PCR. Los puentes se rompen dejando el ADN en forma de cadena sencilla, permitiendo así exponer las diferentes bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleótidos cebadores.

##### **Alineamiento**

Ocurre la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los denominados cebadores o iniciadores (ADN sintético de hebra sencilla), a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADNs (Figura 9). Esta temperatura depende de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los iniciadores, que generalmente oscila entre 50 y 60° C. La enzima, como todas las ADN polimerasas, necesita del grupo OH- libre en el extremo 3' del iniciador ya apareado al sitio blanco de la amplificación, a partir de donde iniciar la síntesis. Este punto constituye el sitio de crecimiento de la cadena complementaria al molde, mientras que un cebador (referido como el 5' o sentido) es complementario a la secuencia del

extremo 5' de la región del ADN molde a amplificar, el otro es al extremo 3' de la misma, pero en la cadena opuesta (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

El alineamiento específico de ambos cebadores se produce a una temperatura determinada por composición de bases y oscila entre 40 y 72° C. Ambas cadenas originales del ADN sirven simultáneamente como moldes para sintetizar sus respectivas cadenas complementarias nuevas. Un aumento de temperatura favorece la especificidad, ya que disminuye las uniones incorrectas de los cebadores con sitios apócrifos del ADN molde (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004)

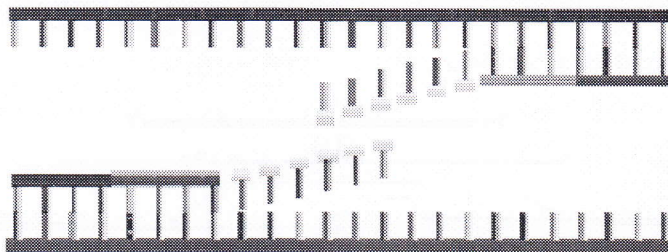


**Figura 9.** Alineamiento de la PCR; los cebadores complementarios que flaquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógenos. De esta manera la polimerasa puede comenzar a extenderlo para copiar ambas hebras de molde.

### Extensión

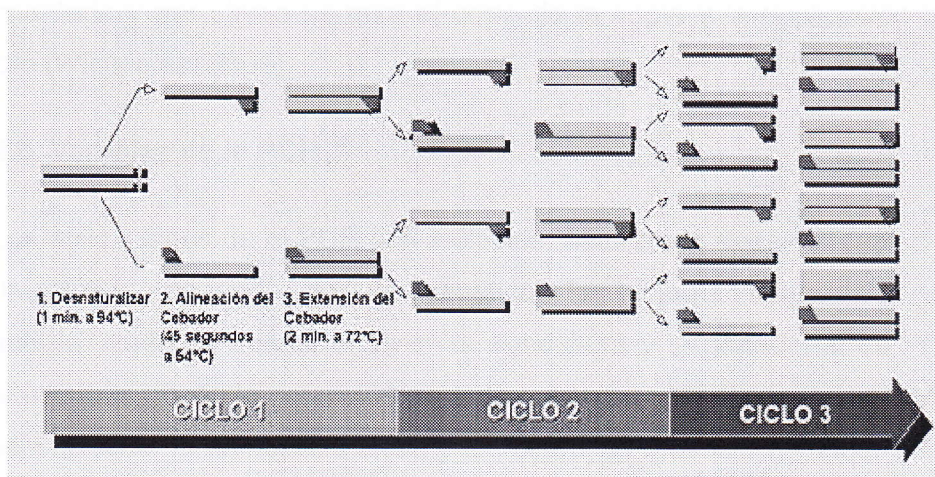
Se efectúa a 72° C, temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde (Figura 10). Con el ADN molde de cadena sencilla, excepto en los sitios donde los iniciadores se aparean, la polimerasa empieza a copiar la hebra, incorporando desoxirribonucleótidos monofosfatos en dirección 5--3'. Esta etapa debe realizarse a una temperatura alta, que es la que coincide con la máxima actividad de la polimerasa (72° C) para evitar alineamientos inespecíficos de los iniciadores. El tiempo de extensión depende del tamaño de la amplificación, debiendo estimar 1 min. para alargar 1000 nucleótidos. Es común que al finalizar todos los ciclos se realice un último alargamiento por 5 min. a 72° C, para asegurarse que todos los productos de amplificación estén

completamente terminados y tengan, por ende, exactamente la misma longitud (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).



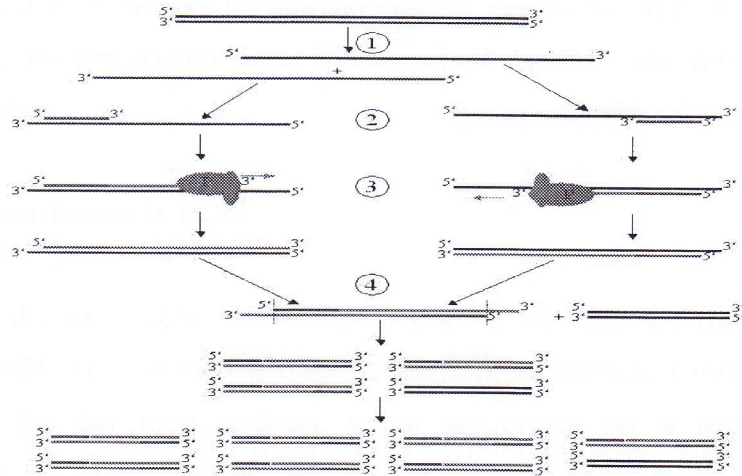
**Figura 10.** Extensión de la PCR. A la temperatura óptima de la ADN polimerasa Taq (72° C), la enzima agrega los dNTPs a partir del 5' hacia el extremo 3'.

Al final del primer ciclo, ambas hebras de una molécula bicatenaria de ADN a las que se les hayan apareado los iniciadores han sido copiadas para generar dos nuevas cadenas bicatenarias. Cuando se repite por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer ciclo se copian para producir ahora cuatro moléculas. El tercer ciclo genera ocho moléculas. En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de ADN, y 30 ciclos generarán alrededor de mil millones de copias de ésta (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004). De esta manera sólo hay que añadir la enzima al inicio del proceso de reacción y llevar a cabo tantos ciclos como sea necesario. Por otro lado cada una de las moléculas de ADN hijas pueden volver a entrar en el proceso y servir como molde para fabricar más copias, (Figura 11) (AMGEN., 2005).



**Figura 11.** Explicación de las copias por cada ciclo.

Para que la técnica funcione se necesita, abundante suministro de bases de nucleótidos y dos *cebadores*, que son secuencias cortas de unos veinte nucleótidos y que se usan para iniciar la reacción (PCR) (Wikimedia, 2005).



**Figura 12.** Con las tres etapas juntas y la multiplicación geométrica de los tramos de ADN elegido.

En la figura 12, primero se calienta la mezcla para separar las hebras de ADN (el ADN *se abre*) y a continuación se enfría la solución, lo que permite que los *cebadores* se peguen a las partes adecuadas de la hebra de ADN (*chocan* unas a otras hasta que encuentran el complemento exacto, y entonces se ensamblan, actuando como límites de la región de la molécula que va a ser duplicada). Para terminar, se aumenta la temperatura hasta el valor en que puede actuar la polimerasa, y sobre la plantilla crece una hebra nueva complementaria y por último se mira el corte de la copia y la duplicación por cada ciclo (Wikimedia, 2005).

#### 4.8. Ventajas de la PCR

Las aplicaciones de la PCR son múltiples, abarcando desde la evolución hasta la clínica, pasando por la genética, la biología molecular y la biotecnología; amén de aplicaciones en la agricultura y la ganadería. La PCR es especialmente útil en la detección de enfermedades genéticas tales como la fibrosis quística, la hemofilia clásica y las distrofias musculares (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004).

Mediante el PCR es posible amplificar secuencias correspondientes al virus o a la bacteria de una manera específica y muy sensible, pudiendo llegar a detectar agentes infecciosos como el SIDA y la tuberculosis (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldaña, 2004). Además se pueden correr varias muestras al mismo tiempo (Costa, 2004), con una rapidez que no procede de las otras pruebas, disminuye el riesgo de contaminación en forma muy importante, detecta mutaciones que pueden estar ligadas a factores de mutaciones (Simon y Listiawan, 2003).

#### **4.9. Limitantes de la PCR**

A pesar del éxito obtenido la PCR es estudiada por los métodos de laboratorio, la PCR se asocia con dificultades para la técnica. Problemas de contaminación, por ser muy costosa, y por ser crítica en la logística de preparación, si la PCR puede ser usada fuera del laboratorio, particularmente podrá tener un gran desarrollo en los países (Wikson *et al.*, 1993). Sin embargo, se han reconocido dos grandes obstáculos al éxito de la técnica: las dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular Mycobacteriana, la extracción de ADN y la presencia de inhibidores de la PCR (Loera-Castañeda *et al.*, 2003), estos últimos incluyen varios componentes de los fluidos corporales y reactivos encontrados en las ciencias clínicas y forenses (hemoglobina, urea y heparina), constituyentes de alimentos, (compuestos orgánicos y fenólicos, glucogenos, grasas y Ca), 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 componentes del laboratorio como por ejemplo polen, polvo de los guantes, utensilios de plástico y celulosa del laboratorio, también podemos incluir a compuestos químicos como detergentes, antibióticos, amortiguadores, enzimas, polisacáridos, grasas y proteínas. Los iones Mg son cofactores vitales para la Taq. Polimerasa y su concentración afectará una amplificación satisfactoria y exitosa. La secuestro de iones Mg por diversos compuestos e interferencia por calcio pueden inhibir la reacción de amplificación (12, 101). La presencia del ión Ca en la leche puede ser una de las causas de las propiedades inhibitorias (Wilson, 1997).

Según la Secretaría de Ingresos, las cuotas que se le autorizan al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* por PCR es de 252 pesos, por lo que es un inconveniente mas para que la técnica la realicen los ganaderos (Martínez Baez, 2000).

#### **4.10. Control de la tuberculosis bovina**

La TBB ocurre a nivel mundial, debido a que esta enfermedad tiene una implicación zoonótica, perdidas en la producción y es de naturaleza crónica progresiva, se han ido introduciendo muchos programas para la erradicación en diferentes países. La incidencia de infecciones con *M. bovis* en humanos en países donde se tienen programas para la erradicación tienden a reducirse los niveles de infecciones (Quinn *et al.*,2002), la TB en el ganado productor de leche hace que el procedimiento de prueba y sacrificio como medida de control sean difíciles de aplicar, por lo que en muchas zonas lecheras la vacuna podría ser considerada como una medida de control a mediano plazo. Sin embargo, para poder considerar la vacunación con *M. bovis* BCG como una alternativa en el control de la TB en el ganado productor de leche, una de los requerimientos será contar con una prueba de diagnóstico que permita diferenciar animales infectados con *M. bovis* de campo, de animales vacunados con *M. bovis* BCG (Ramírez Casillas *et al.*,2004).

Por otro lado, la estrategia para el control y erradicación de la TB en el ganado se basa en la prueba tuberculina, seguida del sacrificio de los animales reactivos positivos. Estas estrategias, son muy útiles cuando la prevalencia de infección en los hatos son muy bajas (menos del 1%) y permite el rastreo desde mataderos, hasta los establecimientos de origen de los animales en los que se destacan lesiones de TB. Esto exige la identificación de cada animal y una alta calidad en la inspección veterinaria. Que da como resultado productos libres de microorganismos y que evita la transmisión a través de alimentos (Espinoza-Mata y Lozano-Muñiz, 2004).

Actualmente en nuestro país existe la campaña nacional contra la TBB, en donde se establecen los pasos a seguir para el control y erradicación, así como las pruebas para el diagnóstico (Delgado-Gonzales, 1999). Uno de los principales problemas que surgen en el curso de las campañas de control y

erradicación de la TBB es la reaparición de la infección en rebaños que fueron saneados en las fases anteriores, con el consiguiente costo económico derivado. En la mayoría de los casos no es posible aclarar epidemiológicamente el origen del foco, pudiendo tratarse de una reinfección o bien de un rebrote de la infección, que habría quedado latente en alguno de los animales del rebaño, sin que las técnicas de diagnóstico disponibles fueran capaces de detectarlo. Para aclarar este origen es importante utilizar técnicas de biología molecular que permitan conocer la heterogeneidad genética de las cepas por regiones geográficas ganaderas y de esta forma poder identificarlas, para establecer medidas que limiten su diseminación. La epidemiología molecular de las infecciones por *M. bovis* en los animales y el hombre está siendo usada como una nueva herramienta para examinar la transmisión de la TBB (Aranaz *et al.*,1996; Fisanotti *et al.*,1998; Gutierrez *et al.*,1995).

#### **4.11. Prevención**

La TB sigue siendo una de las principales enfermedades infecciosas del ganado bovino que ocasiona pérdidas económicas importantes. La vacuna BCG (Bacilo de Calmette Guerion atenuado) ha sido utilizada de manera experimental desde 1920 para evaluar su impacto en el control de esta enfermedad. Aunque los resultados son variables, se observa una disminución en la severidad de las lesiones. Durante algún tiempo, hubo poco avance en la investigación sobre la utilidad de la vacuna BCG debido a que convierte a los animales en reactores a la tuberculina, inhabilitando la prueba diagnóstica reconocida oficialmente (Ramírez Casillas *et al.*,2004).

Pero en la investigación de Ramírez Casillas Isaura Carolina *et al* no descubrió productos de amplificación correspondientes a *M. bovis*-BCG a través de la prueba de PCR-multiplex en muestras de sangre y moco nasal (Ramírez Casillas *et al.*,2004).

#### **4.12. Erradicación**

Los programas de control y erradicación se basan en la aplicación de la prueba de tuberculina a todo el hato en forma repetida (cada 60-90 días), en la eliminación de los reactores positivos y en una adecuada vigilancia

epidemiológica. Los animales positivos a la tuberculina deberán ser eliminados del hato destinándolos a sacrificio en forma inmediata para evitar la diseminación a otros bovinos. La segregación de reactores dentro del establecimiento o en hatos sanitarios por un período intermedio hasta su eliminación es una alternativa que permite paliar el efecto económico negativo que implica el descarte. Pero puede implicar riesgos secundarios de diseminación de la enfermedad a otros animales y al hombre (Abdala y Tarabla, 2005).

Al controlar y erradicar la tuberculosis bovina, se eliminará una fuente potencial de infección para el humano, situación que ha sido demostrada en varios países a través de campañas de prevención, control y erradicación de la tuberculosis (SAGARPA, 1995).

El Comité Binacional México- Estados Unidos para la erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis (CBN) se creó en 1993, por recomendación de la Asociación de Salud Animal de los Estados Unidos (USAHA), para dar seguimiento al desarrollo de la Campaña de Tuberculosis bovina en México, motivado por la gran cantidad de casos de tuberculosis detectados en rastros de los EUA, a partir de muestras obtenidas de becerros exportados de México, lo que tiene gran impacto en la exportación de becerros a ese país, con la misión del Comité Binacional de coordinar esfuerzos que conduzcan al control y erradicación de la tuberculosis bovina y la brucelosis en los Estados Unidos y México (SENASICA, 2005b).

#### **4.13. Implicaciones en Salud Pública**

Tal fue su magnitud epidemiológica en la antigüedad, que se le llegó a llamar la peste blanca, pero no fue sino hasta la década de los 50's y gracias a la administración de antibióticos, mejoras en los niveles nutricionales y desarrollo de campañas sanitarias masivas, que se estableció una lucha eficaz contra la TB, dando como resultado su disminución, con 10 millones de nuevos casos y tres millones de muertes al año, La "reemergencia" de la TB desde mediados de la década de los 80, ha estado de forma exponencial ligada a la epidemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 particularmente en naciones asiáticas y del África se evidencia un aumento de la incidencia a más de 300 casos por 100 000 habitantes, agrupándose en



estas áreas cerca de 50 % de las personas coinfectadas. En la última década del pasado siglo 8 000 000 de casos de TB fueron atribuibles al SIDA, con alrededor de 2 900 000 muertes (Reyes-Corcho *et al.*,2004;). La TB se considera una enfermedad reemergente, así en la región de Las Américas se han reportado entre 200 y 250 000 casos anuales a partir de los 80, aunque algunos expertos señalan que la cifra puede elevarse a unos 300 000 (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).

La tuberculosis es un problema de salud pública, ya que constituye la primera causa de muerte debida a un solo agente infeccioso (García-García *et al.*,1998).

La TBB constituye un grave problema de salud animal y un riesgo en la salud pública. Actualmente la campaña nacional contra la erradicación de la TBB considera los estados fronterizos del norte con excepción de Baja California norte, Quintana Roo y Yucatán en etapa de erradicación. El resto del territorio nacional se considera zona en control (Estrada-Chávez *et al.*,2004).

La TB es una de las enfermedades infectocontagiosas más importantes del mundo, antecedida solamente por la malaria y el VIH-SIDA, por lo que se mantiene como una de las enfermedades transmisibles de gran preocupación y ocupación para los sistemas de salud. Pero no siempre fue así, llegó un momento en la historia de esta enfermedad que se creyó inclusive en su erradicación, sin embargo la aparición de nuevos, y la conjunción de viejos factores han ayudado a reposicionar a la TB como un problema de atención inmediata para la salud pública global. Los factores que están impactando profundamente en el presente y futuro de la TB: 1) La pobreza; 2) La resistencia a drogas, 3) Los sistemas de diagnóstico, y 4) Su asociación con el virus de la inmunodeficiencia humana. Tanto desde una perspectiva global como nacional, y concluimos con una breve evaluación sobre como nos estamos preparando para enfrentar a la TB (Mariscal-Méndez *et al.*,2005). La TB desde hace mucho tiempo ha constituido un problema de salud pública en el mundo. Actualmente lo sigue siendo, a pesar de los avances para el diagnóstico, prevención y curación de la misma, especialmente en los países en desarrollo. Entre personas de 15 y 49 años de edad causa de 2.4 a 2.9 millones de muertes anuales según varias estimaciones. Durante el periodo 2000 a 2020 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que habrán 1 000 millones de infectados por *Mycobacterium TB*, 200 de los cuales

enfermarán y 35 morirán si no se mejora el control de la enfermedad (Báez-Saldaña *et al.*,2003). La OPS calcula que en 1995 esta enfermedad fue la causa de muerte de más de 75 000 personas en América Latina y el Caribe, y que cada día 1 100 personas se enferman y más de 200 mueren debido a la TB. Los países con tasas severas (>85 x 100 000 habitantes) son: Bolivia, República Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, Paraguay y Perú.

Hay 4 factores que contribuyen al resurgimiento de la enfermedad:

- El incremento de la población marginal con problemas de pobreza, hacinamiento, etc.
- El deterioro de los programas de control de esa enfermedad en muchos países.
- La epidemia VIH/SIDA.
- La drogoresistencia de las cepas de *Mycobacterium TB* (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).

Actualmente el futuro de la producción lechera está condicionada a la calidad de los productos que puedan colocarse en el mercado interno y/o externo, para lo cual debe producirse leche de calidad higiénica y sanitaria. Una serie de enfermedades en los bovinos, entre ellas la TB causada por el *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), representan una condicionante que limita la comercialización de este producto, deprimiendo por otro lado, los parámetros productivos de los animales afectados y constituyendo fuente de infección para el hombre (Delgado y González, 2000).

La enfermedad de TBB es de importancia económica, como el ganado que da positivo a la reacción de tuberculina, la leche baja de precio y la carne es condenada en el rastro (Scanlon y Quinn, 2000).

Según la OMS los recursos financieros totales necesarios para la lucha mundial contra la TB (para la aplicación, incluido el desarrollo de capacidades, y para la investigación) fueron de US\$ 2200 millones anuales en 2004 y 2005, con un déficit anual estimado de US\$ 800 millones. Este aumento de la financiación tendrá que provenir tanto de los países con elevadas tasas de incidencia de TB como de fuentes exteriores (OMS, 2005).

En lo referente a las pérdidas productivas que se ocasionan en un establo productor de leche se mencionan a continuación.

1. Se disminuye la fertilidad hasta un 6%.
2. Las vacas en ordeña disminuyen la producción láctea en un 10% a 17% del total de la producción lechera.
3. La duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia. El promedio de 270 días en la 1ª lactancia se reduce a la mitad en la séptima lactancia (131 días).
4. Se produce un lento aumento del peso del animal o disminución gradual del mismo (caquexia). Se pierde en promedio el 15% del peso normal.
5. Causa predisposición a otras enfermedades, como efecto secundario hay reducción de la inmunidad y aumenta la susceptibilidad a otras enfermedades: Leucosis bovina y otras infecciones.
6. La esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre el 5 al 10%.
7. Disminución en la producción de carne en bovinos.
8. Pérdida de parición de terneros en hembras tuberculosas (Badillo-Rosales, 2004).

En lo que se refiere a la situación mundial sobre la tuberculosis en 1990, la Unidad de Tuberculosis de la OMS, realizó una evaluación para determinar la situación actual de la TB. Según los resultados de esa evaluación, en 1990 hubo en el mundo 1 722 millones de infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, ocho millones de casos nuevos de TB y de 2.6 a 2.9 millones de defunciones por esta misma causa (García-García *et al.*, 1995).

En términos globales se reportan aproximadamente cada año 10 millones de nuevos casos de TB de los cuales tres 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 superiora 70 por 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 1ero y 2do lugar, y América Latina con 250-300 mil nuevos casos se ubica en el 3er lugar. Y Brasil, Perú y México son los países que tienen las mayores incidencias (Mariscal-Méndez *et al.*, 2005).

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;4 para el año 2001 15,269 casos; para el año 2002, 14,310 casos,5 en el año 2003, 14,852 y para el 2004, 13,392. Y a los estados de Baja California, Chiapas, Nuevo León y Veracruz, como aquellos con las mayores aportaciones (Mariscal-Méndez *et al.*,2005). Para el año 2000 la OMS consideró a México entre los países con tasas de morbilidad intermedia (mayor de 25 y menor de 49 casos por 100 000 habitantes), lo cual significa que las actividades de detección y diagnóstico deben realizarse de manera intensiva (SSA, 2001).

Para la SSA durante el año 2000 se registraron 15 649 casos de tuberculosis pulmonar que correspondió a una morbilidad acumulada de 15.6 por 100 000 habitantes, en este año las cifras estatales de morbilidad tuvieron como cifra inferior 3.03 por 100 000 en el estado de Tlaxcala, y como cifra máxima 38 por 100 000 en el estado de Tamaulipas. Los estados con incidencias mayores fueron Tamaulipas, Baja California, Guerrero, Veracruz, Nuevo León, Nayarit, Sinaloa, Tabasco, Chiapas y Colima y los estados con menor morbilidad fueron Tlaxcala, Zacatecas, Guanajuato, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Yucatán, Aguascalientes, Puebla y Jalisco (SSA, 2001).

La TB representa la décima causa de mortalidad general; en el grupo de edad de 25 a 64 años, ocupa el octavo lugar. La tasa de mortalidad reportada a nivel nacional en 1992 fue de 6 por 100 000 habitantes; según esta notificación 13.6% de estas muertes se debieron a TB extra pulmonar. Se estima que ocurren 6 000 defunciones por año a causa de la TB. En este mismo año, la letalidad a nivel nacional fue de 35% (García-García *et al.*,1995).

## V. MATERIAL Y METODOS

### 5.1. Localización geográfica de la Comarca Lagunera

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, con domicilio Periférico y carretera Santa Fe S/N, en Torreón Coahuila, México. Ciudad que forma parte de la Comarca Lagunera de Coahuila.

La Comarca Lagunera se ubica en la parte central de la porción norte de la Republica Mexicana, entre los meridianos 102 grados 00' y 104 grados y 47' longitud oeste del meridiano de Greenwich y los paralelos 24 grados 22" y 26 grados 53' latitud norte.

La extensión territorial es de 47887 Km<sup>2</sup>, distribuidos en 15 municipios, siendo 5 del estado de Coahuila y 10 de Durango. El 88% de la superficie es semiplano.

La temperatura media anual histórica es de 23.1° C, siendo su máximo de 41.5° C y su mínimo de - 5.5° C. La precipitación promedio anual es de 262 mm siendo 4 los meses lluviosos (junio-septiembre)(Aguilar-Valdés y Luévano-Gonzáles, 2001).

### 5.2. Sitio de muestra

Se realizaron muestreos de animales que reaccionaron positivos a la aplicación de la tuberculina de acuerdo a la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina, en un establo determinado en algún lugar de la Comarca Lagunera.

### 5.3. Toma de muestras

Las muestras provenían de vacas tanto enfermas de tuberculosis bovina como sanas de acuerdo con las pruebas de tuberculina de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina, los 25 animales tanto enfermos como sanos se tomaron al azar para la toma de muestra, la cual se extrajo con los animales colocados en las tramas de los comederos quedando inmovilizados de la cabeza, utilizando hisopos de 15 cm. que se introdujeron en su totalidad

por las fosas nasales para la extracción de exudado nasal exprimiéndose dentro de un tubo con tapón de rosca de 18 X 150 que contenía 5 ml. de una solución salina al 0.85% y colocándose dentro de un recipiente con hielo hasta la llegada al laboratorio. Se utilizaron dos hisopos una para cada fosa y cada uno se colocaba en diferente tubo uno fue para realizar la tinción de Ziehl-Neelsen y siembra de la muestra, mientras que, el segundo se empleo para la determinación de *M. bovis* por medio de la técnica de PCR.

#### **5.4. Extracción del Ácido Desoxirribonucleico (DNA)**

Uno de los hechos mas importantes en la PCR es la cantidad de DNA de la muestra a ser sujeto a amplificación y no necesariamente tiene que ser alta. Unas cuantas células o un lisado crudo preparado por simple ebullición de pocas células en agua, son adecuados para una amplificación exitosa. El criterio esencial es que la muestra contenga por lo menos una cadena de DNA intacta que abarque la secuencia a amplificar y que las impurezas estén lo suficientemente diluidas para que no inhiban la polimerización (Martínez-Vázquez y Morales Loredo, 2004).

##### *5.4.1. Protocolo Para La Extracción Del ADN Por Exudado Nasal*

- Las muestras se calentaron en agua en ebullición por 5 minutos, una vez frías se guardaron a -20° C las que no se utilizaron (Edwards *et al.*,1991). Algunos autores dicen que calentar el cultivo a 80° C puede inactivarlo (Somerville *et al.*,2005).
- Se tomó 1 ml del líquido y vaciarlo en un tubo de Eppendorf de 1.5 ml.
- Se Centrifugó 1 minuto a 10,000 rpm.
- Se tiró el sobrenadante, decantando los tubos Eppendorf.
- Se repirieron los pasos anteriores, hasta terminar por completo con la muestra.
- Se adicionó 400 µl de TE IX pH 8.0
- Se adicionó 50 µl de lisozima de una concentración de 10 mg/ml, agitar por inversión.
- Se incubó 1 hora a 37° C por una hora, o bien toda la noche.

- Se adicionó 100  $\mu$ l de proteinasa K de una concentración de 10 mg/ml, e Incubar a 10 minutos a 65° C.
- Se adicionó 100  $\mu$ l de NaCl al 5M más 100  $\mu$ l de buffer CTAB, e Incubar a 10 minutos a 65° C.
- Se colocó las muestra en ebullición por 5 minutos.
- Incubar 100° C por 5 minutos, para inactivar las enzimas.
- Se esperó 5 minutos para que las muestras alcancen la temperatura ambiente.
- Se añadió 600  $\mu$ l de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y mezclar por inversión.
- Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml.
- Se adicionó 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico (por ejemplo si obtenemos 600  $\mu$ l de sobrenadante, añadimos 360  $\mu$ l de alcohol isopropílico) y mezclar por inversión.
- Se incubó a -20° C por 30 minutos, o bien, toda la noche, para precipitar los ácidos nucleicos y centrifugar a 10,000 rpm por 15 minutos.
- Con frecuencia, después de centrifugar se pudo apreciar un pequeño pellet blanco en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante, dejando aproximadamente 20  $\mu$ l de alcohol isopropílico.
- Se adicionó 1 ml de alcohol etílico al 70 %.
- Se mezcló para lavar el pellet.
- Se centrifugó a 10, 000 rpm por 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante.
- Se dejó secando a temperatura ambiente, hasta que el tubo este completamente seco.
- Se adicionó 20  $\mu$ l de TE 1X pH 8.0
- Se mezcló suavemente para recuperar el pellet.
- Se almacenó a -20° C por tiempo indefinido.

### **5.5. La Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La PCR se realizo en tubo de Eppendorf de 0.5 ml para microcentrífuga, empleando un Termociclador Perkin Elmer 5,500 estos tubos estaban perfectamente estériles para evitar la contaminación del ADN.

La reacción de PCR anidada se realiza en dos etapas, una primera reacción utiliza un par de iniciadores externos, la cual sirve como templado para una segunda reacción de PCR con un par de iniciadores internos, como DNA blanco se utilizan la secuencia de inserción IS6110, la cual es específica para el complejo de *M. tuberculosis*. Los primers empleados fueron Tb294 (5'-GGA CAA CGC CGA ATT GCG AAG GGC -3') y Tb 850 (5'-TAG GCG TCG GTG ACA AAG GCC ACG -3'), ambos a una concentración 25 picomoles y los primers internos fueron Tb505 (5'-ACG ACC ACA TCA ACC -3') y Tb670 (5'-AGT TTG GTC ATC AGC C- 3'), ambos a una concentración de 37.5 picomoles.

Los diferentes modos de temperaturas para la ampliación se programaron de dos etapas para lograr la PCR anidada. La primera etapa consta de 95° por 5 minutos de iniciación, con 30 ciclos de 95° por 30 segundos, 65° por 45 segundos y 72° por 1 minuto, y por ultimo una temperatura de extensión de 72° por 3 minutos. Procedimiento el cual nos proporcionó un producto de 583 pb que fue generado por los *primers* Tb294 y Tb850.

La segunda etapa consta de una temperatura inicial de 93 grados por 5 minutos, con 20 ciclos de 93 grados por 30 segundos, 50 grados por 45 segundos y 72 grados por 1 minuto con una extensión final de 72 grados por 3 minutos, el producto formado en los 30 ciclos anteriores actuó como blanco para el *primers* marcado mas corto que es el Tb505 y Tb670 por lo tanto se genero un producto de 183 pb.

El blanco para la PCR sencilla fue la secuencia de inserción IS6110, la cual es específica para el complejo de *M. tuberculosis*. Los *primers* empleados fueron 6110 R (5' CTC GTC CAG CGC CGC TTC GG 3') y 6110 L (5' CCT GCG AGC GTA GGC GTC GG 3').

Los tiempos de temperatura se programaron de la siguiente manera; 94° c por 10 minutos, con 50 ciclos de 94° C por 45 segundos y 72° C por 2.15 minutos, y por ultimo una temperatura de extensión de 72° c por 10 minutos, el producto formado en los 50 ciclos anteriores actuó como blanco para el *primers* indicado, se generó un producto de 193 pb.

Como controles de la reacción de ambas PCR se utilizaron DNA de cepa de referencia *M. bovis* del patógeno a detectar en este caso *M. bovis* y como control negativo agua (Morales-Loredo *et al.*,2004).



## 5.6. Preparación de corrida para PCR

**Cuadro 5.** PCR anidada, concentraciones para la 1<sup>a</sup> Reacción con iniciadores externos

REACTIVOS	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l) para una reacción de PCR
Buffer	1X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1.0Mm	2 $\mu$ l
dNTP's	0.2mM	2 $\mu$ l
Iniciador Externo 1	25 picomoles	1 $\mu$ l
Iniciador Externo 2	25 picomoles	1 $\mu$ l
DNA Polimerasa	2.5 U	0.5 $\mu$ l
DNA molde (Extracto Crudo)		2 $\mu$ l
Agua		Volumen necesario para un total de 25 $\mu$ l

**Cuadro 6.** Concentraciones para la 2<sup>a</sup> Reacción con iniciadores internos

REACTIVOS	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l) para una reacción de PCR
Buffer	1X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1.0mM	2 $\mu$ l
dNTP's	0.2mM	2 $\mu$ l
Iniciador Interno 1	37.5 picomoles	1.5 $\mu$ l
Iniciador Interno 2	37.5 picomoles	1.5 $\mu$ l
DNA Polimerasa	2.5 U	0.5 $\mu$ l
DNA de la 1 <sup>a</sup> reacción de PCR		2 $\mu$ l (Producto PCR de la 1 <sup>a</sup> reacción)
Agua		Volumen necesario para un total de 25 $\mu$ l

**Cuadro 7.** Volumen para la PCR sencilla

REACTIVOS	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l) para una reacción de PCR
Buffer	1X	2.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1.0Mm	2 $\mu$ l
dNTP's	0.2mM	2 $\mu$ l
Primers 6110 R	25 picomoles	1 $\mu$ l
Primers 6110 L	25 picomoles	1 $\mu$ l
DNA Polimerasa	2.5 U	0.5 $\mu$ l
DNA molde (Extracto Crudo)		2 $\mu$ l
Agua		Volumen necesario para un total de 25 $\mu$ l

(Morales-Loredo *et al.*,2004)

Como controles de la reacción de PCR se utiliza DNA de cepa de referencia *M. bovis* del patógeno a detectar en este caso *M. bovis* y como control negativo agua (Morales-Loredo *et al.*,2004).

### 5.7. Electroforesis en gel de Agarosa

La electroforesis en gel, es el procedimiento mediante el cual moléculas cargadas (DNA o RNA), migran hacia el cátodo (negativo) o ánodo (positivo) cuando se les somete a un campo eléctrico dependiendo de su tamaño, carga y estructura tridimensional. La velocidad de migración de cada molécula esta determinada por la densidad de carga de la molécula, el voltaje aplicado y la porosidad del gel. El gel de azarosa es una red compleja de fibrillas y el tamaño del poro puede controlarse variando la concentración de acuerdo al tipo y tamaño de la molécula. Los ácidos nucleicos migran a través de estos poros dependiendo de su tamaño y de su forma, de tal manera que las moléculas pequeñas y compactas migran más rápido que las grandes y relajadas. Después de un tiempo definido de migración, la ubicación de las moléculas (DNA) en el gel, son observadas después de la tinción con colorantes de intercalación fluorescentes (bromuro de etidio). Las bandas de DNA o RNA con concentraciones de 1–10 ng pueden ser detectadas por examinación directa del gel sobre luz ultravioleta (Martínez-Vázquez y Morales-Loredo, 2004).

Para visualizar los productos de la reacción de PCR se realizó una electroforesis en geles de Agarosa.

- a) Se preparó un gel de Agarosa al 1.5% (0.45 gr. de Agarosa y 30 ml de TBE 1X)
- b) Se colocó dentro de la cámara de electroforesis conteniendo TBE 1X.
- c) En un Parafilm se colocó 1  $\mu$ l de jugo azul por cada muestra, tomando en cuenta el marcador de peso molecular.
- d) Se tomó de cada tubo de la segunda reacción de PCR de 3  $\mu$ l y lo mezcle con el jugo azul en la puntilla para depositarla en el orificio del gel de Agarosa.
- e) Se repitió este paso hasta terminar con la ultima muestra, tomando en cuenta el marcador de peso molecular.

- f) Se dejó correr la electroforesis aproximadamente de 30 a 40 min. a 90 Volts.
- g) Al terminar la corrida del gel, se sumergió en bromuro de etidio ( $1 \times 10^{-3}$  mg/ml) por 5 minutos para teñirlo.
- h) Después de esto se sumergió en un recipiente con agua corriente por 10 minutos.
- i) Se observó en un transiluminador de ultravioleta.
- j) Y por último, se anotaron las observaciones.

## VI. RESULTADOS

De acuerdo al presente estudio se describen los siguientes resultados; De las 85 muestras de exudado nasas, 20 de ellas fueron negativas a la PCR anidada (cuadro 7), mientras que por cultivo dos resultaron positivas (2 y 5) y cinco por la tinción de Ziehl-Nelsen (10, 11, 13,14 y 20).

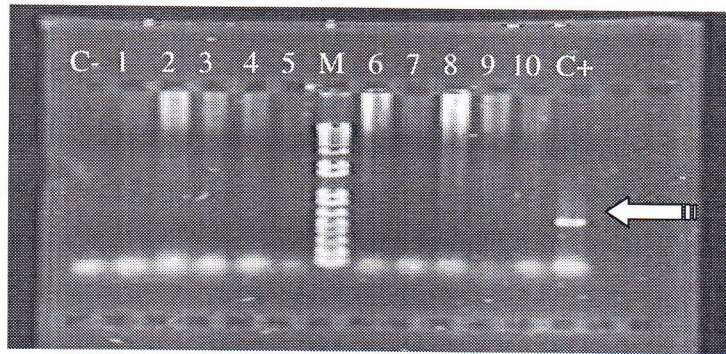
La sensibilidad para la detección del DNA control (para la PCR anidada) fue de hasta  $10^{-3}$  como se puede observar en la figura 14, lo cual demuestra el poder de detección. Sin embargo, en una segunda corrida de PCR, la detección del DNA control, no fue posible detectarlo, por lo tanto, las pruebas no pueden ser consideradas como negativas y se optó por cambiar a la técnica estandarizada de PCR simple empleada por el Laboratorio de la Unión Ganadera Regional de Guadalupe, Nuevo León.

Al cambiar a la técnica de PRC sencilla, a pesar de los cambios y modificaciones en las condiciones de la PCR, no fue posible obtener amplificaciones del DNA control como se presenta en la Figura 15.

**Cuadro 8.** Resultados obtenidos de los diferentes tipos de pruebas

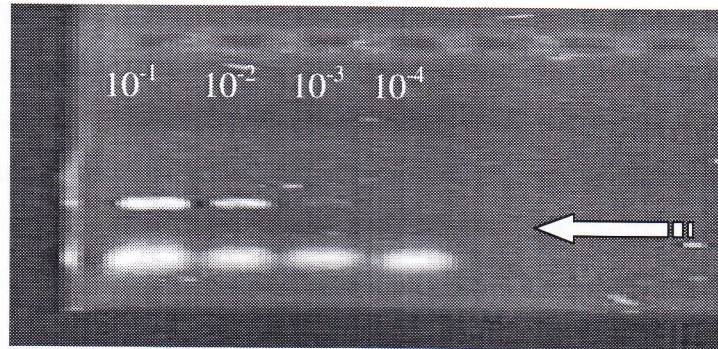
Muestra	Clave de bitácora	Resultado Tuberculina	Resultado PCR	Resultado de ZN	Resultado Middlebrook 7H10
1	11	Positiva	Negativo	Negativo	Negativa
2	12	Positiva	Negativo	Negativo	Positiva
3	13	Positiva	Negativo	Negativo	Negativa
4	14	Positiva	Negativo	Negativo	Negativa
5	15	Positiva	Negativo	Negativo	Positiva
6	16	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo
7	17	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo
8	18	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo
9	19	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo
10	110	Positiva	Negativo	Positiva	Negativo
11	11	Positiva	Negativo	positiva	Negativo
12	12	positiva	Negativo	Negativo	Negativo
13	13	Positiva	Negativo	Positiva	Negativo
14	14	positiva	Negativo	Positiva	Negativo
15	15	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo
16	16	positiva	Negativo	Negativo	Negativo
17	17	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo
18	18	positiva	Negativo	Negativo	Negativo
19	19	Positiva	Negativo	Negativo	Negativo
20	20	Positiva	Negativo	positiva	Negativo

**Figura 13.** Resultados de la PCR, utilizando 6  $\mu$ l de DNA blanco

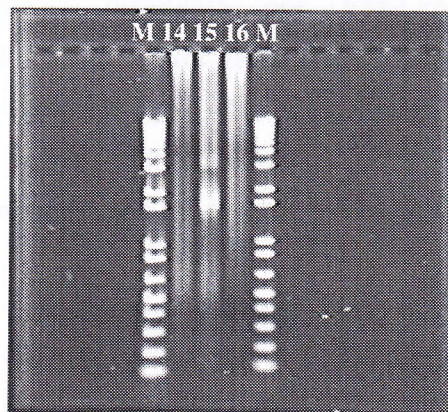


C- (control negativo), C+ (control positivo).  
M (marcador de peso molecular).  
Número 1-10 son las muestras.

**Figura 14.** Sensibilidad de la PCR de las diluciones del DNA control



**Figura 15.** Pruebas de PCR sencilla



M. Marcador  
14-16 muestra

## VII. DISCUSIÓN

La técnica de PCR se considera que presenta sensibilidad (53-87%) y especificidad (88-100%) en laboratorios donde se tiene bien estandarizada la técnica (Estrada-Chávez *et al.*,2004; Marchetti *et al.*,1998), siendo este proceso indispensable, debe tenerse en cuenta que hay factores que la inhiben, desde la persona que la realiza hasta los contaminantes que pueden intervenir en una falsa detección de las bandas en el momento de la lectura final de acuerdo. La contaminación y otros factores íntimos a la reacción en cadena de la polimerasa, aun aparentemente materiales inertes, pueden causar inhibición en alguno de los puntos de la interacción molecular. Su modo de acción no es del todo comprendido, pero esta puede ser una interferencia química o física con disponibilidad o actividad de uno de los componentes esenciales. La contaminación puede ser endógena (muestra, enzima y tubos) o exógena (bacterias, polvo, y polen) a los componentes de la reacción, en donde encontramos constituyentes de las células bacteriales, DNA no blancos y contaminantes y componentes del laboratorio como por ejemplo polen, polvo de los guantes, utensilios de plástico y celulosa del laboratorio. Los inhibidores comunes incluyen varios componentes de los fluidos corporales y reactivos encontrados en las ciencias clínicas y forenses (hemoglobina, urea y heparina), constituyentes de alimentos, (glicógenos, grasas y  $Ca^{2+}$ ), y compuestos ambientales (metales pesados) (Wilson, 1997).

De acuerdo con lo estipulado por Díaz-Otero *et al.*,2003, se ha demostrado que el 30% de la vacas tuberculosas expulsan *M. bovis* a través del tracto respiratorio. Sin embargo, por estudios realizados por el Dr. Morales-Loredo (resultados no publicados), se encontró una sensibilidad de la prueba de PCR de 90.5% y la especificidad de 58.3%, tomando 420 animales positivos a tuberculina.

En general, el procesamiento de muestra, para la realización de un diagnostico, es de antemano un factor que influirá en el resultado final. El exudado nasal no es la excepción, así mismo, se ignora el estado inmunológico del animal, a pesar de ser considerado un reactor positivo por la prueba de tuberculina. Sería útil, poder tener pruebas complementarias como pudiera ser la prueba de Gama interferón y/o prueba de Adenosin Deaminase (ADA) cuya especificidad y sensibilidad son de orden de 0.97-0.91% y 100-100% respectivamente (Sharma y Banga, 2005).

## VIII. CONCLUSIONES

La técnica de PCR no fue significativa para el diagnóstico de tuberculosis bovina en exudado nasal.

La sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR par el diagnóstico de la tuberculosis bovina fue menor a lo reportado en la literatura (sensibilidad 90.5% y la especificidad de 58.3%).

Es necesario estandarizar la técnica modificando el protocolo tomando en cuenta el proceso de toma de muestra y probar nuevos métodos para la técnica de PCR.

## IX. LITERATURA CITADA

1. **Abdala, A.**, y H. Tarabla 2005, posting date. Tuberculosis Bovina. <http://rafaela.inta.gov.ar/default.htm>.
2. **Aguilar-Valdés, A.**, y A. Luévano-Gonzáles. 2001. Situación Actual de la Cuenca Lechera de la Comarca Lagunera, México. Información técnica económica agraria, Torreón, Coahuila, México.
3. **Alfredo Delgado C., A.**, y A. González Z. 2000. Evaluación de la Prueba de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (ELISA) en el Diagnóstico de la Tuberculosis Bovina. *Rev Inv Vet Perú* 11:132-139.
4. **AMGEN** 2005. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). [http://biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pak\\_biotec.inicio](http://biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pak_biotec.inicio).
5. **Aranaz, A.**, E. Liébana, A. Mateos, L. Domínguez, D. Vidal, M. Domingo, O. González, E. Rodríguez-Ferri, B. A. E., V. J., y D. Cousins. 1996. Spacer aligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2734-2740.
6. **Araujo, Z.**, and J. H. Waard. 2004. Curso Latinoamericano Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina, de Caracas Venezuela., Venezuela.
7. **Badillo-Rosales, O.** 2004. Obtención de Cepas de *Mycobacterium bovis* a Partir de Tejidos Sospechosos a Tuberculosis Bovina, en Medio de Cultivo de Lowenstein - Jensen. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Torreón, Coahuila, México. Pág. 66
8. **Báez-Saldaña, A. R.**, J. Pérez-Padilla, y M. A. Salazar-Lezama. 2003. Discrepancias Entre los Datos Ofrecidos por la Secretaria de Salud y la Organización Mundial de la Salud Sobre Tuberculosis en México, 1981-1998. *Salud Pública Méx.* 45:78-83.
9. **Barlow, N. D.**, J. M. Kean, N. P. Caldewell, and T. J. Ryan. 1998. Modelling the regional dynamics and management of bovine tuberculosis in New Zealand cattle herds. *Prev. Vet. Med.* 36:25-38.
10. **Blancarte-Melendres, L.**, G. Anzaldo-Jaime, y S. Balandrano-de Espindola. 1992. Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio en Tuberculosis, Vol. 20. Secretaría de salud, México.
11. **Bontá, D. M.** 2004. Tuberculosis en ganado (Tuberculosis bovina) Protegiendo la salud humana. Department of Health Services:1-2.
12. **Caimi, K.**, M. I. Romano, A. Alito, M. Zumarraga, F. Bigi, and A. Cataldi. 2001. Sequence analysis of direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiology* 39:1067-1072.



13. **Campillo-Paez, M. T.**, E. Duro-Mota, y S. Causin-Serrano. 2001. Tuberculosis Ganglionar. *Medicina General* 35:529-532.
14. **Cosivi, O.**, J. M. Grange, C. J. Daborn, M. C. Raviglione, D. C. T. Fujikura, R. A. Robinson, H. F. A. K. Huchzermeyer, I. De Kantor, and F. X. Meslin. 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emer. Infect. Dis.* 4:58-70.
15. **Costa, J.** 2004. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a Tiempo Real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22:299-305.
16. **Cousins, D. V.** 2001. Infección por *Mycobacterium bovis* y control del patógeno en el ganado. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 20:71-85.
17. **Delgado, C. A., y Z. A. González.** 2000. Evaluación de la Prueba de Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas (Elisa) en el Diagnóstico de la Tuberculosis Bovina. *Rev Inv Vet Perú.* 11:132-139.
18. **Delgado-González, R.** 1999. Histopatología de la tuberculosis bovina y diagnósticos diferenciales en la Comarca Lagunera. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. XXIII Congreso Nacional de Buiatría: 5-10.
19. **Díaz-Otero, F.**, V. Banda-Ruiz, L. Jaramillo-Meza, C. Arriaga-Díaz, D. González-Salazar y C. Estrada-Chávez. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet. Méx.* 34:13-26.
20. **Diegel, K. L.**, S. D. Fitzgerald, E. D. Berry, V. Church, S., M. W. Reed, G. J. Sikarskie, y B. J. Kaneene. 2002. Experimental Inoculation of North American Opossums (*Didelphis Virginiana*) With *Mycobacterium bovis*. *J. Wildlife Dis.* 38:275-281.
21. **Drews, G.** 2000. The roots of microbiology FEMS. *Rev. Microbiol.* 24:225-249.
22. **Edwards, K.**, C. Johnstone, y C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* 19:1349.
23. **Espinoza-Mata, A.**, y S. Lozano-Muñiz. 2004. Patógenos en Alimentos, p. 6-23. *In* A. Morales Loredo, I. Martínez-Vázquez, G. Álvarez Ojeda, y S. Lozano-Muñiz (Ed.), Manual para el diagnóstico de patógenos lácteos y carnes mediante PCR., Vol. Folleto técnico Núm. 5. INIFAP, Nuevo León, México.
24. **Estrada-Chávez, C.**, F. Díaz-Otero, C. Villegas-Arriaga, R. Pérez González, y D. González Salazar. 2004. Concordancia de la PCR y Métodos Rutinarios para el Diagnostico de Tuberculosis bovina. *Vet. Méx.* 35:225-236.

25. **FAO** 25-junio-2005 2005, posting date. Tuberculosis. <http://www.fao.org/ag/againfo/commissions/es/commission.html>  
Departamento de Agricultura Dirección de Producción y Sanidad Animal.
26. **Feizabadi, M. M.**, I. D. Robertson., D. V. Cousins., y D. J. H. 1996. Genomic Analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the Mycobacterium tuberculosis complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 34:1136-1142.
27. **Fisanotti, J. C.**, A. Alito., F. Bigi., O. Latini., E. Roxo., M. E. Cicuta., I. N. Kantor., A. Cataldi., y M. I. Romano. 1998. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South América. Vet. Microbiol. 60:251-257.
28. **Frothingham, R.** 1996. Aplications of the Polimerase Chain Reaction to Infectius Disease Diagnosis. Annals Saudi Med. 16:657-664.
29. **FSAI.** 2003. Zoonotic Tuberculosis and Food Safety. Scientific Committee:1-18.
30. **García-García, M. L.**, y J. Luis-Valdespino. 2001. Mycobacterium Tuberculosis en Pulmones sin Lesiones Tuberculosas, ¿Santuario Inmunológico? Rev. Invest. Clin. 53:460-461.
31. **García-García, M. L.**, M. E. Mayar-Maya, L. Ferreyra-Reyes, M. Palacios-Martínez, C. Álvarez-García, y J. L. Valdespino-Gómez. 1998. Eficacia y Eficiencia del Tratamiento Antituberculoso en Jurisdicciones Sanitarias de Morelos. Salud Pública de México. 40:421-429.
32. **García-García, M. L.**, J. L. Valdespino-Gómez, M. Palacios-Martínez, M. E. Mayar-Maya, C. García-Sancho, y J. Sepúlveda-Amor. 1995. Tuberculosis y SIDA en México. Salud Pública de México 37:539-548.
33. **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. Mayes., L. Keating., P. R. Wheeler., J. Parkhill., B. G. Barrell., S. T. Cole., S. V. Gordon. y R. G. Hewinson. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A 100:7877-7882.
34. **González-Montaner, L. J.**, y P. González-Montaner. 1995. Tuberculosis, pasado, presente y futuro. Respiración 10:89-92.
35. **Gutiérrez, M.**, S. Samper., J. A. Gavigan., C. García-Marín., Y C. Martín. 1995. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* satrains causing tuberculosis in cattle and goats. J. Clin. Microbiol. 33:2953-2956.
36. **Haddad, N.**, M. Masselot, y B. Durand. 2004. Molecular Differentiation of *Mycobacterium bovis* Isolates. Review of Main Techniques and Applications. Research Vet. Science:1-18.

37. **Hugenholtz, P.**, B. M. Goebel, and N. R. Pace. 1998. Minireview: Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol* 180:4765-4774.
38. **Jae-Hoon, K.**, K. Kyung, K. Won-II, A. Jong-Sam, and J. Young-Hwa. 2002. *Mycobacterium bovis* Infection in a Farmed Elk in Korea. *J. Vet. Sci.* 3:163-166.
39. **José-Gutiérrez, J.** 2004. Diagnóstico de la Tuberculosis Bovina por la Reacción en Cadena de la Polimerasa a Partir de Tejidos Sospechosos Incluidos en Parafina. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, Torreón, Coahuila, México. Pág. 80.
40. **Kantor, I. N.**, y E. Alvarez. 1991. Current status of bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean. Pan American Zoonoses Center, Martinez, Argentina. Special Publication No 10:48.
41. **LoBue, P. A.**, J. J. LeClair, and K. S. Moser. 2004. Contact investigation for cases of pulmonary *Mycobacterium bovis*. *J. Tuberc Lung Dis.* 8:868-872.
42. **Loera-Castañeda, V.**, J. Sánchez-Corona, y M. C. Morán-Moguel. 2003. El Papel de las Técnicas de Biología Molecular en el Diagnóstico y Control de Tuberculosis. *Gac Méd Méx.* 139:288-290.
43. **López-Artuñano, F. J.** 1997. Usos y Efectos del Bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (vacunación con BCG). *Salud Pública de México* 39:156-161.
44. **Lozada-Méndez, M.** 2005. Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa <http://www.monografias.com/trabajos11/tamau/tamau.shtml>.
45. **Mar-Casal, M.**, y M. Casal. 2000. Las Micobacterias Atípicas como Patógenos Emergentes. *Enf Emerg* 2:220-230.
46. **Marchetti, G.**, A. Gori, L. Catozzi, L. Vago, M. Nebuloni, M. C. Rossi, A. D. Esposti, A. Bandera, y F. Franzetti. 1998. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays. *J Clin Microbiol* 36:1512-1517.
47. **Mariscal-Méndez, A.**, C. J. Ramírez-Palacios, L. González-Sánchez, y R. Zenteno-Cuevas. 2005. Pobreza, resistencia a los medicamentos, diagnóstico, VIH-SIDA y su impacto en la evolución de la tuberculosis en México. *Méd UNAB* 8:37-42.
48. **Martínez, T. M. A.**, Y. Pino, T. Salazar-B., E. Jovel-L., C. Caroca-C., M. A. Espinoza-N., y L. F. Avendaño-C. 2005. Utilidad de la Reacción de Polimerasa en Cadena para la Detección de *Mycoplasma pneumoniae* en Adultos Mayores con Neumonía Adquirida en la Comunidad. *Rev Chil Infect.* 22:251-256.

49. **Martínez-Báez, M.** 2000. Cuotas de Productos que se Autorizan al Instituto Nacional de Diagnósticos y Referencias Epidemiológicas. S.H.C.P.
50. **Martínez-Vázquez, I.,** y A. Morales Loredo. 2004. Extracción de ácidos nucleicos, *In* A. Morales Loredo, I. Martínez-Vázquez, G. Álvarez-Ojeda, y S. Lozano-Muñiz (Ed.), Manual para el diagnóstico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR., Vol. 5. INIFAP-CIRNE, Nuevo León, México. p. 51-59.
51. **Martínez-Vázquez, I.,** y A. Morales-Loredo. 2004. Electroforesis de Ácidos Nucleicos, *In* A. Morales Loredo, I. Martínez-Vázquez, G. Álvarez Ojeda, y S. Lozano Muñiz (Ed.), Manual para el diagnóstico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR, Vol. 5. INIFAP-CIRNE, Nuevo León, México. p. 65-72.
52. **Mazars, E.,** S. Lesjean., A.-L. Banuls., M. Gilbert., V. Vincent., B. Gicquel., M. Tibayrenc., C. Locht., and P. Supply. 2001. High-resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:1901-1906.
53. **Milena-Baron, L.** 2005, posting date. Tuberculosis Bovina.
54. **Milián-Suazo, F.,** L. García-Casanova, y A. Anaya-Escalera. 2004. Distribución de Enfermedades de Importancia Económica de los Animales Domésticos en México. INIFAP, Querétaro, QRO.
55. **Milián-Suazo, F.,** C. O. Serna-González, V. Banda-Ruíz, G. Robles-P, C. Arriaga-Díaz, y M. Anaya-Escalera. 2004. Determinación de la Estabilidad Genética de una Cepa de *Mycobacterium bovis* por Infecciones Seriadadas en Cobayos. *Téc. Pecu. Méx.* 42:315-323.
56. **Montes-de Oca, R.** 2004. Estructura y Síntesis del ADN, p. 33-44. *In* A. Morales-Loredo, I. O. Martínez-Vázquez, G. Álvarez-Ojeda, y S. Lozano-Muñiz (Ed.), Manual para el Diagnostico de Patógenos en lácteos y Carne Mediante PCR., Vol. 5. INIFAP, Nuevo León, Méx.
57. **Moore, D. F.,** y I. J. Curry. 1998. Detection of the mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by ligase chain reaction. *Clin. Microbiol.* 36:1028-1031.
58. **Morales-Loredo, A.,** y I. O. Martínez-Vázquez. 2004. Optimización de la PCR, p. 45-50. *In* A. Morales-Loredo, I. O. Martínez-Vázquez, G. Álvarez-Ojeda, y S. Lozano-Muñiz (Ed.), Manual para el Diagnóstico de Patógenos en lácteos y Carnes Mediante PCR, Vol. 5. INIFAP, Nuevo León, Méx.
59. **Morales-Loredo, A.,** G. Mendoza-Dávila, y I. Martínez-Vázquez. 2004. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* en tejidos de parafina., p. 86-90. *In* A. Morales Loredo, I. Martínez-Vázquez, G. Álvarez Ojeda, y S. Lozano-Muñiz (Ed.), Manual para el diagnostico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR, Vol. 5. INIFAP, Nuevo León, México.

60. **Morán-López, E.**, y Y. Lazo-Amador. 2001. Tuberculosis. Rev. Cubana Estomatol. 38:33-51.
61. **Mostowy, S.**, J. Inwald, S. Gordon, C. Martin, R. Warren, K. Kremer, D. Cousins, and M. A. Behr. 2005. Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. J. Bacteriol. 187.
62. **Neill, S. D.**, R. A. Skuce, and J. M. Pollock. 2005. Tuberculosis – New Light From an Old Window. J.Appl. Microbiol. 98:1261-1269.
63. **O'Reilly, L. M.**, and C. J. Daborn. 1995. The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuber. Lung Dis. 76:1-46.
64. **OMS.** 2005. Financiación sostenible de la prevención y el control de la tuberculosis. Organización Mundial de la Salud A58/7:1-4.
65. **Osorio-Martínez, F. J.** 2005, posting date. Tuberculosis bovina. <http://www.fedegan.org.co/78edicion.html>.
66. **Peñuelas-Urquides, K.** 2004. Detección del Complejo Mycobacterium Mediante PCR Apartir de Exudado Nasal Bovino. Universidad Autonoma de Nuevo León, Monterrey, México.
67. **Plorde, J. J.** 2004. Mycobacterias, p. 477-496. In K. J. Ryan y R. George (ed.), Sherris Microbiología Médica una Introducción a las Enfermedades Infecciosas, vol. cuarta edición. McGraw-Hill.
68. **Prescott, L. M.**, J. P. Harley, and D. A. Klein. 2002. Microbiología, Quinta ed, vol. 39. McGraw-Hill.
69. **Quinn, P. J.**, B. K. Markey, M. E. Carrter, W. J. Donnelly, and F. C. Leonard. 2002. Mycobacterium species. Black Well Publishing.
70. **Ramírez-Casillas, I.**, M. Santillán-Flores, C. Arriaga-Díaz, B. Arellano-Reynoso, and F. Morales-Alvarez. 2004. Empleo de una PCR-multiplex para diferenciar caprinos vacunados con M. bovis BCG de infectados con M. bovis de campo. Téc. Pecu. Méx. 42:419-428.
71. **Ramzis-Cotran,** Vinay-Kumar, Path-Tucher, y Collins. 2000. Patología Estructural y Funcional, 6a Ed. McGraw-Hill, México, D.F.
72. **Reyes-Corcho, A.**, M. Díaz-Jidy, y A. Pérez-Rodríguez. 2004;. Tuberculosis y SIDA: Algunos Aspectos Clínicos y Epidemiológicos en 72 Enfermos Cubanos. Rev. Cubana Med Trop 1 56:35-42.
73. **Rodríguez, A. J.**, S. Palma, J. L. Maestre, D. Saavedra, T. Reyes, y M. Perovani. 2000. Detección de micobacterias en muestras clínicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa., p. 257-262, Revista Biomédica., Vol. 11.

74. **Rodríguez-Cuns, G.** s/f, posting date. Género *Mycobacterium*. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf>.
75. **Rodríguez-Sánchez, I. P.,** y H. A. Barrera-Saldaña. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL VII*, No. 3:323-335.
76. **Rosales, I., M.** 2003. Diagnóstico de Enfermedades en Plantas: Uso de Herramientas Moleculares. Unidad de Biotecnología - INIA-CRI La Platina.
77. **Ruiz-Manzano, J.,** M. J. Manterola, y J. Sauret. 1998. Nomenclatura y Clasificación de las Micobacterias. *Arch bronconeumol* 34:154-157.
78. **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.
79. **Scanlon, M. P.,** y P. J. Quinn. 2000. Inactivation of *Mycobacterium bovis* in cattle slurry by five volatile chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 89:854-861.
80. **Sechi, L. A.,** I. Dupre, M. Sanguinetti, G. Fadda, y S. Zanetti. 1999. Simple and rapid identification of different species of *Mycobacteria* by PCR. *Mol. Cel. Probes.* 13:141-146.
81. **Senado-Dumoy, J.** 1999. El Riesgo de Enfermar de Tuberculosis. *Rev Cubana Med Gen Integr* 15:168-175.
82. **SENASICA** 2005, posting date. Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). <http://www.senasica.sagarpa.gob.mx/index/index.html>.
83. **SENASICA** 2005, posting date. Comité Binacional México - E.U.A. para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina. <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/sen/qesen/Doc1358>.
84. **Sharma, S. K.,** y A. Banga. 2005. Pleural Fluid Interferon-gama and Adenosine Deaminase Levels in Tuberculosis Pleural Effusion: A Cost-Effectiveness Analysis. *J Clin Lab Anal* 19:40-46.
85. **Simon, S.,** y I. Listiawan. 2003. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Molecular Prespective. *J. Indon. Med. Assoc.* 4:26-35.
86. **Somerville, W.,** Thibert-Louise, Schwartzman-Kevin, y A. Marcel. 2005. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: a Question of Containment. *J. Clin. Microbiol.* 46:2996-2997.
87. **Sreevatsan, S.,** J. B. Bookout, F. Ringpis., V. S. Perumaalla., T. A. Ficht., L. G. Adams., S. D. Hagius., P. H. Elzer., B. J. Bricker., G. K. Kumar., M. Rajasekhar., S. Isloor., y R. R. Barathur. 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J. Clin. Microbiol.* 38:2602-2610.

88. **SSA.** 1995. Modificación a la norma oficial mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.:1-32.
89. **SSA.** 2001. Programa de Acción: Tuberculosis, Primera Ed, Vol. 1, México.
90. **Sue-Wall,** Kiran-Ghanekar, Johnjoe-McFadden, and J.-W. Dale. 1999. Context-sensitive transposition of IS6110 in mycobacteria. *Microbiology* 145:3169-3176.
91. **Tay-Savala, J.** 2003. *Microbiología y Parasitología Medica*, 3ra Ed. Méndez Editores, México.
92. **Thierry-Garnier.** 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *PNAS* 100:7877-7882.
93. **Toledo, P., M.,** y E. A. Santillán. 1999. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de Expectoración de Pacientes Humanos con Problemas respiratorios Crónicos. *Veterinaria México* 3:227-229.
94. **Wedlock, D. N.,** M. A. Skinner, G. W. Lisle, and B. M. Buddle. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infection and the risk to human population. *Microb. Infec.* 4:471-480.
95. **Wedlock, D. N.,** B. Vesosky, M. A. Skinner, G. M. De Lisle, I. M. Orme, and B. M. Buddle. 2000. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *J Infect Immun.* 68:5809-5815.
96. **Wikimedia** 2005, posting date. Reacción en cadena de la polimerasa. [http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci3n\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci3n_en_cadena_de_la_polimerasa).
97. **Wikson, M. S.,** R. McNerney, P. Godfrey-Faussett, G. Stoker, and Voller-Alister. 1993. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 31:776-782.
98. **Wilson, I. G.** 1997. Minireview: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3741-3751.
99. **Wolinsky, E.** 1999. *Tratado de Microbiología*, 3a Ed. SALVAT, Barcelona, España.