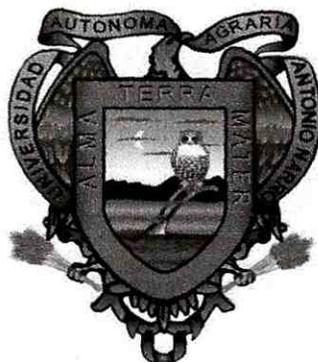


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**OBTENCIÓN DE CEPAS DE *Mycobacterium bovis* APARTIR DE
TEJIDOS SOSPECHOSOS A TUBERCULOSIS BOVINA, EN MEDIO
DE CULTIVO DE LOWENSTEIN-JENSEN.**

Por:

ODILÓN BADILLO ROSALES

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISISTO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**



UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**OBTENCIÓN DE CEPAS DE *Mycobacterium bovis* A PARTIR DE
TEJIDOS SOSPECHOSOS A TUBERCULOSIS BOVINA, EN MEDIO
DE CULTIVO DE LOWENSTEIN-JENSEN.**

POR:

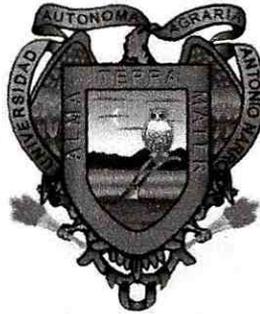
ODILÓN BADILLO ROSALES

ASESOR PRINCIPAL

Una firma manuscrita en tinta negra, que parece ser la del Dr. Jesús Vásquez Arroyo, escrita sobre una línea horizontal.

DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**



UNIDAD LAGUNA

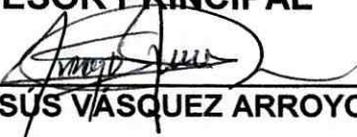
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**OBTENCIÓN DE CEPAS DE *Mycobacterium bovis* A PARTIR DE
TEJIDOS SOSPECHOSOS A TUBERCULOSIS BOVINA, EN MEDIO
DE CULTIVO DE LOWENSTEIN-JENSEN.**

POR:

ODILÓN BADILLO ROSALES

ASESOR PRINCIPAL



DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO

Co. ASESOR

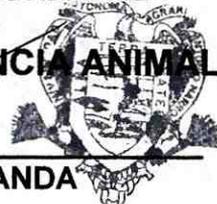


MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

COORDINACION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



MVZ. ERNESTO MARTINEZ ARANDA



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**



UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

PRESIDENTE

Firma manuscrita del Dr. Jesús Vasquez Arroyo.

DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO

VOCAL

Firma manuscrita de MC. Ramón Alfredo Delgado González.

MC. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ.

VOCAL

Firma manuscrita de MVZ E.P. Ma. Hortensia Cepeda Elizalde.

MVZ E.P. MA. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE

VOCAL SUPLENTE

Firma manuscrita de Dr. Agustín Cabral Martell.

DR. AGUSTIN CABRAL MARTELL

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | Pág. |
|---|------|
| Dedicatorias | I |
| Agradecimientos | II |
| Resumen | 1 |
| I . Introducción | 2 |
| II . Objetivos | 5 |
| III . Hipótesis | 5 |
| IV. Revisión de literatura | 6 |
| 4.1 Clasificación y nomenclatura bacteriana | 6 |
| 4.1.1 El complejo <i>Mycobacterium</i> | 7 |
| 4.1.2 Grupos Micobacteriales | 9 |
| 4.1.3 Especies de micobacterias | 10 |
| 4.1.4 Características generales | 11 |
| 4.1.5 <i>Mycobacterium bovis</i> | 11 |
| 4.2 Salud pública | 12 |
| 4.3 Pérdidas económicas por tuberculosis bovina | 15 |
| 4.4 Etiología de la Tuberculosis bovina | 16 |
| 4.5 Epidemiología | 17 |
| 4.5.1 Incidencia Mundial | 17 |
| 4.5.2 Incidencia Nacional | 18 |
| 4.6 Transmisión | 18 |
| 4.7 Reservorios | 20 |
| 4.8 Patología | 20 |
| 4.8.1 Signos clínicos | 31 |
| 4.8.2 Lesiones | 32 |
| 4.9 Obtención de aislados de <i>Mycobacterium</i> | 33 |
| 4.9.1 Preparación de muestras contaminadas | 33 |
| 4.9.2 Material de biopsia | 34 |
| 4.9.3 Cultivo Micobacteriano | 35 |
| 4.10 Métodos de diagnóstico | 39 |
| 4.10.1 Tuberculinización | 42 |
| 4.10.2 Análisis histopatológico | 42 |
| 4.10.3 Análisis Microbiológico | 43 |
| 4.10.4 Diagnostico molecular | 43 |
| a).- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 43 |
| b).- Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de | 44 |
| restricción por PCR (PCR-RFLP'S) | |
| 4.10.5 Pruebas serológicas (Elisa) | 44 |
| 4.10.6 Sistema BACTEC | 45 |
| 4.11 Control y erradicación de la tuberculosis | 46 |
| 4.11.1 Vacunación | 47 |
| 4.11.2 Tratamiento | 48 |
| V.- Materiales y Métodos | 49 |
| 5.1 Localización geográfica | 49 |
| 5.2 Sitio de muestreo | 49 |
| 5.3 Obtención y procesamiento de muestras | 49 |

DEDICATORIAS.

A mis padres

Que sin importarles nada siempre me apoyaron.

A mis hermanos y hermanas:

Marcos, Regina, Verónica, Alicia, Amalia, Rosalba, Enrique.

Que siempre me dieron su apoyo y comprensión cuando mas los necesite.

A mis sobrinos:

A todos ellos, por que con sus risas y juegos cada día, me enseñaron lo bonito de la vida.

A mi abuelita:

Por su cariño y comprensión y por sus consejos.

A mis tíos y cuñados.

A todos ellos por gran apoyo para lograr terminar mi carrera y por su comprensión.

A mis amigos.

Por su gran apoyo en los momentos mas difíciles y también por su comprensión gracias a todos ellos.

AGRADECIMIENTOS.

A mi madre y a mi padre por darme la vida, y por su apoyo incondicional, especialmente a mi madre, que nunca le importo hacer sacrificios para que yo lograra terminar con mi carrera.

A mis hermanos y hermanas por darme su apoyo, para que continuara estudiando, y por estar conmigo cuando mas lo necesite.

A mis tíos y cuñados por su apoyo moral y su comprensión, en etapas difíciles de mi carrera.

A mis sobrinos por que con su alegría de ser niños, siempre me dieron fuerza para lograr mi objetivo.

A mi abuela, porque siempre me apoyo moralmente sin importarle nada, que dios la bendiga.

A toda mi familia por haberme apoyado a lograr terminar mi carrera, y por que ellos son lo mas importante en mi vida.

A mi gran amigo Justino López Rodríguez, por ser mi amigo por su apoyo moral cuando mas lo necesite, por sus consejos y por ser mi amigo. Gracias siempre seremos amigos.

Al Dr. Jesús Vázquez por su gran apoyo para lograr titularme, por su gran sencillez que lo caracteriza como una persona muy especial.

A la MVZ. Ma. Hortensia Cepeda Elizalde por su gran disponibilidad para ayudarme, y por su gran sencillez.

Al Dr. Ramón A. Delgado González , por haber sido mi profesor y por el apoyo en este trabajo.

A la MVZ. Yolanda Martínez Carriles, por su gran apoyo en la realización de esta tesis.

A la Qbp. Sara E. Rojo Gómez por su colaboración y apoyo, así como disponibilidad para facilitar las instalaciones de la clínica de especialidades de IMSS de Torreón.

Al profesor y amigo Alfredo Rodríguez, por su gran apoyo y por sus consejos para seguir adelanté, sus consejos me ayudaron mucho gracias.

A todos mis compañeros de la escuela y fuera de ella fuimos grandes compañeros y seguiremos siendo grandes amigos, gracias por haberlos conocido.

A todos los profesores, por que con sus enseñanzas me ayudaron a mi formación como profesional.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por que en ella me forme como profesional y por que de no ser por sus apoyos no habría logrado realizarme como MVZ.

A todas las personas que contribuyeron a mi formación como profesional, GRACIAS.

Gracias a dios por permitirme estar en esta vida .

| | |
|---------------------------------|----|
| a).- Homogenización de muestras | 50 |
| b).- Análisis Histopatológico | 51 |
| c).- Bacíloscopia | 52 |
| d).- PCR-anidado | 53 |
| VI.- Resultados y Discusión. | 54 |
| VII.- Conclusiones | 59 |
| VIII .- Referencias | 60 |

RESUMEN:

La tuberculosis bovina, es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso crónico y progresivo causada por *Mycobacterium bovis*, que afecta a animales y al hombre provocando alrededor de 3.3 millones de muertes al año en todo el mundo. El objetivo del presente trabajo fue obtener cepas de *Mycobacterium bovis* a partir de tejidos con lesiones presuntivas a tuberculosis en canales de ganado bovino sacrificados en un rastro Tipo Inspección Federal (TIF) de la ciudad de Torreón. Se analizaron 23 muestras de lesiones sospechosas para su análisis histopatológico, cultivo, PCR y tinción de Ziehl Neelsen. Del presente estudio se encontró que las 23 muestras analizadas, éstas fueron negativas a cultivo de Lowenstein Jensen, negativas a la técnica radiométrica de cultivo líquido (BACTEC) muestras (1 a 4), resultando positivos 16, 15 y 18 a PCR, Ziehl Neelsen e histopatología respectivamente por lo tanto, se considera que el empleo del medio de cultivo Lowenstein Jensen para el aislamiento de *Mycobacterium bovis* es inadecuado bajo las condiciones de manejo de las muestras.

Palabras clave:

Lowenstein-Jensen, Ziehl Neelsen, *Mycobacterium bovis*, PCR= Reacción en cadena de la polimerasa, BACTEC= Técnica radiométrica de cultivo líquido.

I.- INTRODUCCIÓN

Mycobacterium bovis es el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB) en un amplio rango de especies animales y el hombre, con una pérdida a nivel mundial para la agricultura de 3,000 millones de dólares. La carga humana de tuberculosis causada por el bacilo tuberculosos es aún desconocida.

La tuberculosis humana (TB) es una enfermedad infecciosa, crónica, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas, preferentemente en ciertos órganos (pulmón, nódulos, hígado) o diseminados, acompañados por caquexia progresiva, nódulos ganglionares, periodos febriles y lentitud de crecimiento. Ésta, sigue representando una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, especialmente en los países menos industrializados donde constituye un serio problema de salud pública. De las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, sólo *M. tuberculosis* y *M. bovis* se asocian a enfermedad en individuos inmunocomprometidos.

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 bovina (TBB) ha sido común, alrededor del 10% de los casos de las tuberculosis clínica en humanos fueron asumidas como debidas a *M. bovis* (O'Relly y Daborn, 1995). En la actualidad la TB produce 1,5 millones de defunciones al año, e incluso más en combinación con el SIDA. En el mundo se registran anualmente alrededor de 8 a 10 millones de casos nuevos de tuberculosis, la tercera parte de la población mundial, presentan una infección tuberculosa latente. De los cuales 1.3 millones corresponden a menores de 15 años, lo que significa que el 6% de todos los fallecimientos en este grupo de edad se debe a tuberculosis. En México se reportan aproximadamente 20,000 casos nuevos de tuberculosis al año que ocasionan alrededor de 6,000 fallecimientos (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

Las actividades pecuarias, en especial la producción de carne en nuestro país, ha mostrado un importante desarrollo tecnológico y productivo que se traduce en el crecimiento de la disponibilidad de este alimento básico, asegurándose una mejor nutrición para la creciente población de México. La producción de carne de

bovino para 1999 alcanzó los 4.2 millones de toneladas, lo que ubica a México como el octavo productor mundial entre más de 210 naciones, aportando el 2% de ese gran total. Además, con ello se constituye como el tercer productor de América, superado por Estados Unidos y Brasil (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo rural, 1991).

En 1901, a la entrega de su premio Nobel, Von Behring indicó: “como ustedes saben, la tuberculosis en el ganado es una de las enfermedades infecciosas que más afecta a la agricultura”. Los últimos 100 años de investigación han tenido poco impacto sobre esta conclusión en países en vías de desarrollo, mientras que en algunos países desarrollados con un reservorio de *M. bovis*, han tenido un alarmante incremento en la incidencia de TBB. Para el 2000, Gran Bretaña presentó una incidencia por establo del 2.8 %, con un incremento exponencial en el caso del Suroeste de Inglaterra en los pasados 10 años (Garnier *et al.*, 2003).

Se calcula que la tuberculosis (TB) tiene un costo económico anual equivalente a US\$12.000 millones de los ingresos de las comunidades pobres; otros estudios indican que se pierden de 3 a 4 meses de tiempo laboral por causa de la TB, con un promedio de pérdida del 20 al 30% de los ingresos domésticos anuales; en caso de muerte prematura por TB, se calcula una pérdida adicional de 15 años de ingresos (Ministerio de Salud, 2002).

(En México, el procesamiento del ganado para abasto se realiza en diferentes tipos de establecimientos, diferenciados por el grado de equipamiento, los controles sanitarios y el tamaño de la infraestructura. Por la infraestructura más moderna, con mayor equipamiento y con los más estrictos controles higiénicos, corresponde a la categoría de rastros Tipo Inspección Federal (TIF), cuya inspección recae en la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Por el contrario, la infraestructura más antigua y tradicional del país, en la que manejan diferentes niveles tecnológicos y de control higiénico, constituido principalmente por los rastros municipales y algunos particulares, cuya inspección corresponde a la fecha a las autoridades sanitarias del país. Finalmente se encuentran los mataderos y el denominado sacrificio *in situ*, que corresponden al

sistema ancestral de aprovechamiento de los animales (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural , 1991).

Para elevar la producción y mejorar la calidad sanitaria de los productos de origen animal, es necesario establecer un control estricto sobre la TBB que permita a la ganadería nacional desarrollarse en mejores condiciones sanitarias (SAGAR, 1995)

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, 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. Métodos clásicos para la diferenciación de especies de micobacterias se basan en la reducción de nitratos, actividad pirazinamidasas, susceptibilidad a la pirazinamida, acumulación de niacina y el crecimiento en medio conteniendo hidracida ácido carboxílico-2-tiofeno (Espinosa *et al.*, 1998).

La identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, se ha hecho en base al uso de electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS, por sus siglas en Inglés), susceptibilidad a fagos, polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's); polimorfismo en secuencias ricas en GC (PGRS) y elementos repetidos directos (RD) (Cousins *et al.*, 1998 (a); Perumaalla, *et al.*, 1996). así como el empleo de PCR con alelos específicos para distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis* y empleo de consensos intergénicos enterobacteriales repetidos (ERIC-PCR) y ribotipificación para la diferenciación de especies y cepas (Espinosa *et al.*, 1998; Sechi *et al.*, 1999).

La presente investigación tuvo como propósito conocer la sensibilidad del método de cultivo para especímenes clínicos (tejidos transportados en solución de borato y positivos a TBB por las lesiones macroscópicas) en el aislamiento de *M. bovis*, empleando como referencia cultivos de *M. tuberculosis* y la siembra en un sistema radiométrico (BACTEC) y confirmación por PCR.

II.- OBJETIVOS.

- 1 Obtener información acerca de la situación epidemiológica sobre la tuberculosis bovina en la Comarca Lagunera.
- 2 Obtención de aislados de *Mycobacterium bovis* a partir de tejidos positivos a lesiones macroscópicas de tuberculosis.

III.- HIPOTESIS.

Demostrar que es factible el aislamiento de *Mycobacterium bovis* a partir de tejido positivos a lesiones macroscópicas de tuberculosis, en el medio de cultivo de Lowenstein-Jeensen, conservados en borato de sodio.

IV.- Revisión de Literatura.

4.1.- Clasificación y nomenclatura bacteriana.

Las bacterias son clasificadas en grupos taxonómicos de Dominios (Bacteria, Archae y Eucaria), hasta subespecies basados en relaciones de similitudes entre bacterias. Unas cuantas bacterias son nombradas por genero, especie, y subespecie.

Actualmente, las bacterias son clasificadas en el dominio Bacteria y Archae ., lo que anteriormente se consideraba dentro del reino Procariota, (Scanlan, 2003).

Las bacterias son clasificadas en tres divisiones en base a su tipo de pared celular:

- 1).- Firmicutes. Incluye las bacterias Gram positivas.
- 2),. Gracilicutes. Incluye las bacterias Gram negativas con pared celular.
- 3).- Tenericutes. Incluye las bacterias Gram negativas sin pared celular. Estas bacterias son denominadas bacterias libres de pared celular.

Clases y Ordenes. Son raramente empleados en la clasificación bacteriana. Una familia representa un grupo de géneros relacionados. Un genero es un grupo bien definido de bacterias las cuales pueden distinguirse de varios géneros. Una especie es una colección de cepas que presentan muchas propiedades. Una especie puede dividirse en dos o más subespecies, el cual es el rango mas bajo en la nomenclatura (Scanlan, 2003).

En 1896 se acuñó el término de *M. bovis* para el bacilo tuberculoso bovino (Ruiz *et al.*, 1998).

La tuberculosis bovina ha aumentado en los últimos años, por la asociación de tres factores: el crecimiento de la pobreza, la asociación de tuberculosis con VIH/SIDA y la multirresistencia a las drogas antituberculosas. El fin de la OMS es el control de la tuberculosis y diagnosticar el 70% de los casos existentes de la enfermedad y curar el 85% de éstos (Calume y Silva, 2000).

Es sabido que las micobacterias no tuberculosas se detectan con menor frecuencia, y con mayor dificultad, que *M. tuberculosis*, que oscila entre un 20% y un 80% de los cultivos positivos (PANAFTOSA/OPS/OMS, 2000).

4.1.1. complejo *Mycobacterium*.

El complejo *Mycobacterium* lo constituyen una serie de mycobacterias diferenciadas entre si por sus características como es la de afectar a diferentes especies.

Micobacterias productoras de tuberculosis

M. tuberculosis. Es de crecimiento lento. Es el Bacilo de Koch. Afecta primates, hombres, perros, lobos y canarios.

M. bovis. Es de crecimiento lento. Afecta a cerdos, caballos, ovejas y bovinos, cabras, gatos, perros, primates y hombres.

M. avium. Es de crecimiento lento. Afecta a caballos, aves, cerdos, ovejas, cabras y primates.

M. microti. Es de crecimiento lento. Produce tuberculosis en ratones campestres.

Micobacterias productoras de lesiones granulomatosas.

M. chelonae. Afecta a peces y bóvidos.

M. fortuitum. Crecimiento rápido. Afecta a ranas, bovinos, perros, gatos, cerdos y monos.

M. marinum. Crecimiento lento. Afecta a peces, anfibios y mamíferos acuáticos.

Micobacterias productoras de lesiones nódulo-ulcerosas

M. ulcerus. Crecimiento lento. Afecta a gatos.

M. xenopi. Afecta a sapos y gatos.

M. phlei. Afecta a gatos.

Micobacterias productoras de Lepra

M. leprae. Es el bacilo de Hansen.

Tiene el inconveniente de que no se ha podido cultivar en medios artificiales. Se puede identificar con pruebas con BAAR a partir de una impronta de las fosas nasales.

Están "agrupados en nidos", y hay numerosos grupos. Afecta al hombre y al armadillo

M. lepraemurium. Crecimiento lento. Afecta a roedores.

M. de la lepra felina. No se cultiva. Se sospecha que se transmite por mordedura de roedores y por picadura de artrópodos.

M. paratuberculosis. Crecimiento lento. Produce la enfermedad de Johne. Afecta a bovinos principalmente.

Puede afectar a ovinos y caprinos con lesiones intestinales menos manifiestas

M. farcinogenes. Crecimiento lento. Produce la enfermedad del muermo en los bovinos africanos, que es una inflamación de las mucosas.

Existe otra Mycobacteria que produce la misma enfermedad: *Mycobacterium senegalense*, pero esta es de crecimiento rápido.

M. porcinum. Crecimiento rápido (3 días). Produce una linfadenitis parecida a la tuberculosis en los cerdos (Rev. Apuntes Veterinaria.org, s/f.)

4.1.2.- Grupos Micobacteriales

Las micobacterias se pueden clasificar de acuerdo al tiempo que tardan en crecer. Bacterias de crecimiento rápido o de crecimiento lento o por los huéspedes que afectan.

| | |
|--|--|
| <p><i>Micobacterias de crecimiento lento</i> Especies cuyo reservorio es un mamífero infectado</p> <p>Patógenas para el hombre</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> <i>M. leprae</i> <i>M. tuberculosis</i> <p>Patógenas para otros animales</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. lepraemurium</i> <i>M. microti</i> <i>M. paratuberculosis</i> <p>Especies cuyo reservorio principal es el medio ambiente</p> <p>Asociadas a enfermedades humanas</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. asiaticum</i> <i>M. avium</i> <i>M. branderi</i> <i>M. celatum</i> <i>M. conspicuum</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. interjectum</i> <i>M. intermedium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. mabmoense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. triplex</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i> <p>Asociadas a enfermedades en animales</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. farcinogenes</i> <p>Nunca o raramente asociadas a enfermedades humanas</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. cooki</i> <i>M. gastri</i> <i>M. gordona</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i> | <p><i>Micobacterias de crecimiento rápido</i> Especies cuyo reservorio es el medio ambiente</p> <p>Asociadas a enfermedades humanas</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. abscessus</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. novocastrense</i> <i>M. peregrinum</i> <p>Asociadas a enfermedades en animales</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. porcinum</i> <p>Nunca o raramente asociadas a enfermedades humanas</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>M. agri</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. alvei</i> <i>M. aurum</i> <i>M. austroafricanum</i> <i>M. brumae</i> <i>M. chitae</i> <i>M. chlorophenicum</i> <i>M. chubuense</i> <i>M. confluentis</i> <i>M. diernhoferi</i> <i>M. chivalii</i> <i>M. fallax</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. gadium</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. hassiacum</i> <i>M. holderi</i> <i>M. komossense</i> <i>M. madagascariense</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. moriokaense</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. obuense</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. poriferae</i> <i>M. pulveris</i> <i>M. rhodesiae</i> <i>M. senegalense</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. sphagni</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. tokaiense</i> <i>M. vaccae</i> |
|--|--|

4.1.3.- Especies de Micobacterias

En la actualidad podemos encontrar un gran numero de micobacterias clasificadas por sus características y diferenciadas entre si por cepas.

| Especie | Descrito por | Cepas tipo | Especie | Descrito por | Cepas tipo |
|---------------------------|---|--------------|-----------------------------|--|--------------|
| <i>M. abscessus</i> | Kusumoky y Ezaki (1992) | ATCC 19977 | <i>M. lepraemurium</i> | Marchoux y Sorel (1912) | No designada |
| <i>M. africanum</i> | Castets, Rist y Boisvert (1969) | ATCC 25420 | <i>M. madagascariense</i> | Kazda et al (1992) | ATCC 49865 |
| <i>M. agri</i> | Tsukamura (1981) | ATCC 27406 | <i>M. mageritense</i> | Domènech et al (1997) | En trámite |
| <i>M. aichiense</i> | Tsukamura, Mizuno y Tsukamura (1981) | ATCC 27280 | <i>M. malmoense</i> | Schröder y Juhlin (1977) | ATCC 29571 |
| <i>M. alvei</i> | Ausina et al (1992) | CIP 103464 | <i>M. marinum</i> | Aronson (1926) | ATCC 927 |
| <i>M. asiaticum</i> | Weiszfeiler, Karaszeva y Karczag (1971) | ATCC 25276 | <i>M. microti</i> | Reed, Breed et al (1957) | NCTC 8710 |
| <i>M. aurum</i> | Tsukamura (1966) | ATCC 23366 | <i>M. moriohaense</i> | Tsukamura, Yano e Imaeda (1987) | ATCC 43059 |
| <i>M. austroafricanum</i> | Tsukamura, Van der Muelen y Grabow (1983) | ATCC 33464 | <i>M. mucogenicum</i> | Springer et al (1995) | ATCC 49650 |
| <i>M. avium</i> | Chester (1901) | ATCC 25291 | <i>M. neoaurum</i> | Tsukamura (1972) | ATCC 25795 |
| <i>M. bovis</i> | Karslon y Lessel (1970) | ATCC 19210 | <i>M. nonchromogenicum</i> | Tsukamura (1965) | ATCC 19530 |
| <i>M. branderi</i> | Koukila-Kähkölä et al (1995) | ATCC 51789 | <i>M. novocastrense</i> | Shojaei et al (1997) | DSM 44203 |
| <i>M. brumae</i> | Luquin et al (1993) | CIP 103465 | <i>M. obuense</i> | Tsukamura, Mizuno y Tsukamura (1981) | ATCC 27023 |
| <i>M. celatum</i> | Butler et al (1993) | ATCC 51131 | <i>M. parafortuitum</i> | Tsukamura (1966) | ATCC 19686 |
| <i>M. chelonae</i> | Bergey et al (1923) | NCTC 946 | <i>M. paratuberculosis</i> | Bergey et al (1923) | ATCC 19698 |
| <i>M. chitae</i> | Tsukamura (1967) | ATCC 19627 | <i>M. peregrinum</i> | Kusumoky and Ezaki (1992) | ATCC 14467 |
| <i>M. chlorophenicum</i> | Hägglom et al (1994) | DSM 43826 | <i>M. phlei</i> | Lehmann y Neumann (1899) | ATCC 11758 |
| <i>M. chubuense</i> | Tsukamura, Mizuno y Tsukamura (1981) | ATCC 27278 | <i>M. porcinum</i> | Tsukamura, Nemoto y Yugi (1983) | ATCC 33776 |
| <i>M. confluentis</i> | Kirschner et al (1992) | DSM 44017 | <i>M. poriferae</i> | Paagitt y Moshier (1987) | ATCC 35087 |
| <i>M. conspicuum</i> | Springer et al (1995) | DSM 44136 | <i>M. pulveris</i> | Tsukamura, Nemoto y Yugi (1983) | ATCC 33776 |
| <i>M. cookei</i> | Kazda et al (1990) | ATCC 49103 | <i>M. poriferae</i> | Paagitt y Moshier (1987) | ATCC 35087 |
| <i>M. diernhoferi</i> | Tsukamura, Grabow y Van der Muelen (1983) | ATCC 19340 | <i>M. pulveris</i> | Tsukamura, Mizuno y Toyama (1983) | ATCC 35154 |
| <i>M. duvalii</i> | Stanford y Gunthorpe (1971) | NCTC 358 | <i>M. rhodesiae</i> | Tsukamura, Mizuno y Tsukamura (1981) | ATCC 27024 |
| <i>M. fallax</i> | Lévy-Frébault et al (1983) | CIP 8139 | <i>M. scrofulaceum</i> | Prissick y Masson (1956) | ATCC 19981 |
| <i>M. farcinogenes</i> | Chamoiseau (1979) | NCTC 10955 | <i>M. senegalense</i> | Chamoiseau (1973) | NCTC 10956 |
| <i>M. flavescens</i> | Bojalil, Cerbón y Trujillo (1962) | ATCC 14474 | <i>M. simiae</i> | Karaszeva, Weiszfeiler y Krasznay (1965) | ATCC 25275 |
| <i>M. fortuitum</i> | Da Costa Cruz (1938) | ATCC 6841 | <i>M. shimoidei</i> | Tsukamura (1982) | ATCC 27962 |
| <i>M. gadium</i> | Casal y Calero (1974) | ATCC 27726 | <i>M. smegmatis</i> | Trevisan (1889) | ATCC 19420 |
| <i>M. gastri</i> | Wayne (1966) | ATCC 15754 | | Lehmann y Neumann (1899) | |
| <i>M. genavense</i> | Böttger et al (1993) | ATCC 51234 | <i>M. sphagni</i> | Kazda (1980) | ATCC 33027 |
| <i>M. gilvum</i> | Stanford y Gunthorpe (1971) | NCTC 10742 | <i>M. szulgai</i> | Marks, Jenkins y Tsukamura (1972) | NCTC 10831 |
| <i>M. goodii</i> | Bojalil, Cerbón y Trujillo (1962) | ATCC 14470 | <i>M. terrae</i> | Wayne (1996) | ATCC 15755 |
| <i>M. hassiacum</i> | Schröder et al (1997) | DSM 44199 | <i>M. thermoresistibile</i> | Tsukamura (1966) | ATCC 19527 |
| <i>M. haemophilum</i> | Sompolinsky et al (1978) | ATCC 29548 | <i>M. tokaiense</i> | Tsukamura, Mizuno y Tsukamura (1981) | ATCC 27282 |
| <i>M. hibernalis</i> | Kazda et al (1993) | ATCC 49874 | <i>M. triplex</i> | Floyd et al (1997) | ATCC 70071 |
| <i>M. hodleri</i> | Kleespies et al (1996) | DSM 44183 | <i>M. triviale</i> | Kubica et al (1970) | ATCC 23292 |
| <i>M. interjectum</i> | Springer et al (1993) | DSM 44064 | <i>M. tuberculosis</i> | Zopf (1883) | ATCC 27294 |
| <i>M. intermedium</i> | Kirschner et al (1993) | DSM 44049 | | Lehmann y Neumann (1896) | |
| <i>M. intracellulare</i> | Cuttino y McCabe (1949) | ATCC 13950 | <i>M. ulcerans</i> | Mac Callum, Tolhurst y Buckle (1950) | ATCC 19423 |
| | Runyon (1965) | | <i>M. vaccae</i> | Bönicke y Juhász (1964) | ATCC 15483 |
| <i>M. kansasii</i> | Hauduroy (1955) | ATCC 12478 | <i>M. xenopi</i> | Schwabacher (1959) | NCTC 10042 |
| <i>M. komossense</i> | Kazda y Müller (1979) | ATCC 33013 | | | |
| <i>M. lentiflavum</i> | Springer et al (1996) | ATCC 51985 | | | |
| <i>M. leprae</i> | Hansen (1880) | No cultivada | | | |
| | Lehman y Neumann (1896) | | | | |

4.1.4.- Características generales.

Las Micobacterias son bacilos o cocobacilos curvados o rectos, no forman esporas, no presentan flagelos ni cápsula. Son ácido alcohol resistentes (presentan resistencia frente a la decoloración de ácido clorhídrico al 3% por este motivo se les identifica como bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) también se les considera como gram positivo, aunque no se tiñen bien con esta coloración. Las Micobacterias son bacilos con un porcentaje alto de lípidos en su pared que les confiere su ácido-alcohol resistencia característica (Ruiz *et al.*, 1998).

Las especies pertenecientes a este género se consideran aerobios estrictos y su crecimiento es mucho más lento que la mayoría de las bacterias (Cruz *et al.*, 1987).

El establecimiento de una forma más resistente a condiciones anaeróbicas ha sido reportada para *M. smegmatis*, que esta una Micobacteria no patógena, de rápido crecimiento, puede ser utilizada como modelo para entender los mecanismos de latencia (Lim y Dick, 2001). Se cree que el estado de latencia de la Micobacteria controla su metabolismo para conservar su energía, explota fuentes alternativas de energía y establece mecanismos para estabilizar sus componentes celulares y reducir la necesidad de realizar procesos celulares costosos (Wayne, 2001).

Dentro de los factores que llevan al establecimiento de la latencia, la limitación de oxígeno disponible para el bacilo es quizás el más importante. En un estudio reciente con *M. bovis* BCG, se identificaron proteínas inducidas bajo limitación de oxígeno en el modelo de latencia definido por Wayne (Boon, *et al.*, 2001). Así mismo, se han identificado proteínas que se expresan bajo condiciones anaeróbicas en *M. tuberculosis* (Yuan *et al.*, 1996) y en *M. smegmatis* (Murugasu *et al.*, 1999).

4.1.5.- *Mycobacterium bovis*.

La mayor porción de la pared celular está ocupada originalmente por cadenas largas de ácidos grasos conteniendo de 70 a 90 carbonos, los ácidos mucólicos. El peptidoglicano, el cual contiene ácido N-glucolilmurámico en lugar del usual ácido N-acetilmurámico, está unido a un arabinogalactamo por medio de un enlace fosfodiéster. Cerca del 10% de los residuos de arabinosa de arabinogalactano son

sustituidos por ácidos micólicos, produciendo la estructura unida covalentemente a la pared celular. La pared celular también contiene diversos tipos de "lípidos extraíbles" no hay unión covalente en su esqueleto basal; esos incluyen glicolípidos conteniendo trehalosa, glucósidos fenol phthiocerol y glicopeptidolípidos (Liu *et al.*, 1995).

El microorganismo causal no forma esporas, pero tiene resistencia moderada al calor, desecación y muchos desinfectantes. Es destruido fácilmente por la luz directa del sol, a menos que se encuentre en ambiente húmedo. En un ambiente cálido, húmedo y protegido permanecerá viable durante periodos prolongados (Blood, 1996). 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).

4.2.- Salud pública

La tuberculosis (TB), es la enfermedad que mayor número de muertes ha ocasionado en toda la historia de la humanidad y continúa causando estragos (Murray, 1991).

Lo que convierte a este bacilo en la causa infecciosa de muerte más importante del mundo, que es responsable de la muerte de más jóvenes y adultos que cualquier otra enfermedad infecciosa en el mundo actual. Causa la muerte de más personas que la malaria y el SIDA combinados y en mujeres la mortalidad es mayor que todas las causas de mortalidad materna consideradas en conjunto. Es responsable por la muerte de un millón de niños al año (Morán y Lazo, 2001).

La tuberculosis ha sido identificada por la organización mundial de la salud (OMS) como una de las de las 5 pandemias que ocasionan mayor carga de enfermedad; la tuberculosis ocupa el octavo lugar como causa de muerte a nivel mundial. Se estima que la tercera parte de la población mundial está infectada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. (García, 2001).

El problema afecta sobre todo a los países en vías de desarrollo, pero tampoco son ajenos a él los países desarrollados, en muchos de los cuales se

produjo un incremento de casos en la década de los ochenta como consecuencia de los movimientos migratorios, de la aparición del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), del agrupamiento en núcleos urbanos de personas con problemas sociales diversos y de la insuficiencia de los recursos destinados al control de la enfermedad (March y García, 1993).

Cada año mueren en el mundo de TB más de 3 millones de personas. Además, un nuevo aliado, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), va a dificultar aún más su erradicación. Este nuevo patógeno ha interferido el curso que desde hace más de 100 años había tomado la TB hacia su autoeliminación y va a magnificar y hacer pagar los errores cometidos por los distintos países, sobre todo los del tercer mundo, que apenas han disminuido sus tasas de infección en los últimos 50 años (Murray, 1991).

Se estima que entre 1954 y 1970 la proporción de casos en seres humanos debidos a *M. bovis* en todo el mundo fue de un 3.1% respecto a todas las formas de TBC, siendo el 2.1% de las formas pulmonares y el 9.4% de las formas extrapulmonares. Respecto a la TB, España se sitúa en el ámbito europeo en cuanto tasa de incidencia, en segundo lugar después de Portugal, según la Red de Vigilancia Europea de tuberculosis (Euro TB) (Solano *et al.*, 2003).

Tuberculosis bovina (TBB) es una de las enfermedades de interés para muchos países. Siendo la responsable de fuertes pérdidas económicas relacionada con la producción de leche y fertilidad. Adicional al incremento de los costos que incluyen la campañas de diagnóstico y medidas de control (Coetsier *et al.*, 2000).

En aquellos países donde la TBB no está controlada, la mayoría de los casos de TBB tiene lugar en personas jóvenes a causa de la ingesta de leche o por manipulación de la misma, con forma clínica no pulmonar. A su vez los agricultores pueden adquirir la infección por vía inhalatoria a partir del ganado infectado, desarrollando la forma típica pulmonar. En los países desarrollados el control y la eliminación de la TBB en animales, junto a la pasteurización de la leche han reducido la incidencia de la enfermedad causada por *M. bovis* tanto en el ganado vacuno como en los seres humanos, pudiendo aparecer casos en personas ancianas como

consecuencia de la reactivación del bacilo. En Francia, la infección por *Mycobacterium bovis* es del 1.6% en paciente VIH positivos (Solano *et al.*, 2003).

En la región de las América se han reportado entre 200 y 250 000 casos anuales a partir de los ochentas, aunque algunos expertos señalan que la cifra puede elevarse a unos 300, 000.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) calcula que en 1995 esta enfermedad fue la causa de muerte de mas de 75,000 persona en Latinoamérica y el caribe, y que cada día 1,100 personas se enferman y más de 200 mueren debido a la tuberculosis. Los países con tasas severas ($> 85 \times 100\,000$ habitantes) son: Bolivia, Republica dominicana, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Haití, Honduras, Paraguay y Perú (Morán y Lazo, 2001).

En Cuba la tasa registrada fue de 12.3 por cada 100,000 habitantes y la del cierre preliminar de 1998 de 11.0. La mortalidad en los 5 años se ha mantenido en tasa de 1 por cada 100,000 habitantes (Morán y Lazo, 2001).

El continente Africano exhibe las mayores tasas y varios países del sur muestran situaciones muy criticas también en Asia y varios países europeos la tuberculosis se han convertido en un serio problema de salud (Morán y Lazo, 2001).

Se realizó el estado actual de la epidemiología de la enfermedad de *M. bovis* en la ciudad de San Diego, California Estados Unidos y se compararon las características de aquellos pacientes enfermos por *M. tuberculosis*. De 1994-2000, 1,931 casos evaluados de cultivos positivos a TB fueron identificados; 129 estuvieron infectados con *M. bovis*, mientras que 1,802 estuvieron infectados con *M. tuberculosis*. Más del 90 % de los casos de *M. bovis*, ocurren en personas hispanas. Cerca del 25 % fueron niños y el principal sitio de la enfermedad fue extrapulmonar en el 53 % de los pacientes. 23% tienen infecciones con HIV concurrentes (LoBue *et al.*, 2003).

En América Latina, México tiene el 4^o lugar en mortalidad causada por tuberculosis con un 7.6%. Al hablar de la tuberculosis humana de origen animal, la identificamos con la producida por *Mycobacterium bovis*. Si la prevalencia en ganado bovino, en una zona altamente productora de leche, es elevada, la infección humana será muy similar debido al consumo de productos lácteos producidos con leche

cruda, además de que la vía aerógena es predominante. Este tipo de infección aerógena se incrementa por el tipo de riesgo ocupacional, por su contacto con bovinos infectados o sus canales y despojos que ocurre con los trabajadores de establos lecheros, criadores de ganado, trabajadores de rastro, de laboratorio y médicos veterinarios que manejen material tuberculoso (Delgado, 1999).

De cada 100 vacas enfermas de tuberculosis, 2 a 5 presentan mastitis tuberculosa. Esta mastitis posee una importancia excepcional, no sólo por ser fuente de transmisión para los terneros, sino porque puede contagiar al hombre. También ubres infectadas por vía sanguínea pueden eliminar bacilos en leche sin que aparezca mastitis clínica (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural., 1995).

4.3.- Perdidas económicas por Tuberculosis Bovina.

A continuación se indican las causas de perdidas económicas ocasionadas por la tuberculosis bovina.

1. Se disminuye la fertilidad hasta un 6%.
2. Las vacas en ordeño disminuyen la producción láctea en un 10% del total de la producción lechera.
4. 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).
5. Se produce un lento aumento del peso del animal o disminución gradual del mismo (caquexia). Se pierde en promedio el 15% del peso normal.
6. 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.
7. La esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre el 5 al 10%.
8. Disminución en la producción de carne en bovinos.
9. Pérdida de parición de terneros en hembras tuberculosas.

(Kantor *et al.*, s/f).

En nuestro país esta enfermedad provoca pérdidas anuales de 63 millones de dólares, fundamentalmente asociadas a pérdida de peso (36%), a la producción láctea (13%) y en producción de terneros (12%).

La magnitud de este problema sanitario se evidencia en que de erradicarse lograríamos producir anualmente 270 millones de litros de leche más. Por otra parte al tener una elevada población vinculada a tareas rurales, el porcentaje de tuberculosis bovina en humanos asciende al 6 %, detectándose la mayor prevalencia en establecimientos lecheros. (Office International des Epizooties, 2002).

Algo que se encuentra frecuentemente es fiebre baja con diarrea crónica y una pérdida de condición a pesar de tener buenos cuidados y alimentación. Se forman abscesos en los nódulos linfáticos intestinales y en el hígado. Sin embargo, si ocurre infección en los pulmones (Office International des Epizooties, 2002).

4.4.- Etiología de la tuberculosis bovina

Tiene un rango amplio de hospederos, siendo responsable de la enfermedad en organismos silvestres de vida libre o vida silvestre en cautiverio; incluyendo: venado, ganado doméstico (bovinos, cabras, búfalos asiáticos, camellos, alpacas y llamas), primates no humanos y humanos (Wedlock *et al.*, 2002, Blood, 1996).

En cada mujido se liberan 100 a 200 bacilos. Los terneros se contagian también por ingestión de leche contaminada (Office International des Epizooties, 2002).

El agente causal de la TBB es *Mycobacterium bovis*, un miembro del complejo de *M. tuberculosis* el cual incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*. (Wedlock *et al.*, 2002), especie perteneciente a la familia *Mycobacteriaceae*, orden *Actinomycetales* y género *Mycobacterium*. Este género además incluye más de cien especies (Ruiz *et al.*, 1998)

4.5.- Epidemiología

La tuberculosis se considera una enfermedad reemergente, en la región de las Américas se han reportado entre 200 y 250 mil casos anuales a partir de los 80's, aunque algunos expertos señalan que la cifra puede elevarse a unos 300 000 casos. 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 tuberculosis. Se estima que sólo dos terceras partes de los casos se reportan y que el 50 % de los enfermos con tuberculosis activa no tratada mueren en 5 años después de contraída la enfermedad y/o que un enfermo con tuberculosis contagiosa puede transmitirla a un número de entre 10 y 15 en un año. De los casos de tuberculosis que inician tratamiento en América Latina y el Caribe, se estima que menos del 70 % terminan curados. El tratamiento indebido o incompleto puede conducir directamente a la propagación de cepas resistentes, a la incurabilidad de la enfermedad y a la muerte (Morán y Lazo, 2001).

4.5.1. Incidencia Mundial.

Cerca de un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis*. Cada año se notifican alrededor de 3,3 millones de casos en todo el mundo. Sin embargo es posible que se reporten entre 7 a 8,8 millones de casos, el 95% en países vías en desarrollo. El 33% de la población mundial está infectada, es así que en 1993 la OMS la declaró como una de las principales enfermedades reemergentes. Se estima que la mitad de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. *M. bovis* ha disminuido en forma significativa debido a la pasteurización de la leche (González, 2001).

En la actualidad, se produce 1,5 millones de defunciones al año, e incluso más en combinación con el VIH/SIDA. En el mundo se registran anualmente alrededor de 8 a 10 millones de casos nuevos de tuberculosis, 1.3 millones corresponden a menores de 15 años, lo que significa que el 6% de todos los fallecimientos en este grupo de edad se debe a tuberculosis. La TB es la quinta causa de muerte en el mundo, pero es la primera causa mundial de muerte por

enfermedades infecciosas en adultos y cada portador de tuberculosis puede contagiar hasta a 15 personas al año. El incremento mundial de la tuberculosis desde mediados de los ochenta indica que la estrategia actual para tratar y controlar la enfermedad es inadecuada (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

4.5.2.- Incidencia Nacional

La prevalencia de TBB en México se ha estimado que es más alta en ganado lechero que en el ganado productor de carne variando de 3 a 11% en las estimaciones que se tiene para el centro del país y del 5 a 8% de la tuberculosis en humanos es debida a *Mycobacterium bovis*. La presencia de esta enfermedad en hato lecheros constituye un riesgo importante de salud pública, tanto por el consumo de productos no pasteurizados como por el contacto de los trabajadores en el campo y en los rastros, con animales infectados (Delgado, 1999).

En México se reportan aproximadamente 20,000 casos nuevos de tuberculosis al año que condicionan alrededor de 6 000 fallecimientos. En América Latina, México tiene el cuarto lugar en mortalidad causada por tuberculosis con un 7.6%. Al hablar de la tuberculosis humana de origen animal, la identificamos con la producida por *Mycobacterium bovis* (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

4.6.- Transmisión.

El concepto de transmisibilidad de la tuberculosis cobró fuerza con los estudios de Flügge, hacia fines del siglo XIX, quien señaló que las gotitas de saliva eran las responsables de la infecciosidad, al permanecer en el aire por cierto tiempo (González, 1995).

El *Mycobacterium bovis* se transmite por la leche de las vacas enfermas, e inicialmente produce lesiones intestinales y faríngeas. La vía de contagio más común es la vía respiratoria, le sigue la digestiva y la mucocutánea. La transmisión puede ser indirecta, ya que la micobacteria es muy resistente a la desecación y puede estar por muchos meses en el polvo o en los objetos de uso diario. Los

pacientes con cavitaciones pulmonares son más infecciosos aún, puesto que su esputo contiene de 1 a 10 millones de bacilos por ml y tosen a menudo. Sin embargo, la piel y las mucosas respiratorias íntegras de las personas sanas y los animales son resistentes a la invasión. Para que haya infección, es necesario transportar bacilos hasta los espacios aéreos distales del pulmón, los alvéolos, donde no están supeditados a la purificación mucociliar bronquial. Una vez depositados en los alvéolos, los bacilos están adaptados para penetrar en los macrófagos alveolares que, al depender tanto de sus propiedades genéticas como de su experiencia inmunitaria, son relativamente tolerantes a la proliferación bacilar. Si bien el paciente con tuberculosis cavitaria expectora cantidades masivas de bacilos, la probabilidad de generar partículas infecciosas es muy baja. De esa manera, la causa habitual de la tuberculosis pulmonar tiene un potencial infeccioso bajo, si se compara con otras enfermedades que se transmiten a través del aire (Morán y Lazo, 2001).

Una vez que las secreciones respiratorias se expelen desde la nariz o la boca, su contenido acuoso se evapora muy rápidamente, dejando tan sólo un pequeño residuo de material sólido, (núcleo goticular), en cuyo interior existen muy pocos microorganismos infectantes. Estos núcleos goticulares pueden mantenerse y transportarse por el aire durante un largo período de tiempo. Un único bacilo en un diminuto núcleo goticular es más peligroso que un gran número de bacilos en una partícula aerógena de mayor tamaño, porque esas grandes partículas no permanecen aerosolizadas y, si se inhalan, se depositan en las paredes de la tráquea y del resto de la vía aérea superior. Allí, son atrapadas en la capa de moco y eliminadas hacia la orofaringe, desde donde bien son deglutidas o bien, expectoradas. Los microorganismos depositados en la piel o las mucosas intactas no invaden los tejidos y, por tanto, no son infectantes (Caminero *et al.*, 1998).

Una vez depositados en los alvéolos, los bacilos están adaptados para penetrar en los macrófagos alveolares que, al depender tanto de sus propiedades genéticas como de su experiencia inmunitaria, son relativamente tolerantes a la proliferación bacilar (Morán y Lazo. , 2001).

4.7. Reservorios.

De particular importancia para el control de la enfermedad esta el mantenimiento de los huéspedes reservorios, entre los cuales se incluyen; el ganado y animales silvestres infectados tales como la zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*), el tejón (*Meles meles*), el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y bisonte (*Bison bison*) y el búfalo Africano (*Syncerus calfer*) (Wedlock *et al.*, 2002).

El coeficiente de transmisión de la enfermedad de masa-acción (proporción de animales susceptibles infectados por unidad de tiempo por animal infectado, no por animal enfermo o reactor), parece estar en el orden de 2.7×10^{-5} por vaca por día para un establo típico de 200 cabezas, resultando en una tasa de contacto (número de potencialmente contactos infecciosos realizados por vaca infectada por día) de alrededor de 0.0073. Estos son promedios estimados tanto para ganado de leche como de carne (Barlow *et al.*, 1997).

En establos con ganado infectado, la distribución de excretas es un factor de riesgo, el cual se puede disminuir por un prolongado almacenamiento de éste, por su distribución en campos que no estén destinados a pastizales o por la inyección en el suelo. *M. bovis* sobrevive en el agua y puede entrar al tracto respiratorio durante el consumo de agua (Phillips *et al.*, 2003)

4.8.- patología.

El bacilo tuberculoso no elabora endotoxinas ni exotoxinas, en su lugar, la enfermedad en sí y la destrucción de los tejidos son ocasionados por productos que elabora el huésped durante la respuesta inmunitaria a la infección (Moran y Lazo, 2001).

El *Mycobacterium tuberculosis* entra en el cuerpo por medio de inhalación de aerosoles debido a su pequeño diámetro, el cual evita el atrapamiento por el aparato mucociliar bronquial y puede llegar a los espacios aéreos en donde comienza la multiplicación de los microorganismos. Una vez inhalados se establecen en lo que se llama un foco primario, que por la mayoría es subpleural y por lo general esta localizado en la región pulmonar media, la cual es la parte inferior del lóbulo superior y la parte superior de los lóbulos inferior y medio. El

bacilo presenta varios antígenos que no parecen desempeñar ningún papel en la virulencia. Pero tienen un contenido microbiano de micosidos extraíbles, los cuales son complejos de lípidos y carbohidratos. La hipersensibilidad frente al bacilo tuberculoso desempeña un papel importante en la destrucción tisular que se observa en la enfermedad.

En la primera exposición, los bacilos tuberculosos actúan como partículas inertes y producen una respuesta inflamatoria neutrofílica inespecífica. Durante este periodo, los bacilos se introducen en los fagocitos, se multiplican de forma incontrolada y pueden introducirse en los linfáticos y en el torrente sanguíneo alcanzando zonas alejadas de última instancia en donde pueden ser destruidos, permanecer latentes o inducir focos de enfermedad. Una vez producida la sensibilización, la reacción inflamatoria adopta un carácter granulomatoso y las zonas centrales de los granulomas sufren necrosis de calcificación originando los tubérculos típicos. El tubérculo incluye un agregado microscopio organizado de histocitos hinchados y redondeados que se parecen vagamente a las células epiteliales. Existen dos tipos de descripciones para el tubérculo, el duro y el blando. El tubérculo duro contiene alrededor del granuloma un collar periférico de fibroblastos activos mezclados con linfocitos y carece de necrosis y reblandecimiento centrales. El tubérculo blando es el que con mayor frecuencia en la zona central forma necrosis caseosa de tipo granular, y es el que constituye el rasgo característico de la tuberculosis (Garza y Treviño, 2000).

Los agentes de la tuberculosis producen en el organismo animal un fenómeno inflamatorio exudativo con proliferación celular, una vez en el organismo dichos gérmenes comienzan a multiplicarse en su localización inicial, por ejemplo en pulmón. La reacción orgánica comienza a manifestarse y se organiza el granuloma característico de las micobacterias, con una zona de caseificación y otras de células de la inflamación crónica, con linfocitos, a partir del cual se agrega una reacción ganglionar regional, constituyéndose así el complejo primario de Ranke. Si existirá inicialmente una lesión primaria solo en los nódulos, sería un complejo primario incompleto. La respuesta inmune a micobacterias se caracteriza por una respuesta

inmune mediada por células dónde los macrófagos infectados llegan a rodearse por una zona de linfocitos para formar un granuloma (Wedlock *et al.*, 2002).

Al disminuir las defensas del animal, la diseminación postprimaria, es aquella en la cual los bacilos dan origen a granulomas en los órganos donde se detienen; la extensión de las lesiones se puede realizar por vía linfática, sanguínea o por contacto seroso. En el caso de la diseminación por vía sanguínea los focos de infección se producen, sobre todo, en los pulmones, riñones, hígado y bazo (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

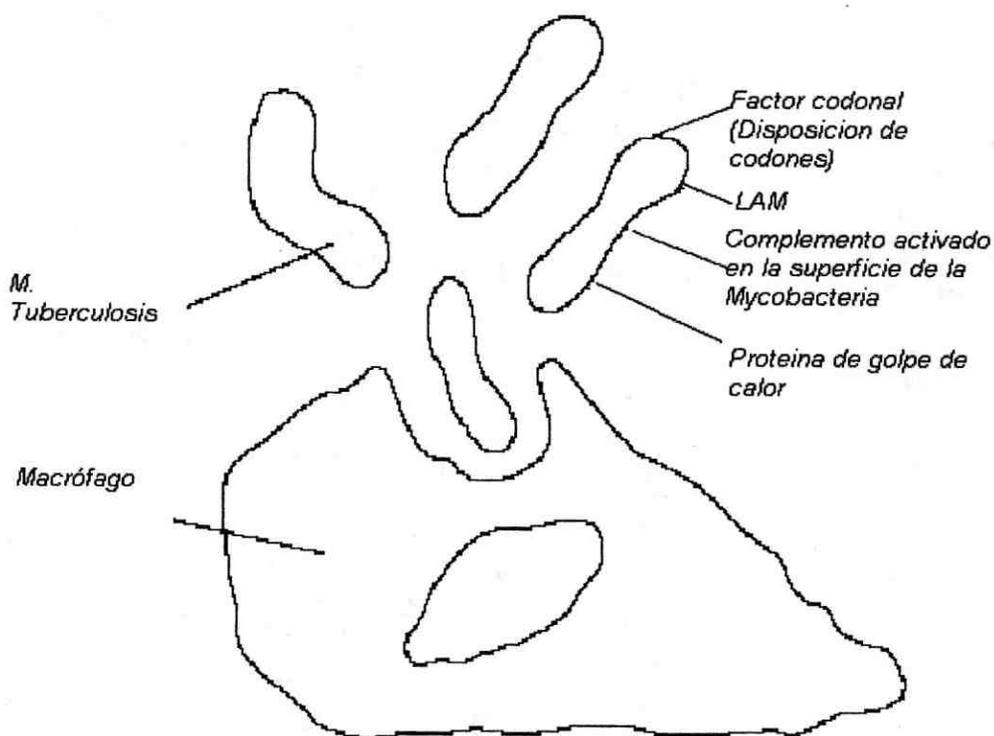
Cuando un macrófago alveolar puro desde el punto de vista inmunitario envuelve a un bacilo tuberculoso, al principio le suministra el ambiente nutricional que necesita dentro de su fagosoma, donde el bacilo sobrevive y se multiplica. La capacidad de estos macrófagos para erradicar por sí solos al bacilo 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 gram negativas, inhibe la activación de los macrófagos por el interferón- γ . El LAM también hace que los macrófagos secreten el (TNF- γ), 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.

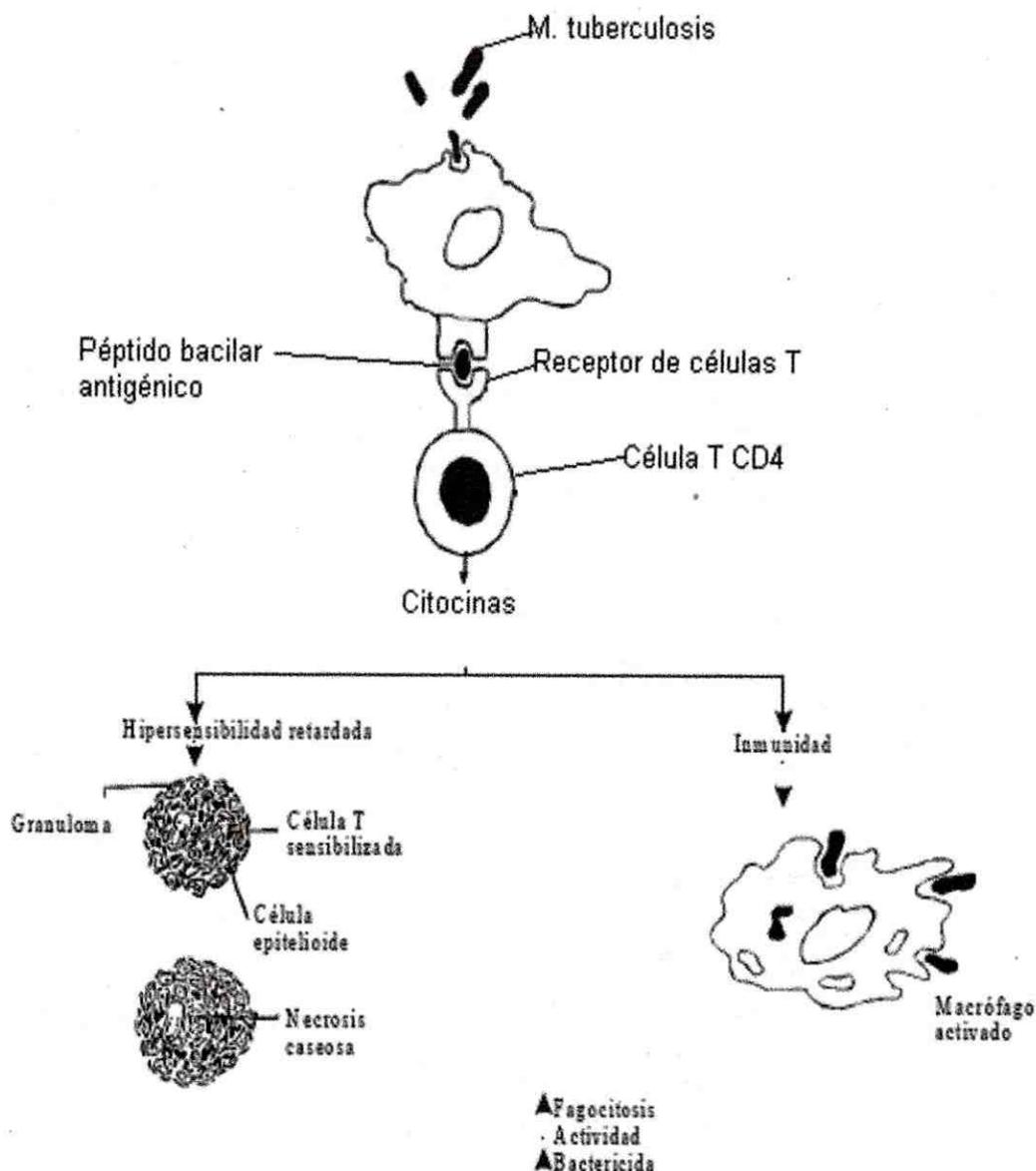
En tercer lugar, el complemento activado en la superficie de las micobacterias puede dar lugar a la opsonización del *Mycobacterium* y facilitar su captación por el receptor CR3 del complemento existente en los macrófagos (integrina Mac-1). Así la Micobacteria ocupa una posición intracelular en los macrófagos, 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 (fig. 1). La inhibición de la acidificación se ha asociado con la ureasa secretada por el mismo. Sin embargo, el macrófago infectado libera una sustancia que atrae a los linfocitos T, a continuación los macrófagos presentan los antígenos de los bacilos fagocitados a estos linfocitos, con lo que se inicia una serie de reacciones efectoras inmunitarias. A su vez, los linfocitos elaboran citosinas que activan a los macrófagos, y aumentan su potencial antimicrobiano (fig. 2). De esta manera se establece una lucha complicada entre el huésped y el parásito (Moran y Lazo, 2001).



F1. Factores atribuidos a la pared del *Mycobacterium tuberculosis* que le permiten escapar de las defensas del organismo.

| Factores | Efectos |
|--|---|
| Factor cordonal | Inhíbe migración de leucocitos Provoca aparición de granulomas |
| LAM | Inhíbe activación de macrófagos por interferón γ . Hace que los macrófagos secreten: TNF α , pérdida de peso, lesión tisular y fiebre. Il-10 Suprime proliferación de células T. |
| Complemento activado en la superficie de la bacteria | Facilita su opsonización con lo que: Aumenta resistencia bacteriana Dificulta quimioterapia |
| Proteína de golpe de calor | Reacciones autoinmunes |



F2. Consecuencias duales de la activación de los macrófagos

(Moran y Lazo, 2001).

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 mycobacterias y limitan su crecimiento.

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 (Moran y Lazo, 2001). Esto puede deberse a que la cepa del *Mycobacterium* sea particularmente virulenta o que el huésped sea especialmente susceptible. Los granulomas de la tuberculosis secundaria suelen localizarse en el vértice de los pulmones, aunque también pueden estar ampliamente diseminados en pulmón, meninges, médula ósea y otros órganos. Estos granulomas que no consiguen contener la expansión de la infección de la Mycobacteria, son la causa principal de la lesión tisular en la tuberculosis y reflejan una hipersensibilidad de tipo retardada. Dos rasgos característicos de la tuberculosis secundaria son la presencia de necrosis caseosa y de cavidades, que al romperse en los vasos sanguíneos, extienden las mycobacterias por todo el organismo, y cuando se abren a las vías respiratorias liberan mycobacterias infecciosas en aerosoles (Cotran, 2000).

En la primoinfección, una vez que *M. tuberculosis* llega al pulmón, es conducido por la corriente aérea hasta regiones subpleurales, por lo general de los lóbulos inferiores, que son los que proporcionalmente tienen más ventilación. El bacilo es fagocitado por los macrófagos alveolares, y consigue evitar su destrucción, impidiendo la unión del fagosoma que lo contiene con los lisosomas. De esta manera el bacilo consigue multiplicarse en el interior del macrófago hasta el punto de destruirlo. Al igual que ocurre con otros patógenos intracelulares, el macrófago infectado secreta citocinas (entre ellas el TNF- γ) y quimiocinas (especialmente del grupo beta) que desencadenan un proceso inflamatorio local y con ello una respuesta inespecífica de defensa que se caracteriza por el acúmulo inicial de neutrofilos y posteriormente de monocitos en el foco de infección. Los monocitos fagocitan a los bacilos que han destruido a los macrófagos alveolares y potencian

su crecimiento, puesto que al no estar activados constituyen a su vez un excelente medio para el crecimiento intracelular de los mismos

Los linfocitos Th1 sintetizan γ interferón (IFN- γ), que permite la activación de los macrófagos infectados y con ello la destrucción de entre el 90-95% de la concentración bacilar, consiguiendo el control, pero no la esterilización, del foco de infección. Posteriormente el granuloma entra en una fase crónica (o de equilibrio), debida probablemente a una disminución de la población de linfocitos Th1 como consecuencia de un aumento de la población linfocitaria de tipo Th2.

Habitualmente (en un 90% de los casos), la pequeña población bacilar del granuloma crónico acaba siendo destruida previa fibrosis y reabsorción del granuloma, en un proceso de años de evolución. El 5-10% restante puede desarrollar la enfermedad tuberculosa (Pediatria, parte B Libro 5. s/f)

Los niveles bajos de O_2 y pH, especies oxígeno tóxicas y niveles altos de CO_2 caracterizan el interior del granuloma y parece crear un medio ambiente capaz de restringir el crecimiento del bacilo. Como entra el bacilo y persiste en estado latente es completamente desconocido (Couture *et al.*, 1999).

Los macrófagos en primera instancia y los linfocitos T después consiguen, en la mayoría de los casos, detener la multiplicación de los bacilos, aunque, en un pequeño porcentaje de infectados (5%), esta inmunidad será insuficiente, además, aun en el caso de que se consiga controlar la infección inicial, no todos los bacilos de la población inicial son destruidos, sino que algunos de ellos son capaces de persistir intracelularmente en estado de latencia (Caminero *et al.* 1998).

Paralelamente a este proceso y una vez transcurridos de 10 a 15 días desde la infección, se produce un fenómeno de hipersensibilidad tipo IV; los macrófagos, que en un principio eran incapaces de destruir a los bacilos, experimentan transformaciones tanto funcionales como morfológicas evolucionando hasta células epitelioides y células gigantes. Son estas unas células que, a diferencia de las anteriores, serán capaces de producir una intensa acción fagocítica e hidrolítica. La patogenia de la reinfección difiere de la primoinfección en que la reacción neutrofila pura es más breve y desde su comienzo la reacción adopta la forma exudativa

aguda intensa; en sí, es la fase de infección que sigue a la reacción de la tuberculosis o a la reinfección de un animal previamente expuesto.

Tuberculosis secundaria o postprimaria.

Sucede en animales previamente sensibilizados, que sufren una segunda infección de origen exógeno o endógeno, siendo esta última más frecuente.

La posibilidad de que se establezca en uno u otro órgano parece depender, en gran medida, de la tensión parcial de oxígeno que en él encuentre. Así se explicaría el desarrollo de tuberculosis en las serosas, en las meninges, en las metafisis de los huesos en la etapa de crecimiento, en el riñón y en los órganos genitales durante la pubertad. El órgano que tiene la tensión parcial de oxígeno más alta del organismo es el pulmón, y en éste son las regiones apicales y dorsales las más afectadas.

Una vez producida la primoinfección, en la mayoría de los casos el bacilo queda encapsulado en pequeños focos, que no progresan ni determinan enfermedad; solo se sabe que el animal ha sido infectado, es decir que tiene bacilos vivos, en estado latente, en alguna parte del organismo, porque reacciona a la tuberculina. El riesgo de pasar de infección a enfermedad depende de la historia previa de exposición al bacilo que haya tenido un hato, con su efecto seleccionador de individuos más resistentes, lo que les permite montar una respuesta inmune adecuada.

Otros factores que influyen en este evento son los siguientes:

1. Factores dependientes del bacilo. Las diferentes especies de mycobacterias tienen una virulencia variable que puede ser modificada, ya sea por el tiempo o por condiciones geográficas.
2. Factores dependientes del ambiente. Los más críticos son el grado de infección que determina la intensidad de exposición y, en segundo lugar, la duración de la exposición.
3. Factores dependientes del huésped. En gran parte depende de la riqueza genética que tenga un animal. Entre otras condiciones del huésped está la edad, el sexo, desnutrición proteica, infecciones virales, asociación con otras enfermedades ó tratamientos inmunodepresores (corticosteroides o drogas

inmunosupresoras) y en general, todas las condiciones que determinan una depresión transitoria o permanente de la inmunidad celular.

Periodo del Complejo Primario. En este período la lesión inicial se desarrolla en el órgano que actúa como puerta de entrada denominado foco primario. Posteriormente o simultáneamente, los bacilos drenan por vía linfática a los ganglios linfáticos regionales donde origina el mismo tipo de lesión. La combinación de lesiones en el órgano de entrada y en el nódulo linfático regional constituyen el complejo primario (Secretaría de agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995)

Periodo de Diseminación Postprimaria. La tuberculosis secundaria es una reactivación o reinfección con el bacilo y que generalmente ocurre en pacientes inmunocomprometidos. La localización más común de la tuberculosis secundaria es el vértice del pulmón y las lesiones por lo general se tornan necróticas, caseosas y eventualmente aumentan. Con el tiempo la lesión caseosa se licua lo que produce una cavidad en el pulmón que hace más factible la proliferación del microorganismo. También esta eliminación de material caseoso hace posible que la infección se disemine a otras partes del organismo y a su vez son una fuente de infección ambiental. Debido a la gran inflamación que se produce puede haber hemorragias lo que produce, esputo hemorrágico (Garza y Treviño, 2000).

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 nódulo linfático hiliar, conjunto denominado complejo de Ghon (Moran y Lazo, 2001).

Una respuesta protectora a la infección con *M. tuberculosis* involucra la producción de IFN- γ por células T antígeno – específico micobacteriales las cuales activan a los macrófagos infectados para controlar el crecimiento del bacilo

intracelular. El bacilo intracelular resiste las defensas del IFN activado de macrófagos. La acidificación del fagosoma es inhibida por *M. avium* y *M. tuberculosis*, y la fusión del fagolisosoma ocurre parcialmente siguiendo la fagocitosis del bacilo vivo. (Rhoades y Orme, 1997).

Según investigadores encontraron que un 52.3% fueron positivos, bajo el criterio de correlación entre la prueba de tuberculosis, baciloscopía e histopatológica y aislamiento bacteriológico, el 43.6% se reportaron como negativos, mientras que el 4.1% restante resultaron sospechosos al identificarse a otros agentes como causantes de las lesiones (Trejo *et al*, 1996).

La hipersensibilidad tardía (evidenciada por respuesta cutánea positiva al PPD) controla el número de bacilos en el huésped, no los erradica; no obstante, favorece la necrosis caseosa mecanismo de defensa, que inhibe el crecimiento bacilar; si existe un exceso de antígeno, la hipersensibilidad tardía condiciona muerte celular y necrosis severa con lesión tisular y orgánica. La evolución de la infección depende de la interacción entre la hipersensibilidad tardía e inmunidad celular; esta última amplifica la habilidad del macrófago para la destrucción del bacilo, de tal manera que en individuos en los extremos de la vida, en tratamiento con corticosteroides o con enfermedades que disminuyen la inmunidad celular como enfermedad de Hodgkin, linfoma, insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus, HIV, etc., presentan una mayor susceptibilidad para que la infección tuberculosa se disemine.

Algunos investigadores han identificado una secuencia repetitiva que acompaña a una proteína posiblemente responsable de la invasión celular haciendo un paralelo con las islas de patogenicidad encontrada en otras bacterias patógenas, la información genética requerida para causar enfermedad es probablemente intercambiada dentro de la bacteria por un proceso denominado transferencia horizontal y existen evidencias de que tal proceso puede ocurrir en el *Mycobacterium tuberculosis*, presentándose al sistema inmune con blancos móviles lo cual incrementa su posibilidad de sobrevivir (Figuroa *et al.*, *s/f*).

Cuando el aislamiento del agente etiológico es a partir de tejidos sospechosos, las muestras deben enviarse al laboratorio en solución de tetraborato

de sodio al 6%, ya que dicha solución tiene la propiedad de ser antiséptica, sin embargo, existen dudas sobre el tiempo en que las muestras de tejidos pueden permanecer en ella, sin que se afecte la viabilidad de las micobacterias.

Algunos autores reportan que las muestras de tejidos sospechosos a tuberculosis pueden permanecer hasta por 90 días en la solución de tetraborato de sodio sin que se afecte la viabilidad de las micobacterias; después de este tiempo, la viabilidad se afecta ya que en el día 150 se observaron menos de 10 colonias por muestra, además de que el crecimiento fue irregular (Santillán *et al.*, 1999 a).

Algunos autores que realizan la amplificación del DNA por PCR de una forma no estandarizada ni comercializada, muestran sensibilidades que varían según estos entre el 55% y el 100% y especificidades entre el 62,6% y el 100%. Tuberculosis miliar es el resultado de la diseminación hematogena del bacilo. Consiste en la presencia de lesiones puntiformes, de 1 ó 2 mm, blanco-amarillentas. Microscópicamente se corresponden con grupos de granulomas. Puede verse en pulmón o en otros órganos, como el hígado; el órgano correspondiente se halla afectado de forma difusa.

La importancia de la tipificación, radica en que las lesiones macroscópicas no siempre coinciden con los resultados bacteriológicos, ya que se reporta un 5% corresponde a otras micobacterias (Morán y Lazo, 2001).

No todas las lesiones que se clasifican *post-mortem* como tuberculosas lo son realmente, ya que no es fácil distinguir granulomas de origen tuberculoso de los debidos a otras etiologías, se han reportado una relación de un 79% entre lesiones granulomatosas y aislamiento de *Mycobacterium bovis* (Cedrés *et al.*, s/f).

4.8.1.- Signos Clínicos.

La infección inicial suele ser asintomática (primo infección tuberculosa) y a las pocas semanas desarrolla sensibilidad a la prueba de la tuberculina (Moran y Lazo, 2001).

La presencia de una infección importante ocasionará una sintomatología de acuerdo con los órganos afectados, tos, mugidos roncós, disfunción pulmonar, hepática, ósea y síntomas generales (Amasino, 1991).

La tuberculosis respiratoria causa una tos persistente, respiración elaborada, dificultad para respirar y la producción de descarga ensangrentada. Al inicio los animales adultos suelen presentar fiebre sin signos clínicos evidentes. Luego una disminución progresiva del peso y fertilidad. En períodos avanzados hay anorexia, disnea y debilidad, lo que acorta el período de vida. En vacas lecheras ocasiona una disminución de su producción láctea. En animales jóvenes interrumpe su crecimiento (Office International des Epizooties., 2002).

4.8.2.- Lesiones

Las lesiones macroscópicas en el rastro no siempre concuerdan con el diagnóstico, ya que existen otras enfermedades que pueden causar lesiones de tipo granulomatoso (Santillán *et al.*, 1998 b).

Las lesiones, por lo general, curan y no dejan alteraciones residuales, excepto calcificación de nódulos linfáticos pulmonares o traqueobronquiales (Morán y Lazo, 2001).

Cornejo y colaboradores reporta que de 52.9% de los bovinos que presentan lesiones granulomatosas y por histopatología se confirmó que solo 35.3 % de estos animales presentaban bacilos ácido alcohol resistentes (Cornejo *et al.* , 1998)

La lesión característica de la tuberculosis es el tubérculo, usualmente entre 1.0 mm a 2.0 cm de diámetro aunque pueden variar considerablemente debido a crecimientos adyacentes con coalescencia de una o más lesiones simples. La relación estructural de los tejidos se transforma según la forma y el tamaño de la lesión. Eventualmente, el tubérculo se puede reducir a una pequeña masa de tejido conectivo fibroso o, en caso de que ocurran infecciones concomitantes con otros microorganismos, puede ocurrir necrosis licuefactiva, supurativa que produce cavitaciones. La apariencia macroscópica de la tuberculosis en tejidos blandos, como el hígado, pulmones, superficies serosas o mucosas, entre otros, presenta nodulaciones de aspecto firme y duro, blanco, grisáceo o amarillento. Al corte la sección es caseosa amarillenta, el centro necrótico es seco y sólido en contraste con la pus de los abscesos; la calcificación es común en la mayoría de los animales y al cortarlo se aprecia una sensación de sonido crepitante como si estuviera

cortando arena en el tejido blando, lo cual indica la presencia de material calcáreo (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

4.9.- Obtención de aislados de *Mycobacterium*

4.9.1.- Preparación de muestras contaminadas (Método de Petroff).

Mediante este método se elimina la flora asociada que se encuentra en la mayoría de las muestras.

Se utiliza un método de tratamiento ácido-álcali, que es una variante de la técnica de Petroff, por el cual la muestra se coloca en una solución antiséptica de hipoclorito de sodio, se transfiere a una solución de ácido clorhídrico, se neutraliza con hidróxido de sodio y se siembra en el medio. El Manual de la Unidad de Tuberculosis y Micobacterias del Instituto Pasteur de Paris, recomienda un método semejante para el aislamiento a partir de fragmentos de órganos para buscar tuberculosis en animales, sólo que se utiliza ácido sulfúrico en lugar de ácido clorhídrico. Las muestras de órganos o de tejidos generalmente se encuentran en la solución de borato de sodio empleada para su transporte. Antes de sembrar, la muestra debe ser limpiada y seleccionar la pieza o área más representativa para homogenizarla. Estas actividades deben realizarse en el interior de una cabina de bioseguridad con vestimenta de protección como bata, guantes, lentes y cubre bocas.

La limpieza puede o no realizarse, pero ayuda en el caso de muestras muy contaminadas. Para esto, la muestra íntegra se coloca en un frasco estéril con una solución de hipoclorito de sodio 1:1,000 durante 30 minutos.

Para la selección, el órgano o tejido se disecciona con ayuda de instrumental quirúrgico estéril (bisturí, tijeras, y pinzas). Según el tamaño de la muestra, se puede diseccionar sobre un mortero de porcelana, una caja petri o una charola metálica estériles. Se selecciona la parte con lesiones, necrosis o exudado caseoso y el resto del tejido se desecha. Debe eliminarse de la muestra la grasa o el tejido conectivo. Cuando la muestra es muy pequeña no es necesario seccionarla.

Cuando está bien macerado el tejido, se agrega mas agua estéril para hacer una suspensión y se trasvasa la suspensión a dos tubos de ensaye estériles con ayuda de una pipeta Pasteur o de un embudo de vidrio estéril.

Se rotula uno de los dos tubos con los datos de la muestra o el número del caso, se cierra bien y se guarda a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la conclusión del estudio.

El segundo tubo de ensaye que contiene la muestra se utiliza para descontaminación. Se añaden 5 partes de ácido clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen del material y de 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1% (hasta que adquiera un color naranja). Se agita ligeramente el tubo para que se mezcle su contenido y se deja en reposo durante 20 minutos. Se añade gota a gota una solución de NaOH 2N agitando el tubo, hasta que el indicador vire a un color entre morado y lila. Se centrifuga la muestra a 3,000 rpm durante 20 minutos, se decanta el tubo y el sobrenadante se desecha. El sedimento del tubo esta listo para ser sembrado (Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR Tuberculosis ,1996).

4.9.2 Materiales de biopsia.

Las biopsias de tejido pleural, hepático, nodular (de nódulos no fistulizados) y de piezas obtenidas por cirugía, se deben homogeneizar. Se utiliza instrumental quirúrgico estéril y un mortero de porcelana previamente esterilizado.

El mortero debe tener una capacidad tres a cuatro veces el tamaño de la muestra. Dentro del mortero y con ayuda de un bisturí, se fracciona el material biológico y de ser necesario se agrega una pequeña cantidad de arena y agua estériles. Con el mortero siempre cubierto con una hoja de papel estéril, se macera el material. Se añade agua estéril hasta obtener una suspensión que se inocular en el medio de cultivo, si es que cumple las condiciones de esterilidad señaladas. De lo contrario deberá ser sometida a descontaminación previa al cultivo (Cruz *et al* .,1987).

4.9.3 Cultivo microbiano.

En 1908 se inician los cultivos de bacilo de Koch en papa glicerizada bilingüe, con la colaboración del veterinario, Camille Guerin (1872-1961). Luego de 230 pasajes obtuvieron un bacilo definido, inofensivo, con estabilidad completa y con capacidad antigénica (González y Gonzáles, 1995).

El cultivo es el método bacteriológico más sensible y específico para descubrir la presencia de micobacterias y en particular de *M. Tuberculosis* y *M. bovis*.

Para garantizar el éxito de un cultivo de micobacterias hay que tomar en cuenta que son gérmenes exigentes que necesitan medios enriquecidos especiales, son anaerobios, la temperatura óptima para su crecimiento y desarrollo está entre 35 y 37 grados, con un PH de 6.7 a 6.9. En las muestras provenientes de sitios en donde las micobacterias coexisten con otros microorganismos de la flora normal, es indispensable llevar a cabo un proceso de descontaminación previo a la siembra de la muestra (Cruz *et al.*, 1987).

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. Microtii* y *M. Africanum*, estas bacterias son de crecimiento lento, por lo que el cultivo tarda de dos a ocho semanas (Velásquez *et al.*, 1998).

Dadas las condiciones en las que se encuentra *M. tuberculosis* dentro del hospedero, se ha propuesto que la limitación de oxígeno es el factor principal en la inducción del estado de latencia. A pesar de que *M. tuberculosis* requiere oxígeno para su crecimiento, éste puede sobrevivir cuando la reducción de oxígeno se hace de forma gradual de tal forma que permita la adaptación del bacilo y el establecimiento de un estado de persistencia no replicativa característico de la latencia (Wayne, 2001).

Una atmósfera enriquecida con CO₂ estimula el desarrollo de *Mycobacterium* su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la de otras bacterias (su tiempo de división es de unas 18 horas) tardando varias semanas en dar colonias visibles en medios convencionales. Éstas son bastante características, de color crema, rugosas ("en coliflor") y de superficie seca. Las colonias aisladas se identifican por la producción de niacina, por la reducción de nitratos, por poseer una catalasa termolábil y ser resistentes a bajas concentraciones de hidrazida del ácido tiofén-2-

carboxílico. Actualmente existen sondas genéticas que permiten una identificación directa de las colonias aisladas. Su lentitud de desarrollo en medios convencionales ha favorecido la introducción en los laboratorios clínicos de sistemas de detección rápida del crecimiento (sistema BACTEC). En éstos se utiliza un medio líquido semisintético (7H12 de Middlebrook) que contiene ácido palmítico marcado con ^{14}C . El crecimiento de *M. tuberculosis* se comprueba al detectar, mediante un aparato adecuado, la aparición de CO_2 radiactivo en el frasco de cultivo (Pediatría, parte B Libro 5. s/f)

Entre la tercera parte y la mitad de las muestras positivas en el cultivo muestran tinción acidorresistente positiva (Garza y Treviño, 2000).

El uso de medios sólidos se considera indispensable, ya que permiten confirmar la pureza del cultivo, la morfología de la colonia, y sirven de base para la realización de las pruebas de sensibilidad (Hernández *et al.*, 2002).

No obstante, en algunos pacientes se negativizan los cultivos que fueron positivos a baciloscopía, esto es debido a que los bacilos que se siguen eliminando están lo suficientemente lesionados por el tratamiento para que no sean capaces de desarrollarse en los cultivos. Esto da lugar a lo que se llaman "falsos positivos" de la baciloscopía (examen microscópico positivo con cultivo negativo o "bacilos inviables"). Todas las muestras clínicas sospechosas de contener micobacterias se deben sembrar (tras su adecuada digestión y descontaminación, si fueran necesarias) en medios de cultivo adecuados por las siguientes razones:

1. Los cultivos son mucho más sensibles que los exámenes microscópicos, al punto que pueden detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por ml de muestra clínica digerida y concentrada.
2. El aislamiento en cultivo puro es necesario para poder identificar la especie de las cepas aisladas.
3. Si la baciloscopía es un índice de la eficacia del tratamiento, el cultivo permite asegurar la negativización y curación del paciente.

También es importante conseguir la licuefacción de los restos orgánicos (tejidos, moco, suero y otros materiales proteináceos) que rodean a los microorganismos, para que los agentes descontaminantes puedan destruir las

bacterias no deseadas. Así, sobrevivirán las micobacterias y podrán tener acceso a los nutrientes del medio. Las micobacterias son más resistentes a los ácidos y bases fuertes que otros microorganismos, lo que permite utilizar con éxito estas técnicas de digestión-descontaminación. Pero si éstas no se utilizan adecuadamente pueden afectar también la viabilidad de las micobacterias presentes en la muestra y dar lugar a falsos cultivos negativos (por exceso de descontaminación) o a un número elevado de contaminaciones (por defecto de descontaminación) (Caminero *et al*, 1998)

Sobre la mesa de trabajo o en el interior de la cabina de seguridad se coloca un par de gradillas, una con los tubos de las muestras neutralizadas y centrifugadas con el número de caso del laboratorio en cada tubo. En la otra gradilla se colocan los tubos con medios de cultivo identificados con los números correspondientes. Se toman dos o tres gotas del sedimento de los tubos para realizar un frotis en una laminilla identificada con el número de caso correspondiente. Se deja secar al ambiente y se fija con pases rápidos por la llama teniendo cuidado de no producir aerosoles. Posteriormente se tiñe por coloración de Ziehl-Neelsen. Si algún tubo con medio contiene agua de condensación, esta deberá ser eliminada invirtiéndolo cerca del área estéril de un mechero hasta que no escurra agua. En muestras de origen animal se puede usar también la pipeta Pasteur, aunque se recomienda más la utilización del asa bacteriológica o del hisopo, ya que el sedimento se puede distribuir mejor y se evita la incubación de los tubos sembrados los primeros días en posición horizontal porque se requiere que se seque la superficie del medio como en las muestras de origen humano.

Para cada muestra se recomienda sembrar en dos tubos de medio Lowenstein Jensen y dos de medio Stonebrink. Las pipetas Pasteur deben flamearse, lo mismo que los tubos después de abiertos y antes de cerrarse. Los tubos con el medio de cultivo, mientras estén abiertos, deben mantenerse en posición inclinada cerca de la llama del mechero. Una vez sembrados los tubos se colocan en una bandeja con fondo inclinado, de modo que el líquido sembrado cubra la superficie del medio. Se llevan a la estufa de cultivo con la tapa floja para que se evapore la parte líquida de la siembra. Después de 48 horas se revisan los tubos y si se ha evaporado el

líquido, ajustar la tapa de rosca o colocar un tapón de hule, quemando e introduciendo el tapón de algodón dentro del tubo.

Los tubos se mantienen inclinados hasta el término del periodo de observación.

Revisión de los tubos de cultivo.

Para las muestras de origen animal, después de la primera revisión a las 48 horas, las revisiones deberán realizarse semanalmente hasta el transcurso de nueve semanas para los tubos con medio de Lowenstein Jensen y 12 semanas para tubos con medio de Stonebrink.

El medio de cultivo Lowenstein-jeensen

Entre los medios sólidos a base de huevo están aquellos como el Lowenstein-Jeensen (L-J), el cual contiene entre sus principales componentes huevos frescos completos, glicerol, sales minerales, verde malaquita, asparagina y, usualmente, como antibiótico la penicilina, para inhibir el crecimiento de contaminantes (Hernández *et al.*, 2002).

Características.

El medio Lowenstein Jensen, sin ser el ideal, es el que reúne más condiciones para usarlo en forma masiva en países como el nuestro, donde existe una red de laboratorios de la especialidad. Como la composición del Lowenstein Jensen es muy diferente a otros, especialmente por su contenido proteico (huevos) no puede esterilizarse al final de su preparación. Constituyentes básicos para el medio:

Solución de sales en gramos. Fosfato monopotásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$) 2.4, Sulfato de magnesio ($\text{SO}_4\text{Mg}7\text{H}_2\text{O}$) 0.24, Citrato de magnesio ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Mg}_3\text{O}_{14}7\text{H}_2\text{O}$) 0.60 ó ($\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{Mg}_3\text{O}_{14}14\text{H}_2\text{O}$) 0.935, L-Asparagina 3.6 Glicerina bidestilada 12 ml y Agua destilada *642 ml.

Se considera pérdida de 5% de volumen en el autoclave.

Suspensión de huevos enteros 1000 ml

Solución acuosa de verde de malaquita al 2% 20 ml (Cruz *et al.*, 1987).

4.10.- Métodos de diagnóstico.

Roberto Koch (1843-1910) en 1882 descubre el agente etiológico (*Mycobacterium tuberculosis*) y luego desarrolla la tuberculina (1891), nombre que le diera por consejo de su discípulo, von Budjwid, y que permitió a Clemens von Pirquet (1874-1929) en 1907 iniciar los estudios tuberculínicos con las modificaciones posteriores de Charles Mantoux (1879-1929 método intradérmico) (González y González, 1995).

El análisis histopatológico para tuberculosis bovina a partir de tejidos fijados en formalina al 10%, son procesados por el método de rutina de inclusión en parafina; ésta es una técnica relativamente rápida que dura de tres a cinco días y las muestras se conservan por muchos años en esta preparación, por lo cual se puede repetir el estudio a partir de la misma muestra, cuantas veces se requiera en un tiempo también muy corto de uno a dos días, siempre y cuando quede material en los bloques de parafina formados (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

Para la correcta realización e interpretación de los resultados de un examen microscópico directo deben tenerse en cuenta los siguientes hechos:

- a).- La ácido-alcohol resistencia es una propiedad común a todas las especies del género *Mycobacterium* y no sólo de *M. tuberculosis*.
- b).- La no observación de BAAR en una muestra clínica no descarta el diagnóstico de TB, ya que es una técnica de sensibilidad limitada. Se estima que la concentración más baja de microorganismos que se puede detectar mediante examen microscópico es de 10 por ml de muestra.
- c).- Al informar los resultados del examen microscópico, el microbiólogo debe proporcionar al clínico una estimación aproximada del número de BAAR detectados (Caminero *et al.*, 1998).

Por medio del análisis histopatológico, las preparaciones de tejidos, teñidos con H y E y con Z-N, 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 Lanhans. Un

caso positivo a la tinción de Z-N muestra bacilos alcohol ácido resistentes de color rojo brillante (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

Se ha encontrado que de 110 muestras procesadas, 16 (14,5%) se detectaron bacilos ácido-alcohol-resistentes, mediante la coloración de Ziehl-Neelsen; de éstas, sólo crecieron micobacterias en 7 (43,7%), de las 94 muestras (85,5%) de baciloscopía negativa hubo crecimiento en 11 (11,7%) en el medio de L-J.

La sensibilidad de esta técnica depende de la presencia en la muestra de 5×10^2 bacilos por mililitro de muestra. Por otra parte, se ha demostrado que el cultivo tiene una mayor sensibilidad, ya que se requiere de unos pocos cientos de bacilos por muestra para su crecimiento en los medios de cultivos convencionales (Hernández *et al.*, 2002).

Prueba de la tuberculina.

La tuberculina o derivado proteínico purificado (DPP) es una solución esterilizada, preparada a partir de productos de crecimiento y lisis tratados con calor de una o más cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Se aplica por vía intradérmica como un agente de diagnóstico para probar la hipersensibilidad a la tuberculoproteína (López, 1998).

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 (Office International des Epizooties, 2002).

Las zonas de inyección deben ser afeitadas y limpiadas cuidadosamente. Se mide, con un calibrador de precisión, el espesor del pliegue de la piel en cada área afeitada. Debe emplearse una aguja corta con la punta biselada conectada a una jeringa graduada (que contiene la tuberculina). La inyección se realiza introduciendo la aguja oblicuamente en las capas profundas de la piel e inyectando a continuación

la dosis de tuberculina. Después se comprueba que la inyección ha sido bien realizada, en cuyo caso podrá detectarse al tacto una pequeña inflamación en el lugar de la misma. Transcurridas 72 horas, vuelve a medirse el espesor del pliegue de piel en cada punto de inyección. La interpretación de los resultados se basa en la observación de un aumento del espesor del pliegue cutáneo. En el caso de la prueba intradérmica simple (que requiere una única inyección de tuberculina bovina), la respuesta se considera negativa cuando no se observa más que una leve inflamación, con un incremento de espesor no superior a 2 mm y sin signos clínicos como la presencia de un edema difuso o generalizado, exudación, necrosis, dolor o inflamación de los conductos linfáticos de esta zona o de los nódulos linfáticos. El resultado será considerado dudoso cuando no se observe ninguno de estos signos clínicos y el aumento de espesor del pliegue cutáneo esté comprendido entre 2 y 4 mm. La reacción se considera positiva si se observan los mencionados signos clínicos o si se produce un engrosamiento del pliegue cutáneo igual o superior a 4 mm. Por otra parte, y en el caso de rebaños infectados por *M. bovis*, cualquier inflamación palpable o visible deberá ser considerada como sinónimo de resultado positivo. El resultado se considera dudoso si la reacción a la tuberculina bovina es positiva pero el aumento de espesor es entre 1 superior al de la reacción aviar. La prueba será considerada negativa cuando la reacción a la tuberculina bovina sea negativa o, aún siendo positiva, el engrosamiento sea igual o menor que el provocado por una reacción positiva a la tuberculina aviar. En ocasiones se adopta una interpretación más restrictiva. En el caso de la prueba de inyección en el pliegue caudal, todo cambio palpable o visible será considerado como reacción positiva (Office International des Epizooties, 2002).

Esta respuesta se puede detectar mediante una induración visible y palpable de la zona cutánea donde se practicó la prueba. Se puede acompañar de edema, eritema y a veces vesiculación, necrosis y linfadenitis regional (Caminero et al., 1998).

4.10.1.- Tuberculinización

Las pruebas de tuberculinización autorizadas por la SAGAR son la prueba en pliegue caudal, la prueba cervical comparativa y la prueba cervical simple. La tuberculina autorizada para efectos de Campaña son el PPD bovino elaborado con *Mycobacterium bovis* cepa AN5, para las tres pruebas y el PPD aviar teñido con el colorante rojo de Ponceau elaborado con *Mycobacterium avium* cepa D4, que se utiliza en la prueba doble comparativa (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

La potencia se expresa en UI., en varios países, y en lo que concierne al ganado vacuno, se considera aceptable una tuberculina bovina cuando su potencia estimada garantiza una dosis mínima por bovino de 2.000 UI ($\pm 25\%$). En el caso de sujetos con una sensibilidad alérgica reducida, será necesaria una dosis superior de tuberculina. Para la práctica de campañas de erradicación se recomiendan dosis de hasta 5.000 UI. El volumen de cada dosis inyectada no debe sobrepasar los 0,2 ml (Office International des Epizooties, 2000).

Para la prueba intradérmica comparativa, la dosis de tuberculina inyectada no debe ser inferior a 2.000 UI de tuberculina bovina ni a 2.000 UI de tuberculina aviar. La distancia entre ambas inyecciones debe ser de aproximadamente 12 a 15 cm. En animales jóvenes, cuyo cuello tal vez no ofrezca espacio suficiente para cumplir con este requisito, deberá administrarse de forma simétrica una inyección en cada lado, en el centro del tercio medio del cuello (Office International des Epizooties, 2000).

4.10.2.- Análisis 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. Se realiza la técnica de rutina de inclusión en parafina, y las tinciones de hematoxilina-eosina (H y E), Ziehl Neelsen (Z-N) y nueva fucsina. (Office International des Epizooties, 2000).

4.10.3 Análisis microbiológico.

La baciloscopía consiste en la observación microscópica de una muestra teñida con colorantes específicos para micobacterias. Es una técnica rápida, de bajo costo y buena especificidad en nuestro medio.

La técnica de Ziehl-Neelsen consta de las etapas de coloración, decoloración, y coloración de contraste. La observación microscópica se hace con lente de inmersión y ocular 8 a 10x. Se debe leer un mínimo de cinco zonas que sean representativas del extendido y un mínimo de 100 campos útiles (Cruz *et al.*, 1987).

Se trabajan tejidos no mayores de 2 cm por lado, con lesiones sugestivas a tuberculosis sumergidos en una solución saturada de borato de sodio en un tiempo no mayor de 10 semanas. Se examinan frotis directo del material sospechoso y se tiñen con Ziehl Neelsen o nueva fucsina. Puede utilizarse la microscopía de fluorescencia mediante la tinción con Auramina - rodamina, auramina-acridina o auramina-fenol. El examen indirecto consiste en cultivo, aislamiento e identificación de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con o sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen (NOM-032-ZOO-1995).

4.10.4.- Diagnostico Molecular.

Reaccion en cadena de polimerasa (PCR) biología molecular.

Recientemente, las técnicas de biología molecular han mostrado ser de gran valor en el diagnóstico de micobacterias, incluso para poder distinguir entre especies, siendo la PCR. muy útil en este propósito. La mayoría de estos ensayos amplifican fragmentos del llamado complejo tuberculoso y por lo tanto no pueden distinguir entre infecciones causadas por *M. tuberculosis* de aquellas causadas por *M. Bovis* (Elkin *et a.l.*, *s/f*).

Un diagnóstico más rápido permitirá tomar acción inmediata para identificar las fuentes más comunes de tuberculosis en el ganado. El uso de PCR presenta una buena correlación entre la mayoría de las muestras ya que las muestras positivas en PCR pueden ser confirmadas por cultivo. Sin embargo, algunas investigaciones

sugieren que el PCR en tejido es menos sensible que en muestras de sangre o leche (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

Entre los nuevos métodos de identificación esta la cromatografía de líquidos, secuencia de ADN, la secuencia de especies específicas con PCR, los análisis enzimáticos de amplificación y restricción e hibridación con las pruebas de DNA con especificidad de especie. (Plikaytis *et al.*, 1998; Hongmanee *et al.*, 2001).

Los aspectos técnicos del desarrollo de Dot-ELISA son simples y rápidos (5 min), reproducibles, así como sensibles (87%) y específicos (93%). Empleando un inmunoensayo muy sensible, tal como el Western Blot, los antígenos de TB de 55 kDa fueron detectados en todos los sueros (100%) que mostraron falsos negativos por dot-ELISA, así como en todos los sueros positivos. Por lo tanto, la técnica se puede emplear para el diagnóstico en campo de las infecciones de TB para países en vías de desarrollo. La PCR combinada con CB-18 y sílice, la sensibilidad de la PCR es de 94.1% y 58.8% por lo que la detección de *M. bovis* es confiable por medio de esta técnica en leche (Cornejo *et al.*, 1998).

Polimorfismo en la Longitud del Fragmento de Restricción (RFLP'S).

Actualmente se desarrollan métodos de tipificación por PCR, algunos de los cuales se basan en el polimorfismo IS6110 que ayudan a disminuir el tiempo necesario para la identificación de las cepas del complejo *M. Tuberculosis*. A pesar de que IS6110 se presenta en muchas cepas del complejo, el número de copias parece ser una diferencia en *M. bovis* incluido *M. Bovis* BCG (Gutiérrez *et al.*, 1995).

4.10.5.- Pruebas Serológicas (Elisa).

La prueba de ELISA indirecta, para la detección de anticuerpos séricos, posee baja sensibilidad, pero es muy fiable en la detección de vacas anérgicas a las pruebas de la tuberculina y γ -Interferón. En su forma anamnésica incrementa notablemente su sensibilidad (> 90%) y confiabilidad en la detección de animales "anérgicos" (Garza y Treviño, 2000).

La técnica de ELISA para detectar γ -IFN producido por las células Tdh, consiste en sensibilizar a estas células con PPD bovino y PPD aviar, utilizando sangre heparinizada. Después de cierto tiempo en incubación se realiza el estudio

en el plasma. La técnica es confiable y se encuentra disponible comercialmente (Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995).

4.10.6.- Sistema BACTEC .

La técnica radiométrica de cultivo líquido (BACTEC), es la más rápida y requiere en promedio, 13 días para que se consideren como positivos (Moore y Curry, 1998). Detectaron automáticamente el crecimiento micobacteriano midiendo la cantidad de carbono 14 producido en el metabolismo de sustratos (ácidos grasos) marcados con Carbono. 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.

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. Para tratar de eliminar el uso de ¹⁴C se trabaja actualmente en técnicas que permiten detectar el crecimiento micobacteriano mediante fluorimetría. Los medios que se están probando llevan incorporado un compuesto de rutenio que emite fluorescencia detectable a medida que disminuye la tensión parcial de O² del medio como consecuencia del metabolismo microbiano. Esta medición del crecimiento por fluorimetría sustituirá en un próximo futuro a los métodos radiométricos (Beavis *et al.*, 1995).

El sistema radiométrico BACTEC TB es un método de referencia. Además, puede utilizarse para la identificación presuntiva entre el complejo *M. tuberculosis* y las otras micobacterias no tuberculosas, así como para las pruebas de sensibilidad. Actualmente, las técnicas de ácidos nucleicos parecen una mejor alternativa para la

identificación rápida y precisa de las especies micobacterianas (Alcaide y Benítez, 1998).

4.11.- Control y Erradicación de la tuberculosis.

Por lo que se refiere a la normatividad en materia de campaña sanitaria específicamente tuberculosis se basa en la Ley de Sanidad Animal, ésta ley es de observancia general en todo el territorio nacional y tiene por objeto fijar las bases para el diagnóstico, la prevención, control y erradicación de las enfermedades y plagas de los animales, con excepción de los que tengan como hábitat el medio acuático; fundamentándose también en la Norma Oficial Mexicana que es de carácter obligatorio, elaborada en los comités consultivos nacionales de normalización de acuerdo con lo establecido en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; expedida por la Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) que establecerá las campañas y cuarentenas necesarias de animales (DOF, 1993).

La Norma Oficial Mexicana correspondiente es la NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) publicada el 8 de marzo de 1996 y modificada en 1998 (DOF, 1996).

En explotaciones con porcentajes elevados de reaccionantes positivos a la prueba cada año, es posible que esta situación sea debida a la presencia de animales "anérgicos" a la tuberculina, con gran capacidad de contagio. En este caso, se realizará conjuntamente con la tuberculina una prueba de ELISA, preferiblemente anamnésica, eliminando los positivos a una u otra prueba. La aplicación de esta prueba sistemática durante tres veces consecutivas en un año, garantiza la eliminación de la infección en la mayoría de los casos (Goddeeris y García, s/f).

En México, el control y erradicación de la tuberculosis bovina es fundamental por sus implicaciones en salud pública y por factores socioeconómicos. La exportación de ganado en pie a los Estados Unidos de Norteamérica, establece una parte importante de divisas que ingresan a nuestro país por concepto de producción pecuaria. Como apoyo a las campañas nacionales para el control y erradicación de

diversas enfermedades de los animales domésticos, el Gobierno Federal ha equipado laboratorios en todo el país para que colaboren en la detección de estas y realicen un sistema de monitoreo del avance de campañas tal es el caso de la Comarca Lagunera que participa en la Campaña Nacional para el control y erradicación de la tuberculosis y brucelosis. Una vez identificados los animales infectados se procede a su eliminación, en nuestro país, el número de animales infectados es elevado por lo que es una decisión delicada con respecto a los criterios a seguir. Actualmente en nuestro país existe la campaña nacional contra la tuberculosis bovina, en donde se establecen los pasos a seguir para el control y erradicación, así como las pruebas para el diagnóstico. (Delgado, 1999).

Uno de los principales problemas que surgen en el curso de las campañas de control y erradicación de la tuberculosis bovina 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. (Gutiérrez *et al.*, 1995).

4.11.1.- Vacunación.

En ganado, BCG es usado en una serie de pruebas con varios grados de protección al desafío del agente *M. bovis*. El desarrollo de la prueba con una disminución entre infección con *M. tuberculosis* o *M. Bovis* y vacunación con BCG puede ayudar mucho en el diagnóstico temprano de la infección. ESAT-6 es una proteína recientemente identificada de bajo pasaje molecular. Es un antígeno de distribución restringida en especies, existe fundamentalmente en *M. Tuberculosis* y *M. Bovis* pero no en BCG (Buddle *et al.*, 1998).

4.11.2.- Tratamiento.

Albert Schatz descubre la estreptomicina (1943), primer antibiótico específico para destruir el bacilo de Koch. Posteriormente, Jorgen Lehman desarrolla el ácido para-amino-salícilico, con la colaboración de Karl-Gustav Rosdahl y diversos grupos de investigadores de tres compañías farmacéuticas diferentes, Squibb y Hoffman-La Roche en Estados Unidos de Norteamérica y Bayer de Alemania, encuentran que un compuesto de síntesis, hallado por Meyer y Mally en 1912, tenía gran acción bactericida sobre el bacilo de la tuberculosis (González y González, 1995)

El bacilo tuberculoso, es un agente celular facultativo, por lo tanto las drogas deben ser también capaces de penetrar las células. La microscopía electrónica es una técnica estabilizada que es usada para deliberar diferentes tipos de drogas, incluyendo antígenos, por inyección o por administración oral, esteroides, peptidos proteínas y antibióticos los autores proponen desarrollar pequeñas microesferas para aplicar las drogas antibacteriales a los macrófagos infectados (Barlow, 1997).

V.- Materiales y Métodos.

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 dirección periférico y carretera Santa Fe S/N Torreón Coahuila, ciudad que forma parte de la Comarca lagunera.

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

5.2.- Sitio de Muestreo

Se realizaron muestreos de órganos que se consideraron sospechosas a tuberculosis recolectados en el rastro (TIF) Municipal de Torreón Coahuila.

5.3.- Obtención y Procesamiento de muestras. Se realizó la toma de muestras de seis pares de nódulos linfáticos; (nódulos linfáticos retrofaríngeal, mandibular, mediastinal, traqueobronqueal, y mesentérico), pulmones, corazón, bazo, estómago, intestino, y médula espinal (Peters *et al.*, 2000).

Se procesaron 23 muestras de tejidos de canales, provenientes de animales sacrificados en el rastro TIF de Torreón, y que presentaron lesiones macroscópicas sugestivas a tuberculosis bovina, las cuales fueron conservadas en borato de sodio para su conservación y su posterior siembra; a la par, se conservaron en formol al 10% para su diagnóstico por histopatología por medio de las tinciones de Ziel-Neelsen y eosina hematoxilina, el cultivo se llevó a cabo en medio de Lowenstein-Jensen de acuerdo al Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio en Tuberculosis, expedido por la Secretaría de Salud, en la clínica de especialidades de la ciudad de Torreón.

Se realiza la homogeneización de la muestra por medio de macerado de la muestra en mortero estéril, después, la muestra se agrega a un tubo con pipeta Pasteur éste, se rotula para evitar confusiones, se le añaden 5 partes de ácido

clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen de material y posteriormente se agita y se deja en reposo durante 20 minutos, se añade gota a gota una solución de NaOH 2N agitando el tubo hasta que el indicador vire a un color entre morado y lila. Se centrifuga la muestra a 3,000 rpm durante 20 minutos, se decanta y el sobrenadante se desecha, el sedimento queda listo para sembrar.

Para la descontaminación clínica se utilizó el método de Potroff. Se usaron tubos con tapón de rosca, a cada tubo se le agrega un volumen igual al de su contenido de NaOH al 4 % con rojo de fenol, se agita durante 20 segundos y se incuba a 37 °C durante 15 minutos, se centrifuga a 3,000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se elimina el sobrenadante (en un recipiente que contenga fenol al 5%), se neutraliza el sedimento con ácido clorhídrico 1N o ácido sulfúrico al 8% antes de sembrar.

Para realizar la siembra, se colocan dos tubos: uno que contenga la muestra debidamente identificado y el otro con el medio previamente identificado, de la muestra se toma aproximadamente 1 ml con la pipeta Pasteur y se siembra en dos tubo del medio, las pipetas deben flamearse lo mismo que los tubos después de abiertos y antes de cerrarse. Los tubos con el medio de cultivo, mientras estén abiertos, deben mantenerse en posición inclinada cerca de la flama. Una vez sembrados se colocan los tubos en una bandeja de fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Después de 48 horas se revisan los tubos y si se ha evaporado el líquido se ajusta la tapa. Posteriormente se realizan revisiones semanales para observar si hay crecimiento microbiano. Así mismo, se sembraron muestras clínicas con *Mycobacterium tuberculosis* como controles positivos, así mismo se dejaron tubos sin sembrar de testigos de esterilidad de los medios.

a) Homogenización de muestras. Se realiza la homogeneización de la muestra por medio de macerado de la muestra en el mortero, después la muestra se agrega a un tubo con la pipeta Pasteur, el tubo se rotula para evitar confusiones, se le añaden 5 partes de ácido clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen del material, posteriormente se agita el tubo y se deja en reposo durante 20 minutos, se añade gota a gota una solución de NaOH 2N agitando el tubo hasta que el indicador vire a

un color entre morado y lila. Se centrifuga la muestra a 3,000 rpm. durante 20 minutos, se decanta y el sobrenadante se desecha el sedimento queda listo para sembrar.

El operador siempre debe trabajar protegido y en condiciones de esterilidad, se utiliza instrumental quirúrgico estéril y un mortero de porcelana previamente esterilizado, envuelto en papel. El mortero debe tener una capacidad tres a cuatro veces el tamaño de la muestra, dentro del mortero se fracciona la muestra con ayuda de un bisturí y posteriormente se macera la muestra con ayuda del mortero.

En las muestras se debe eliminar la flora que por lo general se encuentra asociada: para la descontaminación se utilizó el método de Petroff. Se usan tubos con tapón de rosca, a cada tubo se le agrega un volumen igual al de su contenido de NaOH al 4 %, con rojo de fenol ya incorporado, se agita posteriormente durante 20 segundos antes de incubar a 37 °C durante 15 minutos, terminada la incubación se centrifuga a 3,000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se elimina el sobrenadante (en un recipiente que contenga fenol al 5%), se neutraliza el sedimento con ácido clorhídrico 1N o ácido sulfúrico al 8% antes de sembrar.

Para la siembra se colocan en la mesa de trabajo dos tubos uno que contenga la muestra debidamente identificado y el otro con el medio previamente identificado, de la muestra se toma aproximadamente 1 ml con la pipeta Pasteur y se siembra en cada tubo del medio, las pipetas deben flamearse lo mismo que los tubos después de abiertos y antes de cerrarse. Los tubos con el medio de cultivo, mientras estén abiertos, deben mantenerse en posición inclinada cerca de la flama. Una vez sembrados se colocan los tubos en una bandeja de fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Se lleva a la estufa de cultivo con la tapa floja para que pueda evaporarse la parte líquida de la siembra. Después de 48 horas se revisan los tubos y si se ha evaporado el líquido se ajusta la tapa.

b) Analisis Histopatologico.

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

(H y E), Ziehl Neelsen. Por medio del análisis histopatológico, las preparaciones de tejidos, teñidos con H y E y con ZN, 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 (DOF, 1995).

El análisis histopatológico de la tuberculosis bovina a partir de tejidos fijados en formalina al 10%, procesado por el método de rutina de inclusión en parafina, es una técnica relativamente rápida que dura de tres a cinco días y las muestras se conservan por muchos años en esta preparación, por lo cual se puede repetir el estudio a partir de la misma muestra, cuantas veces se requiera en un tiempo también muy corto de uno a dos días, siempre y cuando quede material en los bloques de parafina formados (DOF, 1995).

Neelsen (ZN) y nueva fucsina es el diagnóstico del laboratorio para Un caso positivo a la tinción de ZN muestra bacilos alcohol ácido resistentes de color rojo brillante (DOF, 1995).

El principal problema del diagnóstico histopatológico de la tuberculosis bovina no está en la interpretación de la las lesiones, sean esta sugestivas o compatibles con la infección sino en la identificación del agente causal (Delgado, 1999).

M. tuberculosis actualmente depende de la tinción ácido alcohol resistente (BAAR) (Moore y Curry, 1998; Hongmanee *et al.*, 2001).

c) Baciloscopia.

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 (H y E), Ziehl Neelsen. Por medio del análisis histopatológico, las preparaciones de tejidos, teñidos con H y E y con ZN, 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 (DOF, 1995).

Esta es una técnica relativamente rápida que dura de tres a cinco días y las muestras se conservan por muchos años en esta preparación, por lo cual se puede repetir el estudio a partir de la misma muestra, cuantas veces se requiera en un tiempo también muy corto de uno a dos días, siempre y cuando quede material en los bloques de parafina formados (DOF, 1996).

La detección al microscopio del bacilo alcohol ácido resistente teñido por ZN es rápida pero no tan sensitiva (se necesitan por lo menos 10^4 bacterias (Zanden *et al.*, 1998).

d) PCR-anidado.

La PCR un es método simple, rápido y poderoso para la amplificación de genes, con un gran potencial de aplicación en el diagnóstico y manejo de las enfermedades infecciosas (Frothingham, 1996).

La PCR es una técnica de amplificación en *in vitro* que puede en cuestión de alguna horas, amplificar secuencias específicas de ADN (Taylor y Quirke, 1993). La importancia de este procedimiento es su habilidad de amplificar ADN intacto de un fragmento por medio de simples reacciones químicas en un tubo de ensayo haciendose positivas al clonar secuencias específicas de ADN de tamaños que varían entre 50 a 2000 pares de bases de forma rápida y sin la necesidad de una célula viva (Eisenstein 1990).

Las características demostradas por las técnicas de amplificación mediada por la transcripción, así como la técnica basada en la PCR. Los rangos de sensibilidad van del 82-100% y la especificidad del 98-100 % han sido documentados. (Moore y Curry, 1998).

VI.- Resultados y Discusión.

En 1908 inician los cultivos de bacilo de Koch en papa glicerizada bilingüe, con la colaboración del veterinario, Camille Guerin (1872-1961). Luego de 230 pasajes obtuvieron un bacilo definido, inofensivo, con estabilidad completa y con capacidad antigénica (González y Gonzáles, 1995). Desde entonces en infinidad de trabajos acerca del cultivo y aislamiento de bacilo *Mycobacterium bovis*, este ha mostrado un comportamiento muy variado.

En el presente trabajo realizado y tomando en cuenta la importancia de la Tuberculosis Bovina en nuestro país se obtuvieron los siguientes resultados:

1. De las 23 muestras analizadas las 23 fueron negativas al cultivo en el medio comercial Lowenstein Jensen.
2. De las 23 muestras analizadas 16, 18 y 15 fueron positivas a la PCR, histopatología y ZN. Como se puede observar el cultivo del bacilo fue superado por las otras técnicas (Cuadro 1).

Al comparar los resultados entre las técnicas se destacó que la relación de proporciones entre PCR/ZN (43%.47) e Histo/ZN (60.86%) mientras que la relación de las otras técnicas con respecto al cultivo fue negativa.

Cuadro 1.- Resultados del análisis de muestras sospechosas a tuberculosis bovina en el rastro de tipo inspección federal (TIF) de Torreón, Coah. México.

| Muestra | Resultado cultivo. | Resultado PCR | Resultados ZN | Resultados Histopatología. |
|-----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------------|
| 1 | Negativo | Negativo | + | + |
| 2 | Negativo | Positivo | - | + |
| 3 | Negativo | Positivo | + | + |
| 4 | Negativo | Positivo | - | + |
| 5 | Negativo | Positivo | + | + |
| 6 | Negativo | Positivo | - | - |
| 7 | Negativo | Negativo | + | + |
| 8 | Negativo | Positivo | + | + |
| 9 | Negativo | Positivo | - | + |
| 10 | Negativo | Positivo | - | - |
| 11 | Negativo | Positivo | + | + |
| 12 | Negativo | Positivo | - | - |
| 13 | Negativo | Positivo | + | + |
| 14 | Negativo | Negativo | + | + |
| 15 | Negativo | Positivo | + | + |
| 16 | Negativo | Negativo | - | + |
| 17 | Negativo | Negativo | + | - |
| 18 | Negativo | Positivo | + | + |
| 19 | Negativo | Positivo | - | - |
| 20 | Negativo | Negativo | + | + |
| 21 | Negativo | Positivo | + | + |
| 22 | Negativo | Negativo | + | + |
| 23 | Negativo | Positivo | + | + |
| # Muestras (+) | 0 | 16 | 15 | 18 |

Como se sabe, *Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina (TBB) en un amplio rango de especies animales y el hombre, con una pérdida a nivel mundial para la agricultura de 3,000 millones de dólares, por lo tanto, medidas que se propongan a fin de poder realizar un diagnóstico certero es de gran importancia, principalmente en países en vías de desarrollo, donde el problema es mayor.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar que en el cultivo de *Mycobacterium bovis*, se deben tomar en cuenta varios factores importantes. Como es el pH, ya que en este trabajo se tomo en cuenta el vire de color cuando a la muestra se le añade ácido clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen del material y de 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1 % (hasta que adquiera un color naranja) posteriormente, se añade gota a gota una solución de NaOH 2N agitando el tubo, hasta que el indicador vire un color entre morado y lila (Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR, 1996) mientras que el mismo manual editado en 1992 nos indica que el pH adecuado para el crecimiento del bacilo es de 6.7 a 6.9.

Otro de los factores que no fue tomado en cuenta es que de acuerdo a la experiencia obtenida en laboratorio clínico del hospital de especialidades de la ciudad de Torreón, se ha obtenido un mayor porcentaje de aislados de *Mycobacterium tuberculosis*, y no de a *Mycobacterium bovis*, lo cual se puede considerar que el medio de Lowenstein Jensen es mas específico para *Mycobacterium tuberculosis* que para *Mycobacterium bovis*.

Un tercer factor a considerar es que la conservación de tejidos para cultivos sospechosos a tuberculosis bovina conservados en borato de sodio al 6%, tienen una viabilidad, dependiendo del tiempo que se conservan de esta forma de acuerdo con el Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR, 1996 y el cual maneja un tiempo no mayor de 4 semanas, pero el mismo manual reconoce que se han logrado obtener cultivos positivos después de 10 semanas de permanecer el tejido en borato, mientras que la Norma Oficial Mexicana 031,1995 maneja un tiempo máximo de 10 semanas. En este trabajo, el tiempo que duraron los tejidos conservados de esta forma, fue muy irregular por cuestiones prácticas del mismo,

ya que se espera a que se juntaran cierta cantidad de muestras en el rastro para poder realizar la siembra, de acuerdo con lo reportado por Santillán 1998, las muestras de tejido pueden permanecer en borato de sodio hasta 90 días sin alterar la viabilidad de las micobacterias ya que cuando se conservan por más de 150 días se observan menos de 10 colonias por muestra.

Trejo *et al* 1996 reportan un 52.3% de resultados positivos bajo el criterio de correlación entre la prueba de tuberculosis, baciloscopia e histopatología y aislamiento bacteriológico, reportando un 46% como negativos, mientras un 41% restante resultando sospechosos a otros agentes.

La sensibilidad de la técnica de Ziehl-Neelsen, depende de la presencia de 5×10^3 bacilos por mililitro de muestra, para que puedan ser visualizados en el microscopio. Por otra parte, se ha demostrado que el cultivo tiene una mayor sensibilidad, ya que se requiere de unos pocos cientos de bacilos por muestra para su crecimiento en los medios de cultivos convencionales (Hernández *et al.*, 2002).

Como se observa en el Cuadro 1, el medio de cultivo empleado, Lewenstein-Jensen, no fue apropiado para lograr obtener resultados positivos, pese a confirmar la presencia de bacilos por la prueba de tinción ZN. Sin embargo, de acuerdo con los resultados encontrados por Bosquee *et. al* (1995), indicaron que es necesario realizar un número mayor de pruebas para poder determinar la presencia de micobacterias fastidiosas en las muestras clínicas (Bosquee *et al.*, 1995).

Para garantizar el éxito de un cultivo de micobacterias hay que tomar en cuenta que son gérmenes exigentes que necesitan medios enriquecidos especiales, en nuestro caso no hubo necesidad de adicionar nada para enriquecer el medio ya que se usó un medio de cultivo comercial.

En nuestro estudio, se colocaron cuatro muestras a crecimiento en BACTEC, no se logró obtener crecimiento alguno, pese a que se demuestra la presencia de bacilos, se diagnosticaron como positivas las primeras muestras por el método de histopatología y tres de ellas también lo fueron por la técnica de PCR. Por otra parte, el empleo de muestras clínicas confirmadas como tuberculosis humana, el agente causal, *M. tuberculosis*, si creció. Lo cual nos indica que en el caso del

microorganismos en estudio, requiere de enriquecimiento para el posible aislamiento de *M. bovis*.

Otros autores han encontrado sensibilidad en el medio de cultivo L-J de 56.8 y 33.3 % para la obtención de crecimiento del complejo de *M. tuberculosis* y *M. avium* respectivamente (Jost *et al.*, 1995). Sin embargo, los autores citados, encontraron buenos resultados de crecimiento empleando el sistema BACTEC 12B. Así mismo, Kaminski y Ardí (1995), emplearon cultivos de BACTEC 12B, con el propósito de lograr una identificación de especies de micobacterias, a través de la técnica de PCR. Resultados que fueron muy superiores a los que aquí encontramos.

Se debe contemplar que la posible ausencia de crecimiento de bacilos ácido alcohol resistentes puede deberse a que los niveles bajos de oxígeno y pH, y niveles altos de CO₂ que caracterizan el interior del granulomas parece crear un medio ambiente capaz de restringir el crecimiento del bacilo, (Delgado, 1999, Cousing *et al.*, 1998 b).

VII.- Conclusiones.

El aislamiento de *Mycobacterium bovis* en el medio de cultivo Lowenstein Jensen no es un método de diagnóstico confiable para la tuberculosis bovina.

El bacilo productor de la tuberculosis bovina necesita condiciones muy específicas para lograr su crecimiento en medios de cultivo comerciales.

El medio de cultivo Lowenstein Jensen no presentó especificidad para el aislamiento de *Mycobacterium bovis*.

VIII.- REFERENCIAS.

1. **Aguirre, S. O. (1981).** Guía Climática de la Comarca Lagunera. CIAN-CAELALA- ANIA-SARH.
2. **Alcaide, F., Benítez M. A., (1998).** Servicio de Microbiología. Ciutat Sanotária Universitaria de Bellvitge, Aspectos Microbiológicos de la infección por *Mycobacterium Kansasii*. Medicina general.
3. **Amasino, C. F. (1991)** Enfermedades Infecciosas de los animales, Trabajos prácticos, Carlos Amasino , Hemisferio sur, Buenos Aires. Med. General.
4. **Barlow, N. D., J.K. Kean, G. Hickling, P.G. Livingstone, y A. B. Robson. (1997).** A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zeland cattle heads. *Prev. Vet. Med*; 2:57-75.
5. **Beavis, K. G., M. B. Lichty, et al. (1995).** Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol. J Clin Microbiol* 33(10): 2582-6.
6. **Blood D. C. , (1996)** Manual De Medicina Veterinaria., edit. Interamericana. p 851.
7. **Boon, C., et al. (2001).** Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 2672-2676.
8. **Bosquee, et al. (1995).** Cervical lymphadenitis caused by a fastidious mycobacterium closely related to *Mycobacterium genavense* in an apparently immunocompetent woman: diagnosis by culture-free microbiological methods. *J Clin Microbiol.* 33(10): 2670-4.
9. **Buddle B. M., Parlene N. A., et al. (1998).** Differentiation between mycobacterium bovis BCG-Vaccinated and *M. Bovis*-infected cattle by Using recombinant mycobacterial Antigens.
10. **Calume Figueroa M. L., Silva López V. C., (2000).** Descripción de la Resistencia Adquirida de *Mycobacterium Tuberculosis* a los antibióticos contra la Tuberculosis en Bogotá entre Octubre de 1992 y Diciembre de 2000, Secretaria Distrital de Salud.
11. **Caminero J., Casal M., Ausina V., Piña M., Sauret J. (1998)** Diagnostico de la tuberculosis. Med. General.

12. **Campillo-Paez M. T, L.-P. T., Duro-Mota E, Causin-Serrano S. (2001).** Tuberculosis ganglionar. *Medicina general* 35: 529-532.
13. **Cedrés, F., Pesenti, J., Cicuta, et al.,** Tuberculosis y leucosis bovina: Confirmación diagnóstica en decomisos de frigoríficos.
14. **Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA/OPS/OMS), (2000)** Brasil. Tuberculosis (*M. Bovis*) Situación de los programas.
15. **Coetsier, C., P. Vannuffel, et al. (2000).** Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol* 38(8): 3048-54.
16. **Cornejo, J., Sahagun, A. Suarez F., Thornton Ch., Chaves G., Ficht T., y Adams, G. (1998).** Procesamiento de muestras de leche de bovino con CIO-CARBOXIPROPILBETAINE (CB-18) y sílice para la detección de *Mycobacterium bovis* por PCR. 1998; XXII Congreso Nacional de Buiatría , Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos A. C.
17. **Cotran R, Kumar V, Collins T. (2000)** Patología estructural y funcional. 6 ed. Madrid: Mc Graw- Hill-Interamericana,2000:370-3.
18. **Cousin, D., S. Williams, E. Liebana, A. Aranaz, A. Bunschoten, J. Van Embden, y T. Ellis. (1998.)** (a) Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 36: 168-178.
19. **Cousin, et al (1998).** (b) A cooperative oxygen-binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis* *Proc Natl Acad Sci U S A.*
20. **Couture, M., S. R. Yeh, et al. (1999).** A cooperative oxygen-binding hemoglobin from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(20): 11223-8.
21. **Cruz E., Pinto E., et al. (1987).** Adenosindeaminasa (ADA) en liquido pleural: valor para la identificación de la etiología tuberculosa. *Enf. Resp. Cir. Torac.*3:176
22. **Delgado, G .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.

23. **DOF. (1993).** "Ley de sanidad animal" Diario Oficial de la Federación. México D.F 18 de junio de 1993.
24. **DOF. (1996).** Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. "Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*)" Diario Oficial de la Federación. México D.F. 8 de marzo de 1996.
25. **Eisenstein, B. I. (1990).** The Polimerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The New England Journal of Medicine_322 (3): 178-183.
26. **Elkin M., Rodríguez J., Mejía G., Del portillo P., Murillo, L.;** s/f desarrollo de un nuevo método diagnostico para la tuberculosis bovina utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Instituto de Inmunología. Centro Hospitalario San Juan de Dios. Santafé de Bogotá.
27. **Espinosa de los Monteros, L. E., J. C. Galan, et al. (1998).** Allele-specific PCR method based on pncA and oxyR sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis* pncA sequence polymorphism. J Clin Microbiol ., 36, 239-242.
28. **Figueroa P., Enríquez F., Giono S., Berg D. E.,** construcción de una biblioteca genómica de *v. cholerae* y caracterización genética de su efecto vacuolizante. 1encb-ipn, 2cinvestav-IPN, México y 3Washington University School of Medicine, St. Louis, MO.
29. **Frothingham, R. (1996).** Applications of the Polimerase Chain Reaction to Infectious Disease Diagnosis. Annals of Saudi Medicine. 16: 657-664.
30. **Garcia-Garcia L, V. J. L. (2001).** *Mycobacterium tuberculosis* en pulmones sin lesiones tuberculosas, ¿santuario inmunológico? la revista de investigación clínica 53: 460-461
31. **Garnier, T., K. Eiglmeier, et al. (2003).** The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A 100(13): 7877-82
32. **Garza, R., Treviño, I., (2000)** Universidad de Monterrey, División de Estudios Generales, Departamento de Ciencias Clínica Medicina general.
33. **Goddeeris B., García Marín J. F.** s/f Tuberculosis y paratuberculosis. Universidad de León.

34. **González Montaner , I., J. Y González Montaner P. (1995)** Tuberculosis, pasado , presente y futuro. Respiración. Med. General.
35. **Gonzalez-Juarrero, M., y I. M. Orme (2001).** Characterization of murine lung dendritic cells infected with Mycobacterium tuberculosis Infect Immun. 69 (2):1127-33.
36. **Gutiérrez, M., S. Samper, et al. (1995).** Differentiation by Molecular Typing of Mycobacterium bovis Strains Causing tuberculosis in cattle and Goats. J. Clin. Microbiol. 33: 2953-2956.
37. **Hernández, C. Z. F., Gómez, M. Villarroel, M. (2002)** Recuperación de mycobacterias mediante el uso de dos diferentes medios de cultivo, Sección de Bacteriología ,Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela.: 1-5.
38. **Hongmanee, P., H. Stender, et al. (2001).** Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous Mycobacterium species in smears of Lowenstein-Jensen and Mycobacteria Growth Indicator Tube cultures using peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol 39(3): 1032-5.
39. **Jost, et al. (1995).** Identification of Mycobacterium tuberculosis y M. avium complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer-driven pattern recognition models. J Clin Microbiol 33(5):1270-7.
40. **Kantor I. Et al.** Actualización en Tuberculosis Bovina (SAGP y A - INPPAZ OPS/OMS-SENASA)
41. **Lim, A. y T. Dick, (2001)** Plate-based dormancy culture system for Mycobacterium smegmatis and isolation of metronidazole-resistant mutants. FEMS Microbiol. Lett., 2001; 200: 215-219.
42. **Liu, J., E. Rosenberg, et al (1995).** Fluidity of the lipid domain of cell wall from Mycobacterium chelonae Proc Natl Acad Sci U S A 92(24): 11254-8.
43. **LoBue, P. A., W. Betacourt, et al. (2003).** Epidemiology of Mycobacterium bovis disease in San Diego County, 1994-2000. Int J Tuberc Lung Dis 7(2): 180-5.

44. **López-Antuñano, F. J. (1998).** Usos y efectos del bacilo *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin (vacunación con BCG). *Salud Publica de México* 39: 156-161.
45. **Manual de procedimientos de laboratorio INDRE/SAGAR:18. (1996)** Tuberculosis.
46. **March, P. y A. García (1993).** La evolución de la infección por VIH/Sida en los países desarrollados. impacto sobre la tuberculosis. *Med. Clin. (Barc)* 100: 87-93.
47. **Ministerio de Salud, Dirección General de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Sudirección de Epidemiología y laboratorio Nacional de Referencia (2002)** Vol.7, número 5.
48. **Moore, D. F., Curry I. J. (1998).** Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction *Clin Microbiol* 36(1028-31).
49. **Morán-López E y Lazo-Amador, Y., (2001).** Tuberculosis *Rev. Cubana estomatol* 38: 33-51.
50. **Murray, J. F. (1991).** Un programa mundial contra la tuberculosis emerge: agenda de investigaciones, incluyendo el impacto de la infección VIH. *Bol Union Int Tuberc Enf Resp.* 66: 229-231.
51. **Murugasu-Oei, B., A. Tay, y T. Dick. (1999)** Upregulation of stress response genes and ABC transporters in anaerobic stationary-phase *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Gen. Genet.* 1999; 262: 677-682.
52. **Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995. Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*).**
53. **Office International des Epizooties, (2002).**
54. **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 Suppl 1:1-46.
55. **Pediatría, parte B Libro 5. Vacuna contra la tuberculosis. S/f** Criterios de diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil.
56. **Perumaalla, V. S., L. G. Adams, et al. (1996).** Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Texas and Mexico. *J Clin Microbiol.* 34(9):2066-71.

57. Peters, J., J. M. Miller, et al. (2000). "Immunohistochemical diagnosis of chronic wasting disease in preclinically affected elk from a captive herd. J. Vet. Diag. Invest. 34(10): 2454-9.
58. Phillips, C. J., C. R. Foster, et al. (2003). The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Rev Vet Sci 74(1): 1-15.
59. Plikaytis, B. B., J. T. Crawford, et al. (1998). IS1549 from *Mycobacterium smegmatis* forms long direct repeats upon insertion J. Bacteriol. 180(5): 1037-43.
60. Rev. Apuntes Veterinaria.org, s/f, *Mycobacterias*.
61. Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo rural, fundado en 1991.
62. Rhoades, E. R., y I. M. Orme (1997). Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates Infect Immun. 65:1189-95.
63. Ruiz-Manzano J., Manterola M. J, et al., (1998). Nomenclatura y clasificación de las mycobacterias. arch bronconeumol 34: 154-157.
64. Santillán F. M. A., Sánchez L. M., Ramírez C. I. C., (1999). (a) Viabilidad de *Mycobacterium bovis* en solución de tetraborato de sodio, Téc Pecu Méx;37(1)71-74.
65. Santillán, F. M. A., Sánchez, L. M., Ramírez C. I. C., (1998), (b) Tipificación bacteriológica de *Mycobacterium bovis* de muestras de ganado lechero obtenidas de siete rastros. XXII Congreso Nacional de Búiatría , Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios especialistas en bovinos A. C.
66. Scanlan, Ch. M. (2003), Bacterial diseases of domestic Animals. Boehringer Ingelheim vetmedic. Veterinary Biologicals and Pharmaceuticals. St. Joseph., Missouri. USA. P3.
67. Sechi, L. A., I. Dupre, M. Sanguinetti, G. Fadda, and S. Zanetti. 1999. Simple and rapid identification of different species of *Mycobacteria* by PCR. Mol Cell Probes. 13(2):141-146.

68. Secretaria de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, 1995.

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Manual de Instrucciones; Procesamientos y Cultivo de muestras para la identificación de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*, Dirección de Diagnostico y Control Técnico (DILACOT).

69. Solano-Bernad V, H.-N. M., Martin-Sánchez J, et al., (2003). Exposición laboral a mycobacterium bovis multirresistente en un hospital de zaragoza. Rev. Esp. salud publica 77: 201-209.

70. Trejo C. A., Colín F. R., Maldonado H. G., (1996) Diagnostico de tuberculosis bovina en el estado de Nuevo León de junio de 1995 a Marzo de 1996.

71. Velásquez BG., García CL., Santillán FMA., Ramírez CC., Toledo OP., Acosta BAP. y Arriaga DC., (1998). Evaluación de la Reacción en Cadena de la Polímerasa (PCR) y Oligonucleotidos Específicos para la Identificación Diferencial de Micobacterias. XXII Congreso Nacional de Buiatría, Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos A. C.

74. Wayne, L.G. (2001) Sohaskey, Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. Annu. Rev. Microbiol., 2001; 55: 139-63.

75. Wedlock, D. N., M. A. Skinner, et al. (2002). Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human population. Microb. Infect. 4: 471-480.

76. Yuan Y, D. D. Crane, y CE. Barry III, (1996). Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial a-crystallin homolog. J. Bacteriol. 1996; 178: 4484-4492.

77. Zanden, A., G, M., A. Hoentjen, H., et al. (1998). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis complex* in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. J Clin Pathol 51: 209-214.