

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



**DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN  
PULMÓN Y NÓDULO LINFÁTICO MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR)**

**PRESENTA:**

**JOSEFINA GUARDIOLA SANDOVAL**

**TESIS PROFESIONAL**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA**

**OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO**

**ENERO 2009**

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



**DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN  
PULMÓN Y NÓDULO LINFÁTICO MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR)**

**PRESENTA:**

**JOSEFINA GUARDIOLA SANDOVAL**

**TESIS PROFESIONAL**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA**

**OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO**

**ENERO 2009**

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

**DETECCIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN  
PULMÓN Y NÓDULO LINFÁTICO MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR)**

**TESIS**

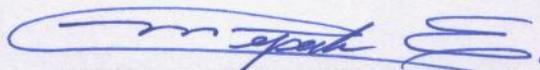
**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**JOSEFINA GUARDIOLA SANDOVAL**

**ASESOR**



**MC. MA. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE  
ASESORA PRINCIPAL**

**TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO.**

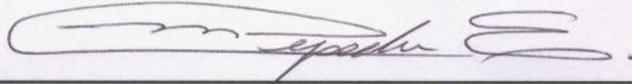
**ENERO 2009**

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

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

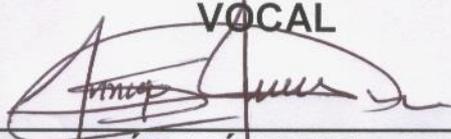
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESIDENTE:**



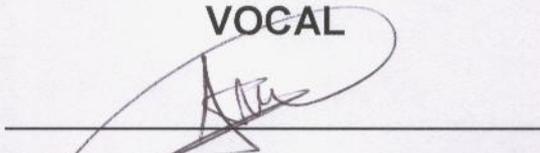
**MC. MA. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE**

**VOCAL**



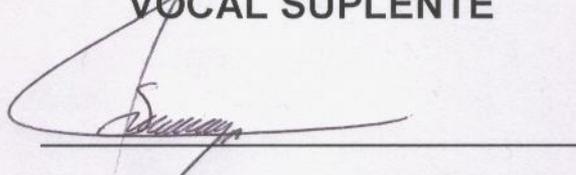
**DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO**

**VOCAL**



**MC. JOSÉ FRANCISCO SANDOVAL ELIAS**

**VOCAL SUPLENTE**



**MVZ. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

INDICE DE CONTENIDO.....	i
INDICE DE CUADROS .....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
DEDICATORIAS .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	viii
RESUMEN.....	1
I.INTRODUCCION .....	2
II. Objetivos.....	5
III. Hipótesis.....	6
IV. Revisión de Literatura.....	7
4.1.Salud Pública.....	7
4.2.Historia .....	8
4.3. Complejo <i>Mycobacterium</i> .....	10
4.3.1. Características Generales .....	10
4.4. Tuberculosis Bovina .....	14
4.4.1. Definición .....	14
4.4.2. Etiología.....	15
4.4.3. Epidemiología .....	16
4.4.4. Fuentes de infección y modo de transmisión .....	18
4.4.5. Patogenia.....	22
4.4.6. Signos clínicos de la Tuberculosis bovina .....	29
4.4.7. Lesiones.....	31
4.4.8. Perdidas económicas al productor y reducción en la eficiencia productiva por TBB .....	35
4.4.9. Prevención y control de la enfermedad .....	37
4.5. Diagnostico de la Tuberculosis bovina.....	40
4.5.1. Prueba tuberculínica Ano - Caudal .....	41
4.5.2. Prueba tuberculínica Cervical simple .....	42
4.5.3. Prueba tuberculínica doble comparativa .....	42

4.5.4. Diagnostico Bacteriológico.....	44
4.5.5. Forma de envío para aislamiento bacteriológico .....	45
4.5.6. Diagnostico Histopatológico .....	45
4.5.7. Forma de envío para aislamiento Histopatológico .....	46
4.5.8. Diagnostico Microbiológico.....	46
4.6. Diagnostico Molecular.....	48
4.6.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	48
4.6.2. Material.....	51
4.6.3. Equipo .....	51
4.6.4. Prueba de laboratorio .....	52
4.6.5. Ventajas de la PCR .....	59
4.6.6. Limitaciones .....	59
4.6.7. Descripción matemática de la PCR .....	60
V. NORMATIVIDAD .....	61
5.1.1. Objetivo y campo de aplicación de la Norma .....	61
5.1.2. Disposiciones generales de la campaña .....	62
5.1.3. Fases de Campaña de TB.....	64
5.1.4. Control.....	64
5.1.5. Erradicación.....	64
5.1.6. Libre .....	65
5.1.7. Identificación .....	66
5.2. Estrategias de la Campaña.....	67
5.2.1. Situación actual de la Tb .....	67
VI. MATERIAL Y METODOS .....	69
6.1. Localización geográfica de la Comarca Lagunera.....	69
6.2. Sitio de muestreo .....	69
6.3. Toma de muestras postmortem .....	69
6.4. Preparación de muestras postmortem.....	70
6.5. Extracción del ADN .....	70
6.6. Condiciones del a Reacción PCR .....	72
6.6.1. A partir de muestras de tejido.....	72
6.6.2. Condiciones para PCR simple.....	72

6.6.3. Condiciones para PCR anidada .....	72
6.6.4. Protocolo para control interno .....	73
6.7. Electroforesis en gel de agarosa .....	74
VII. RESULTADOS .....	75
VIII. DISCUSIÓN .....	78
IX. CONCLUSIÓN .....	81
IMAGENES .....	82
X. REFERENCIAS .....	86

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies del género <i>Mycobacterium</i> .....	13
Cuadro 2. Características de la infección por <i>M. bovis</i> y la inmunopatología asociada en los diferentes animales .....	34
Cuadro 3. Estados erradicados y en control de la tuberculosis bovina.....	68
Cuadro 4. Protocolo para tejido PCR simple .....	73
Cuadro 5. Resultados de análisis de muestras de nódulos linfáticos y pulmón de animales sospechosos a Tuberculosis bovina en el Rastro Municipal (TIF) de Torreón, Coahuila.....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patogenia de la Tuberculosis .....	28
Figura 2. Termociclador en el cual se hace una mezcla rápida de calor y frío de acuerdo al ciclo programado para PCR .....	51
Figura 3. Situación actual de la Tuberculosis bovina .....	67
Figura 4. Resultados de PCR simple en muestras de exudado nasal de bovinos reactivos a tuberculina. ....	77
Figura 5. PCR simple negativos de muestras de tejido pulmonar y nódulo linfático de animales con lesiones predisponentes a tuberculosis.....	77
Figura 6. PCR para confirmar la funcionalidad de reactivos mostrando resultados satisfactorios .....	77

## DEDICATORIAS

### **A mi madre LUCILA SANDOVAL MONTESINOS y a mi padre RAFAEL GUARDIOLA ELIZONDO**

Por su gran apoyo recibido desde pequeña por el esfuerzo tan grande para poder darme lo necesario para poder llegar hasta este nivel, y por estar conmigo en todo momento dándome el apoyo incondicional por ser mi razón de vivir y por que son los mejores padres que la vida me pudo dar, los **QUIERO MUCHO, GRACIAS** por **QUERERME** y apoyarme.

### **A mis Hermanas ING. VANEESA e ING. Ma. DEL ROSARIO GUARDIOLA SANDOVAL.**

Por ser mis grandes amigas, por estar conmigo cuando mas las he necesitado, y sobre todo por su gran apoyo para poder llegar hasta aquí, por el gran cariño y amor que nos tenemos. Las **QUIERO MUCHO** mis **HERMANA QUERIDAS.**

### **A mis Cuñados ING. AGUSTIN OLIVER DORANTES e ING. FRANCISCO MARTINEZ AVILÉZ.**

Gracias por todo el apoyo recibido y por los consejos dados para seguir en la lucha en este camino.

### **A mis Sobrinos, MI ANGELITA LULU, SAMUEL ISAID y SAMANTHA OLIVER GUARDIOLA**

A mis niños queridos los cuales han sido una bendición que el DIOS que nos mando a nuestras vidas para darnos una sonrisas hermosas y sobre todo por ese gran **AMOR** el cual me han dado , los **QUIERO MUCHO MIS NIÑOS HERMOSOS.**

### **A mi abuela materna: SRA. JOSEFINA MONTESINOS MONTAÑO (†)**

Por cuidarme quererme y darme su cariño y aunque ya no este conmigo yo se que me sigue cuidando como cuando era pequeña. Te quiero mucho donde quiera que estés.

### **A mi abuelo SR. TORIBIO GUARDIOLA (†)**

Por sus consejos y por su enorme cariño que me tuvo, por cada consejo e ilusión que tenía para cuando yo fuera una M.V.Z. yo se que donde estés abuelito te sentirás orgulloso de mi.

### **A toda mi familia**

Por darme su cariño, amor, por cada momento de alegría, tristeza y por darme su apoyo para seguir adelante **GRACIAS**.

### **A mi comadre JENNIFER SÁNCHEZ SANDOVAL**

Por estar conmigo en los momentos de alegría y tristeza, por tus consejos para lograr lo que quiero y además por ser además de mi confidente una **HERMANA** más para mi **GRACIAS** por quererme y apoyarme

### **A mi Segunda Familia LÓPEZ SERRATOS**

Quiero agradecerles por que desde que yo llegue a Torreón me recibieron y me dieron lo indispensable para poder acostumbrarme a una nueva vida fuera de mi casa, por su gran cariño, paciencia , respeto, confianza para poder ser un miembro mas de su familia **GRACIAS** y nunca podré agradecer todo lo que hicieron por mi .

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a **DIOS** por haberme dado la vida y por cuidarme mucho, y darme la fuerza de luchar día a día y no doblegarme en los problemas, gracias por tener a mi lado a mucha gente que me estima y me quiere.

A mi **ALMA MATER, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO UNIDAD LAGUNA** por brindarme la oportunidad de poder estudiar en ella y a cada persona, la cual colaboró para que yo cumpliera esta meta.

**A mi asesora: MC. Ma. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE**

Por su gran apoyo para la realización de mi tesis, por su paciencia, dedicación para la realización de mi investigación y por las facilidades que me dió.

**A mi asesor: Dr. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO.**

Por su paciencia y dedicación en la elaboración de esta tesis por el gran apoyo que me brindó para poder realizar el experimento y sobre todo por sus palabras de aliento para no desesperarme y seguir adelante.

Agradezco al **MC. JOSÉ FRANCISCO SANDOVAL ELÍAS Y M.V.Z. RODRIGO I. SIMÓN ALONSO**, por el apoyo que me brindaron en la revisión de mi trabajo.

A los **Médicos Veterinarios Zootecnistas** encargados del área de bovinos del Rastro Municipal de Torreón, al **MVZ. VÁSQUEZ y MVZ. MONTIEL**, por su apoyo, dedicación y consejos para la recolección de las muestras y a todas las personas que estaban en el área de bovinos por su respeto hacia mi y su apoyo. **GRACIAS** a todos.

Agradezco las facilidades del **CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS (CIB) DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE COAHUILA** para la realización de mi trabajo experimental, en especial a la **QFB. LEA ALONSO RANGEL**, por su tiempo, paciencia y dedicación para llevar a cabo mi experimento **GRACIAS.**

## RESUMEN

La Tuberculosis bovina (TBB) ocasionada por *Mycobacterium bovis* es un problema que afecta principalmente a la ganadería nacional, genera pérdidas económicas considerables y es un obstáculo para la movilización y comercialización de animales en territorio nacional e internacional, así como un riesgo en salud pública debido a que es una enfermedad zoonótica. En el presente estudio se buscó la identificación del agente causal de Tbb *Mycobacterium bovis*. Se recolectaron muestras de tejidos de canales sospechosas a Tbb del rastro municipal de la Ciudad de Torreón como fueron: tejido pulmonar y nódulos linfáticos bronquiales, en frascos con borato de sodio de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995 para el transporte y conservación del tejido. Para la realización del diagnóstico, se realizó la extracción de DNA mediante dos procedimientos: (1) empleando el Kit comercial DNAzol (Invitrogen, Inglaterra) y (2) empleando la digestión mediante proteinasa K, uso de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS 10%) y Buffer de lisis celular. Para el proceso de amplificación del DNA se emplearon un par de primers para control interno (CI) y otro par para la detección del gen de la proteína MP60 de *Mycobacterium*. Los resultados obtenidos fueron negativos lo cual pudo deberse a la no extracción del DNA Mycobacterial y/o la presencia de sustancias que inhiben la PCR, bajo las condiciones de trabajo.

**Palabras clave:** Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Extracción de ADN.

## I. INTRODUCCIÓN

La Tuberculosis bovina es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, no solo porque representa un riesgo para la salud pública, si no que además se traduce en grandes pérdidas económicas directas e indirectas y también constituye uno de los principales obstáculos para la movilización y comercialización nacional e internacional de ganado(Casal, 1987).

La industria lechera mexicana nacional ha experimentado un importante crecimiento en el proceso exportador durante los últimos años. Sin embargo, este auge de las exportaciones, se ve amenazado por las restricciones de tipo zoosanitarias, dentro de las cuales se encuentra la tuberculosis bovina (Tbb), que pueden ser impuestas por los mercados de destino de nuestros productos (Programa Nacional de Diagnostico y Saneamiento de Tuberculosis bovina, 2004).

La tuberculosis bovina (Tbb) se ha controlado en muchos países mediante la identificación y sacrificio de animales reactivos a la tuberculina. Además la incidencia de tuberculosis humana causada por *M. bovis* ha disminuido debido a la pasteurización de la leche (Grange *et al.*, 1994). El grado de infección por *M. bovis* en los animales depende de varios factores, como el número de organismos excretados, el tiempo de exposición, el grado de cercanía de un animal afectado y el tamaño de las partículas que contienen las micobacterias viables (Costello *et al.*, 1998).

La tuberculosis bovina recientemente ha tenido un gran desarrollo en sus técnicas de microbiología clínica, en el diagnóstico de la enfermedad, la resistencia a fármacos antimicobacterianos así como en las técnicas de tipificación con fines epidemiológicos. Y todo ello debido, por una parte, a la importancia en sí de estas enfermedades y por otra, al hecho de producirse en países con gran nivel tecnológico, económico y de desarrollo, como los Estados Unidos de América (Casal, 1987).

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que normalmente evoluciona de forma crónica y se acompaña de procesos inflamatorios específicos. Está, es producida por bacterias del género *Mycobacterium* y puede afectar tanto a seres humanos como animales domésticos o silvestres (Galey, 1998).

El *M. bovis* es el agente causal específico de la tuberculosis del ganado vacuno (Acha *et al.*, 2003); sin embargo, todas las especies, incluidos los seres humanos, son susceptibles al *M. bovis* (Beer, 1981; Radostits *et al.*, 2002).

La Tbb es causada por *Mycobacterium bovis*, bacilo gram-positivo con potencial zoonótico que está altamente relacionado genéticamente (99.95%) a *M. tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis humana (TB). A pesar de que el bacilo tuberculoso bovino y humano puede ser diferenciado por su rango de hospederos, las bases genéticas de su virulencia y características fisiológicas para esta diferencia se desconocen (Casal, 1987).

Es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por formar tubérculos (protuberancias) en cualquier órgano o tejido y se transmite principalmente por la ingestión de bacilos eliminados en la tos y el estornudo, tanto de las personas como de los animales. Además, existe el contagio por vía digestiva, donde la infección se adquiere al ingerir quesos frescos o leche contaminada no pasteurizada. Cuando la infección se localiza en órganos como los riñones o los nódulos, el agente bacteriano se elimina en la orina y otras secreciones corporales (Tuberculosis bovina, 2000).

Esta enfermedad constituye una zoonosis, es decir, existe la probabilidad de transmisión a seres humanos, provocando en ellos una infección clínica casi indistinguible a la causada por *M. tuberculosis* (Programa Nacional de Diagnóstico y Saneamiento de Tuberculosis Bovina, 2004).

La tuberculosis bovina tiene mayor prevalencia en explotaciones de ganado estabulado, donde la densidad de población es alta, esto se manifiesta claramente en el ganado bovino especializado en producción lechera, en este tipo de explotaciones se pueden encontrar índices elevados de prevalencia, en contraste con lo que ocurre en el ganado de carne, cuya explotación extensiva reduce los riesgos de contagio y por consiguiente la prevalencia es inferior (Casal, 1987).

La tuberculosis ha sido erradicada de los países desarrollados. En otros países en donde la enfermedad clásica se ha reducido, la enfermedad es producida por micobacterias atípicas. Los niveles de infección de tuberculosis bovina a nivel nacional se estima entre un 3% a 4% (Casal *et al.*, 1991).

El medio actual del control de la TBB es la estrategia de prueba y sacrificio, donde los animales que dan una reacción positiva en piel a una preparación cruda de un antígeno micobacterial, están infectados y por lo tanto son sacrificados (Garnier *et al.*, 2003).

Para el diagnóstico del agente patológico se ha realizado por medio de técnicas directas de microbiología molecular, las cuales han aportado numerosas posibilidades, con técnicas de amplificación genética de las que existen numerosas variantes, como la PCR (Casal *et al.*, 1991).

## II. OBJETIVO

- Diagnosticar la presencia de *Mycobacterium bovis* en tejido pulmonar y nódulos linfáticos bronquiales de animales con lesiones sospechosas a tuberculosis bovina mediante PCR.
- Determinar la sensibilidad, especificidad y eficiencia de la técnica de PCR para el diagnóstico de TBB en tejido pulmonar y nódulos linfáticos.

### III. HIPÓTESIS

- La PCR genera una sensibilidad y especificidad de  $> 90\%$

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Salud Pública.

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas que afectan al ser humano y de mayor mortalidad a nivel mundial (Langeneger *et al.*, 1981). La infección con *Mycobacterium bovis* es responsable de aproximadamente 7,000 casos nuevos de tuberculosis humana por año en América Latina (Toledo *et al.*, 1999). La facilidad y frecuencia con que la tuberculosis de los animales se extiende a las personas en un medio no controlado, convierten a esta enfermedad en una zoonosis importante (O'Reilly *et al.*, 1995).

La Tuberculosis en humanos es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, pero existe el riesgo de contraer esta enfermedad por *M. bovis*, agente etiológico de la tuberculosis del ganado (Cosivi *et al.*, 1998).

La Tuberculosis bovina (Tbb) se ha controlado en muchos países mediante la identificación y sacrificio de los animales reactivos a la tuberculina. La incidencia, de tuberculosis humana causada por *M. bovis*, ha disminuido mediante la pasteurización de la leche (Grange *et al.*, 2001).

La tuberculosis es una infección bacteriana crónica causada por *Mycobacterium bovis* que histológicamente se caracteriza por la formación de granulomas. Puede afectar en cualquier edad y cualquier sexo. Habitualmente, la enfermedad se localiza en los pulmones, pero puede afectar prácticamente a cualquier órgano del cuerpo.

El *M. bovis* es una especie más primitiva que el *M. tuberculosis*, ya que tiene una sola copia del trasposoma *IS6110*, elemento muy antiguo para la diferenciación de estas dos especies (Campillo *et al.*, 2001).

## 4.2. Historia.

La tuberculosis como enfermedad ya era conocida en las primeras civilizaciones. De hecho, existen descripciones de ella en papiros e incluso se han encontrado lesiones nodulares típicas en momias del antiguo Egipto (Galey, 1998).

La primera referencia sobre la tuberculosis animal data del año 40, cuando Columela describe la tuberculosis pulmonar de los vacunos (Galey, 1998).

Durante los últimos siglos son frecuentes las descripciones de enfermedades animales que permiten reconocer la aparición frecuente de la tuberculosis, aunque hasta mediados del siglo pasado no se la relacionó con la tuberculosis del hombre (tisis), ni fue designada como tal (Galey, 1998).

El primer intento de asociar ambos procesos sucedió en 1797, cuando Klenke, un médico de Braunschweig, vinculó el consumo de leche de vaca y la aparición de las escrófulas (tuberculosis humana). Durante la primera mitad del siglo XIX se produjo un cambio en la concepción sobre la tuberculosis, gracias a Gurlt (1831), Hering (1849) y Fuchs (1859), quienes consideraron la tuberculosis pulmonar del ganado vacuno esencialmente igual a la tuberculosis pulmonar humana. Poco más tarde, en 1868, Villemin confirmó la tuberculosis como una enfermedad transmisible del hombre a los animales y viceversa, consiguiendo reproducir la enfermedad en conejos y cobayas por inoculación de material patógeno proveniente tanto de hombres como de animales. Así se demostró que la tuberculosis de los hombres y el mal perlado de los vacunos eran idénticos y estaban producidos por un agente infeccioso (Galey, 1998).

En 1882 Koch descubre el bacilo tuberculoso (*Mycobacterium tuberculosis*), demostrando así la etiología bacteriana de la enfermedad. Ya en 1889, tuvo lugar en Finlandia la primera campaña de erradicación de la tuberculosis bovina. Y en 1890 Koch desarrolla el medio de diagnóstico de la tuberculina, tras la fallida pretensión de utilizarla como vacuna (Galey, 1998).

El primer intento para evitar el contagio de la tuberculosis bovina a humanos (1899) se realizó cuando la Royal Commission on Tuberculosis consideró las lecherías, carnicerías y establos como zonas de riesgo potencial para la Salud Pública; prohibiéndose la venta de leche y carne proveniente de vacas infectadas (Galey, 1998).

El nombre específico de "*Bacterium tuberculosis*" fue propuesto por Zopf en 1883 y, en 1896, Lehman y Neumann asignaron las especies al género *Mycobacterium*. A partir de la observación de pequeñas diferencias entre los microorganismos aislados en humanos y en ganado, se distinguió entre *Mycobacterium tuberculosis hominis* y *Mycobacterium tuberculosis bovis*. Las cepas de *hominis* eran aquellas reconocidas como causantes de enfermedad pulmonar en el hombre, y las de *bovis* aquellas responsables de tuberculosis en el ganado, y que podían dar lugar a enfermedad extrapulmonar en el hombre, como consecuencia de la ingestión de leche de vacas infectadas. El primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar bovina se describió en 1909, y las investigaciones posteriores concluyeron que, entre el 1 y el 3% de los casos de tuberculosis pulmonar, eran causados por *Mycobacterium bovis*. El nombre fue oficialmente asignado en 1970 por Karlson y Lessel (Aymerich *et al.*, 2000).

### 4.3. COMPLEJO *MYCOBACTERIUM*

#### 4.3.1. Características generales.

La tuberculosis bovina (Tbb) es una enfermedad crónica de los animales provocada por una bacteria llamada *Mycobacterium bovis*, con estrecha relación con las bacterias causantes de las tuberculosis humana y aviar. Puede afectar a prácticamente todos los mamíferos, en los que provoca un deterioro del estado general de salud, muy a menudo tos y con el la muerte (IOE, 2007).

El nombre de “tuberculosis” proviene de los nódulos, llamados “tubérculos”, que se forman en los nódulos linfáticos del animal afectado (OIE, 2007).

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

*M. tuberculosis* causante de la tuberculosis humana, *M. bovis* tuberculosis bovina, el bacilo de Clamette ,variante de *M. bovis* usada como vacuna, *M. africanum* subtipo I y II tuberculosis humana en África y *M. microti* ,tuberculosis murina (Ruiz *et al.*, 1998).

Taxonómicamente al género *Mycobacterium*, único de la familia Micobacteriaceae, perteneciente al orden Actinomicetales. Las micobacterias, nombre común de la bacteria incluida en este género, has sido considerada tradicionalmente diferente al resto de las bacterias, debido a su estructura particular y composición química de la pared. Morfológicamente son bacilos o cocobacilos ligeramente curvados o rectos, no forman esporas, no presentan flagelos ni cápsula (OPS, 1985).

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

Todas estas especies se integran dentro del complejo de *M. tuberculosis*. Los miembros de este grupo son micobacterias altamente relacionadas, que exhiben gran homogeneidad en la secuencia de nucleótidos, a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y algunas características fisiológicas, tales como la morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a inhibidores (Caimi *et al.*, 2001).

El resto de las micobacterias han recibido como grupo diversas denominaciones, basándose en las características principales de las especies de este grupo son: no ser patógenas primarias en condiciones habituales; hallarse distribuidas por diversos ecosistemas, y en ocasiones ser capaces de que las personas desarrollen la enfermedad en momento de cierta inmunodeficiencia, comportándose entonces como micobacterias oportunistas (Ruíz *et al.*, 1998).

La secuencia genómica de *M. bovis* tiene más de un 99,95% de coincidencia con la de *M. tuberculosis*. La supresión de información genética ha dado lugar a un tamaño genómico más reducido. No se han hallado genes únicos de *M. bovis*, hecho que implica que es la diferente expresión génica lo que condiciona el tropismo del bacilo humano y el bovino (OIE, 2008).

El género *Mycobacterium* incluye parásitos obligados, saprófitos y patógenos oportunistas, pero el hábitat natural de las especies del complejo de *M. tuberculosis* es el tejido infectado de humanos y animales.

. *Mycobacterium bovis* causa tuberculosis en el ganado, los humanos y otros primates, así como en otros animales como perros, gatos, cerdos o papagayos (Prat *et al.*, 2007)

El bacilo de Clamette-Guérin, que es usado como vacuna antituberculosa en diferentes partes del mundo, tiene las mismas propiedades que *M. bovis*, pero con una virulencia más atenuada. *Mycobacterium africanum* es causa de tuberculosis humana en África tropical, y representa una forma intermedia entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, *M. microti* causa tuberculosis en roedores, y produce lesiones locales en cobayas y conejos. Sin embargo, cualquier miembro del complejo de *M. tuberculosis* puede producir infección en el hombre (Prat *et al.*, 2007).

## Cuadro 1. Especies de géneros de *Mycobacterium* .

### Especies del género *Mycobacterium*

<p><i>Micobacterias de crecimiento lento</i> Especies cuyo reservorio es un mamífero infectado</p> <p>Patógenas para el hombre</p> <p><i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i> <i>M. leprae</i> <i>M. tuberculosis</i></p> <p>Patógenas para otros animales</p> <p><i>M. lepraemurium</i> <i>M. microti</i> <i>M. paratuberculosis</i></p> <p>Especies cuyo reservorio principal es el medio ambiente</p> <p>Asociadas a enfermedades humanas</p> <p><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. malmoense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. shimoidi</i> <i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. triplex</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i></p> <p>Asociadas a enfermedades en animales</p> <p><i>M. farcinogenes</i></p> <p>Nunca o raramente asociadas a enfermedades humanas</p> <p><i>M. cooki</i> <i>M. gastri</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. hiberniae</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i></p>	<p><i>Micobacterias de crecimiento rápido</i> Especies cuyo reservorio es el medio ambiente</p> <p>Asociadas a enfermedades humanas</p> <p><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> <p>Asociadas a enfermedades en animales</p> <p><i>M. porcinum</i></p> <p>Nunca o raramente asociadas a enfermedades humanas</p> <p><i>M. agri</i> <i>M. aichiense</i> <i>M. alvei</i> <i>M. curum</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. duvalii</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. morioakaense</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></p>
--	--

Ruiz et al., 1998

#### 4.4. TUBERCULOSIS BOVINA.

##### 4.4.1. Definición.

Es una enfermedad del aparato respiratorio que se transmite en diversas especies de mamíferos principalmente por vía aérea (López, 1997).

La Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium. bovis*) es una enfermedad que afecta principalmente al ganado bovino, pero también puede afectar a otras especies de ganado doméstico y animales silvestres provoca cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería. Esta enfermedad constituye una zoonosis, es decir, existe la probabilidad de transmisión a seres humanos, provocando en ellos una infección clínica casi indistinguible a la causada por *M. tuberculosis* (Programa Nacional de Diagnostico y Saneamiento de Tuberculosis Bovina, 2004).

En México, la tuberculosis limita la ocasionando altas pérdidas económicas para los productores y el país (NOM-031-ZOO-96).

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

#### 4.4.2. Etiología.

Familia *Micobacteriaceae*

Género *Mycobacterium*.

Orden *Actinomycetales*

<i>Mycobacterium bovis</i>	Afecta al ganado bovino y el bisonte.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Afecta al hombre y los primates.
<i>Mycobacterium avium</i>	Afecta a las aves y los cerdos.

El género *Mycobacterium* incluye parásitos obligados, saprófitos y patógenos oportunistas, pero el hábitat natural de las especies del complejo de *M. tuberculosis* es el tejido infectado de humanos y otros animales mamíferos, *Mycobacterium bovis* causa tuberculosis en el ganado, los humanos y otros primates, así como en otros animales como perros, gatos, cerdos (Prat *et al.*, 2007).

Son microorganismos ácido alcohol resistentes, aeróbicos, no forman esporas y no son móviles. Ellos son derechos o ligeramente curvados, midiendo de 0.3 a 0.6µm de ancho y 1 a 4 µm de largo. El crecimiento en medios de cultivos es lento y requiere de 2 a 8 semanas para desarrollar colonias visibles. La tuberculosis bovina tienen como protagonista al *Mycobacterium bovis* parásito intracelular obligado, principal agente causal de la enfermedad en los mamíferos (Garbaccio, 2007).

Una de las principales características por las que destacan es la elevada cantidad de lípidos que presentan en su pared lo que les confiere un gran interés desde el punto de vista taxonómico (son BAAR bacilos ácido alcohol resistentes, epidemiológico, gran resistencia a la desecación y una elevada tasa de supervivencia en el medio ambiente y patológico capacidad de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos (Galey, 1998).

#### 4.4.3. Epidemiología

La tuberculosis es una enfermedad de distribución mundial, aunque su prevalencia ha descendido muchísimo en los países desarrollados en la segunda mitad de este siglo (Vizcaíno *et al.*, 1990).

En el ambiente ganadero los hospedadores naturales de *M. bovis* son los bovinos; actuando la cabra como hospedador secundario, e incluso primario en zonas semiáridas. Estas especies resultan así mismo las más propensas al desarrollo de la enfermedad. El resto de los mamíferos intervienen como hospedadores accidentales (Vizcaíno *et al.*, 1990).

El contagio entre ganado vacuno y cabras se ha puesto en entredicho al evidenciarse, mediante análisis genómicos, que las cepas aisladas en vacas son distintas a las aisladas en la cabra, incluso en rebaños muy próximos; lo que podría significar que estas cepas se han adaptado a este otro hospedador y tiene preferencia de transmisión intra-específica. En el medio natural los bovinos y los cérvidos son los principales hospedadores de dicha micobacteria (Vizcaíno *et al.*, 1990).

De manera suplementaria los jabalíes, en tropismo carroñero, y accidentalmente otros carnívoros (zorros, lince) llegan a adquirir la enfermedad (Vizcaíno *et al.*, 1990).

*Mycobacterium avium* (*ssp. avium*) se encuentra difundido en la naturaleza en hospedadores aviares, a partir de los cuales se infectan sobre todo carnívoros; resultando también frecuente la tuberculosis aviar en el jabalí. La eliminación de los bacilos tuberculosos se puede producir a partir de diferentes vías que dependen de la localización de las lesiones (Vizcaíno *et al.*, 1990).

La vía aerógena (por afección pulmonar) supone el principal mecanismo de eliminación del bacilo, pero destacan también la vía digestiva (por deglución del moco pulmonar o por lesiones intestinales, hepáticas), urinaria (en casos de lesiones en riñón) y lactogénica (de especial importancia para el hombre y las crías) es posible también la infección congénita (Vizcaíno *et al.*, 1990).

Una vez en el medio la bacteria no tiene demasiados problemas de supervivencia, ya que es extraordinariamente resistente y parece ser que tan sólo una incidencia directa de radiación solar durante tres días seguidos es capaz de acabar con ella a corto plazo. En condiciones de poca luminosidad y una alta humedad relativa puede sobrevivir durante más de treinta años. Entre los factores favorecedores del contagio se encuentran, además de la gran resistencia en el medio, el hacinamiento de animales, la convivencia de animales adultos con jóvenes mucho más sensibles a la enfermedad por su escasa inmunocompetencia y factores inmunodepresores mala alimentación, enfermedades, escasas condiciones higiénicas entre otros (Vizcaíno *et al.*, 1990).

#### 4.4.4. Fuentes de Infección y Modo de transmisión.

La vía de infección habitual es la inhalación de las microgotas infectadas que un animal enfermo ha expulsado al toser. Las terneras y el ser humano también pueden contagiarse al ingerir leche cruda procedente de vacas enfermas (OIE, 2007).

Dado que la enfermedad es de evolución lenta y pueden pasar meses o incluso años hasta que el animal infectado muere, un solo ejemplar puede transmitir la enfermedad a muchos otros componentes del rebaño antes de manifestar los primeros signos clínicos (OIE,2007).

De ahí que las principales vías de diseminación sean el desplazamiento de animales domésticos infectados asintomáticos y el contacto con animales salvajes infectados (OIE, 2007).

Hay muchas formas por las que el ganado puede infectarse con *Mycobacterium bovis* tomando encuentra también factores como la edad, ambiente y prevalencia en el hato (OIE, 2007).

La inhalación de *Mycobacterium bovis* es causa probable e importante vía de infección en bovinos (Pollock *et al.*, 2001), se adquiere por la inhalación de bacilos tuberculosos contenidos en pequeñas partículas aerógenas (1-5  $\mu$ m) capaces de alcanzar el alveolo (Hopew, 1988).

Del 80% al 90% de los casos la transmisión ocurre por vía aerógena; con la tos o espiración de un animal infectado se expelen gran cantidad de microgotas que contienen a la bacteria las cuales al ser inhaladas por otro bovino llegan al sistema respiratorio, dando comienzo a una nueva infección. Esto se ve favorecido por el contacto directo diario de los bovinos en el pastoreo, en comederos, en corrales y en las salas de ordeño (Tuberculosis bovina, 2000).

El reservorio principal de *M. bovis* es el bovino, que puede transmitir la infección a muchas especies de mamíferos, incluyendo al hombre, este adquiere la infección en primer término, por vía digestiva (leche y productos lácteos crudos) y en segundo término por vía aerógena (Garbaccio, 2007).

La infección del hombre por *M. avium* es rara, predominantemente ocupacional, y las vías de entrada pueden ser tanto la aerógena (polvo de gallineros) como la digestiva, leche de vacas infectadas por *M. avium* o ingestión de carne de ave insuficientemente cocida (Garbaccio, 2007).

La tuberculosis en los bovinos se transmite principalmente por vía aerógena: antes del destete es importante también la vía enterógena. La tuberculosis de los porcinos, caprinos y ovinos tiene como fuente principal de infección a los bovinos y aves, y a veces al hombre (Garbaccio, 2007).

Los cerdos se infectan por vía digestiva y se considera que rara vez pueden retransmitir la infección entre sus congéneres o a otras especies animales, incluyendo al hombre. Las cabras pueden ser fuente de infección para el bovino y para el hombre (Garbaccio, 2007).

Los perros contraen la infección principalmente del hombre y menos frecuentemente del bovino, y pueden a su vez retransmitirla al hombre y a los bovinos. La transmisión es aerógena y enterógena respectivamente. Los gatos tienen como fuente principal de infección a los bovinos y en menor grado al hombre. La vía de penetración es principalmente la oral. Ocasionalmente, pueden, a su vez, ser fuente de infección para el bovino y el hombre (Garbaccio, 2007).

Entre los animales silvestres en cautiverio, los monos son de especial interés por su susceptibilidad al *M. tuberculosis* y al *M. bovis*. Contraen la infección del hombre por vía aerógena y constituyen un riesgo para la salud humana (Garbaccio, 2007).

Las aves domésticas, que son el principal reservorio de *M. avium*, contraen la infección por vía digestiva y son fuente de infección para otras especies de aves y para los mamíferos (Garbaccio, 2007).

*M. bovis* sobrevive en el agua aproximadamente arriba de 400 días y puede entrar al tracto respiratorio durante el consumo de agua. La infección de *M. bovis* en el ganado puede ser transmitida por una diversidad de rutas, algunas de las cuales pueden ser controladas apropiadamente por los trabajadores, pero la existencia de una diversidad de hospederos intermediarios silvestres, es una de las razones que contribuyen a la infección del ganado (Phillips *et al.*, 2003).

La posibilidad de que la enfermedad se transmita depende de cuatro factores:

- Las características del enfermo
- El entorno en que tiene lugar la exposición
- La duración de la exposición
- La susceptibilidad del receptor

La capacidad de infectar de un enfermo determinado va a depender de la cantidad de bacilos que expulsa con sus secreciones respiratorias, estando ésta en relación directa con la frecuencia de la tos, la existencia de lesiones cavitadas y con las formas de diseminación broncógena. La tuberculosis laríngea es especialmente infectiva (Phillips *et al.*, 2003).

## Vías de transmisión de la Tuberculosis Bovina.

- La vía respiratoria. Es la principal vía de contagio (80 a 90% del contagio es por vía aerógena). Esto es debido al mugido que produce microgotas con 100 a 200 bacilos y estornudo o tos que pueden producir pequeñas microgotas con 1 o 2 bacilos (Phillips *et al.*, 2003).
- La vía digestiva. Del 10 al 20% de las veces es la vía de transmisión. La ingestión de *M. bovis* de animales infectados, pastura, agua o fómites es considerada como la segunda forma importante de transmisión así como el contagio por amamantar becerros con leche de vaca con mastitis tuberculosa. Además por la ingestión de leche no pasteurizada (Pollock *et al.*, 2001).

*M. bovis* es excretada en heces con poca reducción en el número de bacterias persistiendo en excreciones, tierra, y medio ambiente en tiempos largos de hasta 330 días (FSAI, 2003). La proporción de ganado infectado por *M. bovis* a partir de heces es típicamente 10%, pero puede ser tan alta hasta un 80% (Pollock *et al.*, 2001).

Existen otras vías de transmisión de menor importancia que la respiratoria y la digestiva, que hay que tener en cuenta (Phillips *et al.*, 2003).

- Congénita. La transmisión congénita de *M. bovis* ocurre por vía umbilical como una secuela de la infección uterina, cerca del 5% de las vacas tuberculosas presentan metritis tuberculosa, de las cuales 50% abortan.
- Ubre. Esta es posible por ingestión de leche tuberculosa con infección subclínica, del 1 al 2% de las vacas tuberculosas presentan mastitis tuberculosa, siendo diseminadoras persistentes (Phillips *et al.*, 2003).
- Genital. Los toros se enferman montando vacas con metritis tuberculosa. La transmisión más importante se produce con la inseminación artificial (Phillips *et al.*, 2003).
- Infección por heridas. De menor importancia, por ejemplo: Cortes de órganos de animales infectados, lesiones cutáneas, generalmente no son progresivas (Phillips *et al.*, 2003).

#### 4.4.5. Patogenia.

La tuberculosis pulmonar suele iniciarse en la unión bronquiolo alveolar y se extiende hacia el alveolo constituyendo en su comienzo una pequeña lesión sublobulillar, lobulillar o incluso, puede involucrar a más de un lobulillo. Estas lesiones primarias, únicas o múltiples, aparecen especialmente en zonas subpleurales de las porciones dorsocaudales en los lóbulos principales (Bornes *et al.*, 1993).

La tuberculosis es una enfermedad de origen bacteriano que produce una inflamación crónica en el tejido donde se asienta, ocasionando lesiones de tipo granulomatoso (Galey ,1998).

El mecanismo de acción patógena del bacilo se desarrolla, de la siguiente forma: penetra en el organismo y es fagocitado por los macrófagos, siendo capaz de sobrevivir en el interior de los mismos gracias a determinados componentes de su pared. Tanto su multiplicación como el desarrollo de las lesiones dependerán de la resistencia orgánica, expresada en gran medida por la activación de los macrófagos y la formación de células gigantes (epitelioides, Langhans), y de la virulencia del germen. La presencia de micobacterias en el interior de macrófagos en un órgano va a determinar la formación de granulomas específicos de tamaño microscópico (granuloma tuberculoso) o de mediano (tubérculo) o gran tamaño denominado nódulo (Galey ,1998).

Poco después acaba afectándose el nódulo linfático regional, a partir de la lesión inicial, y a este conjunto se denomina “complejo primario” (Galey ,1998).

Factores de manejo, edad y nutrición son determinantes en la vía de infección, así como en el período de incubación, proceso de la enfermedad y diseminación (Galey ,1998).

A partir de la puerta de entrada los bacilos se localizan en el complejo primario de los nódulos linfáticos regionales, luego se diseminan por vía linfática a la cadena nodular. Posteriormente la diseminación se da por vía hematológica a órganos parenquimatosos por último el microorganismo es eliminado en exudados y secreciones de órganos infectados (Galey, 1998).

Muchas especies de mamíferos y de aves son susceptibles a los agentes de la tuberculosis, la tuberculosis bovina es la más importante, tanto desde el punto de vista económico como de la salud pública (Garbaccio, 2007).

- Bovinos

El principal agente etiológico para los bovinos es *M. bovis*. Como en el hombre, el bacilo tuberculoso penetra en el organismo principalmente por vía aerógena. La tuberculosis por vía entérica es importante en terneros que se amamantan con leche que contiene bacilos tuberculosos. La forma clínica y patológica más común es la tuberculosis pulmonar. El agente causal, al penetrar en los pulmones y multiplicarse, forma el foco primario que va acompañado de una lesión tuberculosa de los nódulos bronquiales del mismo lado, creándose de esta manera el complejo primario. Estas lesiones pueden quedar latentes o progresar, de acuerdo con la relación del binomio agente infeccioso - huésped (Garbaccio, 2007).

Si se rompen la resistencia del animal frente al bacilo tuberculoso, la infección puede entonces difundirse a otros órganos por vía linfática, sanguínea o por los conductos naturales, dando lugar a una generalización temprana (Garbaccio, 2007).

Si el aparato inmunocompetente es incapaz de destruir los bacilos, estos formarán tubérculos en los lugares donde se detienen (Garbaccio, 2007).

Los focos nuevos se producen sobre todo en los pulmones, riñones, hígado, bazo y en sus nódulos correspondientes (Garbaccio, 2007).

La generalización también puede darse tiempo más tarde de la colonización por parte del agente y asociadas con disminución de las defensas por diversos factores (estrés, enfermedad concomitante), dando lugar a lo que se conoce como generalización tardía (Garbaccio, 2007).

La mayoría de las veces, la tuberculosis tiene un curso crónico y limitado a un solo órgano: el pulmón. El proceso es lento y puede ser clínicamente inaparente por largo tiempo, incluso cierto número de animales pueden pasar toda su vida útil sin sintomatología evidente, pero constituyendo una amenaza potencial para el resto del rebaño (Garbaccio, 2007).

Otros animales desarrollan una bronconeumonía crónica, con tos y disminución de la capacidad productora (Garbaccio, 2007).

En casos avanzados, donde gran parte de los pulmones están afectados, comienza a evidenciarse un compromiso respiratorio una disnea pronunciada (Garbaccio, 2007).

Otra forma que se observa con cierta frecuencia en rebaños infectados, en países donde no hay control de la enfermedad, es la tuberculosis perlácea, o sea la peritonitis o pleuresía tuberculosa (Garbaccio, 2007).

Se estima que aproximadamente el 5% de las vacas tuberculosas, especialmente en casos avanzados, tienen lesiones del útero o metritis tuberculosas y que el 1-2% tienen una mastitis tuberculosa. Esta forma clínica tiene importancia no solo desde el punto de vista de la salud pública sino también como fuente de infección para los terneros que se amamantan con la leche en forma natural o artificial (Garbaccio, 2007).

En la tuberculosis adquirida por vía oral, uno de los signos principales es la tumefacción de los nódulos retrofaríngeos. En los terneros la lesión primaria generalmente se asienta en los nódulos mesentéricos, sin que la mucosa intestinal esté afectada. La enfermedad es más frecuente a medida que avanza la edad del animal, debido al carácter crónico de la misma y al hecho de que con el transcurso del tiempo los animales tienen más oportunidad de ser expuestos a la infección (Garbaccio, 2007).

La prevalencia de la infección es más alta en las vacas lecheras que en los animales de carne, porque su vida económicamente útil es más prolongada, por estar en más contacto unas con otras al reunírseles para el ordeño, o por la semiestabulación existente ( Garbaccio,2007).

En el ganado bovino adulto, la infección tuberculosa primaria es pulmonar en el 90% de los casos (Dungworth, 1993). Esta causada por la inhalación de pequeñas gotas procedentes de la respiración de un animal enfermo e infectadas con micobacterias tuberculosas; estas pequeñas partículas reciben el nombre de gotas de Flugge (Dannenberg *et al.*, 1988).

Debido a su escaso tamaño (1 a 5  $\mu\text{m}$ ) y a su especiales características físicas, pueden alcanzar las zonas mas profundas del aparato respiratorio (regiones inferiores y medias de ambos pulmones). Estas zonas están mejor ventiladas, y por lo tanto, están más expuestas a la llegada de partículas infecciosas (Dannenberg *et al.*, 1988).

Cuando un animal no sensibilizado previamente, inhala bacilos tuberculosos, las barreras mecánicas de las vías respiratorias altas y el sistema mucociliar de la mucosa bronquial elimina las partículas grandes (Dunlop *et al.*, 1993) y solo las que tienen un diámetro menor o igual a 5  $\mu\text{m}$  alcanzan el alveolo, donde los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares (Bornes *et al.*, 1993).

La posibilidad de desarrollar enfermedad pulmonar a partir de esta infección inicial dependerá principalmente de la virulencia de la bacteria y de la capacidad bactericida inherente al macrófago alveolar que lo fagocita (Bornes *et al.*, 1993).

- Porcinos

Esta especie es susceptible a los tres agentes clásicos de la tuberculosis: *M. bovis*, *avium*, y en un posible tercer lugar *M. tuberculosis*. *M. bovis* es el más patógeno e invasor para los cerdos, siendo responsable de la mayor parte de las tuberculosis generalizadas (Garbaccio, 2007).

La vía principal de infección es la digestiva, por ingestión de leche o productos lácteos contaminados, residuos de cocina y mataderos, excreta de aves y bovinos tuberculosos (Garbaccio, 2007).

El complejo primario se encuentra en la orofaringe y en los nódulos submaxilares, o en el intestino y en los nódulos mesentéricos (Garbaccio, 2007).

La mayoría de las veces, las lesiones están confinadas al complejo primario. No se encuentran lesiones de tuberculosis crónica en órganos aislados, como es común en el bovino. La prevalencia es menor en animales jóvenes que en adultos, pero los primeros tienen mayor tendencia a la generalización del proceso. Los programas de erradicación de la tuberculosis bovina tienen una influencia directa en la reducción de la tasa de la infección en cerdos (Garbaccio, 2007).

- Ovinos y Caprinos

La tuberculosis es sumamente rara en los ovinos. De los pocos casos comprobados, unos se debieron a *M. bovis* y otros a *M. avium*. La prevalencia en los caprinos parece ser baja. En los países que han avanzado en la erradicación de la tuberculosis bovina se presta atención a la infección en los caprinos, ya que esta especie es susceptible a *M. bovis* y sufre con cierta frecuencia de tuberculosis pulmonar, pudiendo reinfectar a los bovinos. Las cabras también desarrollan mastitis tuberculosa y su leche puede constituir un peligro para el consumidor. Los caprinos son susceptibles también a *M. avium* y a *M. tuberculosis*, ocurriendo a veces procesos generalizados por este último agente. Poco se sabe de la ocurrencia de la enfermedad en los caprinos de América Latina, ya que estos animales son generalmente sacrificados en forma domiciliaria (Garbaccio, 2007).

- Equinos´

La tuberculosis es poco frecuente en los caballos. En los países que tienen alta tasa de infección bovina, el agente principal de la enfermedad en los equinos es *M. bovis*. La vía de infección es predominantemente la digestiva. Las lesiones por lo general están limitadas a los nódulos del aparato digestivo y producen una reacción tisular, semejándose a los tumores (Garbaccio, 2007).

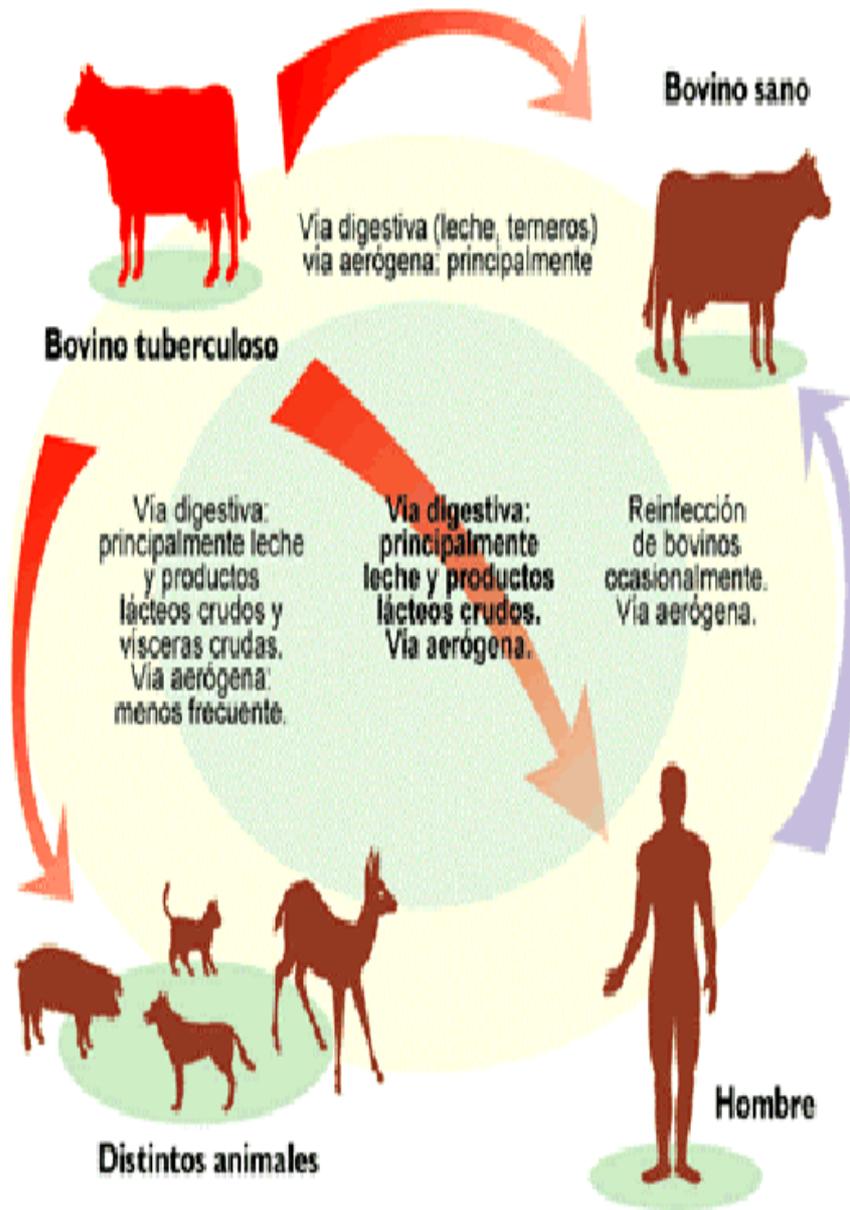
Se han descrito algunos casos de generalización de la infección tanto por *M. bovis* como por *M. avium*. En las infecciones por *M. avium* muchas veces no se encuentran lesiones. *M. tuberculosis* raramente se aísla del caballo (Garbaccio, 2007).

- Perros y Gatos

Los perros son muy resistentes a la tuberculosis experimental. Los casos que se registran en esta especie se deben probablemente a una exposición masiva y repetida al cohabitar con pacientes humanos o al consumir repetidas veces productos contaminados. La infección puede producirse por vía aerógena o por ingestión de esputos, leche y vísceras. Aproximadamente el 75% de los casos se deben al bacilo humano y el resto al bovino (Garbaccio, 2007).

La infección se localiza sobre todo en los pulmones o nódulos mesentéricos y a veces se encuentran también úlceras intestinales y lesiones renales. Por consiguiente, el perro puede eliminar bacilos tuberculosos por la tos, saliva, heces y orina (Garbaccio, 2007).

Figura 1. Patogenia de la tuberculosis bovina.



Garbaccio, 2007

#### 4.4.6. Signos clínicos de tuberculosis bovina (TBB)

En el período inicial de la enfermedad, no se observan signos clínicos. En los casos avanzados puede haber pérdida de peso gradual, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos y tos (Cano *et al.*, 2007).

La TBB suele presentar una evolución dilatada en tiempo, pues los síntomas pueden tardar meses o años en aparecer (OIE, 2007)

Los signos clínicos habituales son los siguientes:

- Debilidad
- Pérdida de apetito
- Pérdida de peso
- Fiebre fluctuante
- Tos seca intermitente
- Diarrea
- Nódulos linfáticos grandes y prominentes.

Sin embargo, a veces, la bacteria permanece en estado latente en el organismo hospedador sin desencadenar la enfermedad (OIE, 2007).

Signos presentes en las diferentes formas de tuberculosis.

- Tuberculosis respiratoria: Tos espontánea crónica, estertores, ronquido por presión de la faringe al aumentarse el linfonodo retrofaríngeo, timpanismo por aumento de linfonodos mediastínicos los cuales ejercen presión sobre el esófago y el nervio vago, provocando una indigestión vagal, la cual consiste en la estenosis funcional anterior entre retículo y omaso, con atonía ruminal y reticular (Cano *et al.*, 2007).
- Tuberculosis digestiva: Constipación alternada con diarrea, timpanismo ruminal y peritonitis granulomatosa como consecuencia de la tuberculosis miliar (Cano *et al.*, 2007).
- Tuberculosis neural: Ocasiona trastornos locomotores (Cano *et al.*, 2007).
- Tuberculosis genitourinaria: Disminuye las funciones propias así como la fertilidad, metritis con la subsecuente dificultad en la concepción o abortos en el tercer tercio de la gestación, presencia de mortinatos, vaginitis crónica con secreción purulenta y salpingitis; orquitis indolora y semen contaminado (Cano *et al.*, 2007).

Otras formas: Tuberculosis ósea, medular y cutánea (Cano *et al.*, 2007).

- Tuberculosis avanzada: 5% de los casos metritis tuberculosa, 2% de los casos mastitis tuberculosa, caracterizada por incrementar el tamaño de linfonodos retromamarios con induración e hipertrofia de la glándula, acompañada con la secreción líquida color ámbar con folículos, lo cual se observa generalmente al final del ordeño, sin embargo el bacilo causante de la tuberculosis puede eliminarse en la leche aun en ausencia de mastitis (Cano *et al.*, 2007).
- Tuberculosis miliar: Presente con diseminación general de la enfermedad, acompañada por gran cantidad de pequeños tubérculos, siendo la vía de entrada del agente la digestiva (Cano *et al.*, 2007).

#### 4.4.7. Lesiones

Las lesiones son más frecuentes en pulmones, nódulos bronquiales, mediastínicos y retrofaríngeos. Las lesiones iniciales son pequeños granulomas caseosos y calcificados. A medida que la enfermedad avanza se pueden observar numerosas lesiones duras, de color gris-amarillento y de diferentes tamaños (Cano *et al.*, 2007).

Las lesiones iniciales pueden evolucionar de distinta forma, según el estado de salud del animal infectado. En animales inmunocompetentes hacia la regresión y curación microbiológica, o hacia un estado de latencia. Por otro lado, bajo situaciones de baja competencia inmunológica, pueden ocurrir una lenta progresión en el órgano infectado (tuberculosis crónica de órganos) o la diseminación por vía hemolinfática y canalicular a otros órganos. En caso de alta sensibilidad por debilidad orgánica significa la generalización, precoz o tardía, de la tuberculosis; que concluye con la muerte rápida del animal (Cano *et al.*, 2007).

Mientras que las restantes formas patogénicas de tuberculosis causan una enfermedad crónica. Los carnívoros, cuando se infectan debido a la ingestión de una presa o de un cadáver con extensas lesiones tuberculosas, adquieren alta dosis infectiva, que resulta frecuente la instauración de las formas agudas de generalización, y consecuentemente la muerte (Galey, 1998).

En el ganado adulto, la tuberculosis se presenta en forma común como una enfermedad de tipo respiratorio, por consiguiente, las lesiones son frecuentemente encontradas en los pulmones y los nódulos linfáticos del tracto respiratorio, nódulos linfáticos de la cabeza, cuello y tórax (Galey, 1998).

Cuando la vía primaria de la infección es a través de la alimentación, las lesiones tuberculosas pueden estar presentes en los nódulos linfáticos de la cabeza y el cuello, así como en los nódulos linfáticos mesentéricos y el hígado, riñón, encéfalo, meninges y médula espinal, ocasionando trastornos del sistema nervioso central y convulsiones (Galey, 1998).

En general las lesiones en animales sacrificados, son en forma de tubérculos o focos mayores llenos de pus en casi todos los órganos y partes corporales de acuerdo al grado de generalización, la pleura o peritoneo en su totalidad (Galey, 1998).

Los tubérculos ocasionalmente penetran las membranas serosas, lo cual permite el acceso de los microorganismos a las cavidades corporales este proceso provoca el desarrollo de una pleuritis granulomatosa o peritonitis enfermedad perlada (Galey, 1998).

Las lesiones son muy variables y son de acuerdo a la cronicidad de la enfermedad; al principio son focos de color amarillento, con discreta necrosis caseosa que lentamente se va caseificando, al avanzar estas lesiones se encapsulan y se calcifican (Jae - Hoon *et al.*, 2002).

Durante el curso de la enfermedad el crecimiento de los tubérculos a veces erosionan los vasos sanguíneos contiguos y cuando el bacilo tuberculoso es liberado en la corriente sanguínea pueden desarrollarse lesiones metastásicas en cualquier parte del cuerpo (Jae-Hoon *et al.*, 2002).

- Lesiones Macroscópicas

Las lesiones pueden variar dependiendo de la localización anatómica y la forma de diseminación.

- a. Generalmente el hallazgo pulmonar es áreas de tamaño considerable con apariencia caseificada y zonas de mineralización.
- b. En las superficies serosas incluyendo las cápsulas de los órganos se observan nódulos firmes de superficie lisa, varían de 2 a 10 centímetros de diámetro. También pueden presentarse zonas caseificadas en las áreas profundas (tuberculosis perlada).
- c. Nódulos firmes de aspecto granulomatosa con áreas de calcificación y caseificación en nódulos linfáticos y órganos parenquimatosos como el hígado y el riñón.
- d. Exudado de apariencia purulenta en meninges focos muy pequeños menores de 1cm de diámetro en cualquier órgano (Tuberculosis miliar) (Jae-Hoon *et al.*, 2002).

- Lesiones Microscópicas

En cualquiera de las formas en que se presenta la tuberculosis, esta se caracteriza por la formación de granulomas. Se pueden detectar bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) libres en el citoplasma de los macrófagos, histiocitos y células gigantes de la lesión granulomatosa (Jae-Hoon *et al.*, 2002).

**Cuadro 2. Características de la infección por *M. bovis* y la inmunopatología asociada en diferentes especies animales.**

Especies	Localización de lesiones tuberculosas.		Curso de la enfermedad	Inmunopatología <sup>a</sup>		
	Primaria	Secundaria		Necrosis con infiltración de neutrófilos	Mineralización y encapsulación fibrosa	Presencia de bacilos ácido alcohol resistentes
Humanos	Pulmones, nódulos linfáticos, mesentéricos y cervicales	Genitourinaria, meningitis crónica de uniones y hueso	Crónica	+	++	+
Ganado	Pulmones y nódulos linfáticos de la cabeza	Nódulos torácico y otros nódulos, glándula Mamaria	Crónica	+	++	+
Zarigüeya y tejón	Pulmones	Nódulo linfático superficial, hígado, bazo y riñones	Crónica-Aguda	+++	±	+++

± Raramente encontrada; + baja; ++ media y +++ alta frecuencia de ser encontrada en una lesión.

Wedlock *et al.*, 2002

#### 4.4.8. Pérdidas económicas al productor y reducción de la eficiencia productiva por TBB.

La Tuberculosis bovina es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, no solo porque representa un riesgo para la salud pública, si no que además se traduce en grandes pérdidas económicas directas e indirectas, y también constituye uno de los principales obstáculos para la movilización y comercialización nacional e internacional de ganado (Huitrón,2001).

Las autoridades norteamericanas, no permiten la entrada de de animales reactivos a *su* territorio; por lo que la exportación de ganado bovino a los Estados Unidos de América, puede verse afectada por la presencia de esta enfermedad, representando una pérdida de de divisas de 450 millones de dólares anuales (Huitrón, 2001).

Las pérdidas directas en la producción de carne y leche se deben a la disminución del desarrollo de los animales y a los efectos sobre la producción que causa la enfermedad y que consisten en:

- Retención de canales en el rastro
- Pérdidas económicas debido al decomiso parcial o total
- Pérdidas de la producción láctea (calculados en un 17%)
- Pérdidas en la producción de terneras (calculados en un 15%)
- Desechos prematuros
- Se disminuye la fertilidad hasta un 6%
- Las vacas en ordeño disminuyen la producción láctea en un 10% a 17% del total de la producción lechera
- La duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia. El promedio de 270 días en la Primera lactancia se reduce a la mitad en la séptima lactancia (131 días).

- Se produce un lento aumento del peso del animal o disminución gradual del mismo (caquexia). Se pierde en promedio el 15% del peso normal
- 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
- La esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre el 5 al 10%
- Disminución en la producción de carne en bovinos
- Pérdida de parición de terneros en hembras tuberculosas (Kantor *et al.*, 2008).

Las pérdidas indirectas, tales como costos sanitarios por manejo adicional, pérdida de mercado potencial y problemas socioeconómicos por incrementos en los costos de producción (Huitrón, 2001).

La erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino da lugar a la reducción de pérdidas en la producción, disminuyendo el riesgo de transmisión de la enfermedad a humanos, así como las ventajas que representa el estar libre de esta enfermedad para el ganado en exportación (Manual de Brucelosis del Comité de la Campaña de la Tuberculosis bovina y Brucelosis de la Región Lagunera, 2007).

#### 4.4.9. Prevención y Control de la Enfermedad.

El método habitual para controlar la Tbb consiste en una prueba individual de detección seguida del sacrificio de los animales infectados. También han resultado muy útiles para contener o eliminar la enfermedad los programas de erradicación consistentes en examen post-mortem de la carne, medidas intensivas de vigilancia (comprende la inspección de explotaciones), realización sistemática de pruebas individuales en los bovinos y eliminación de los animales infectados o que hayan estado en contacto con la infección, así como el control de los desplazamientos de los animales (OIE, 2007).

En los exámenes post-mortem se buscan tubérculos en los pulmones y nódulos linfáticos (OIE, 2007).

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 (Delgado *et al.*, 1999).

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. La constante revisión de la campaña para el control y erradicación de la tuberculosis bovina en ganado para exportación, realizada por los compradores extranjeros, ha permitido tener flujo de animales de zonas con buenas medidas de seguridad que incluyen, la tuberculinización por intradermorreacción, eliminación animales reactores positivos a la prueba, toma de muestras en rastros tipo TIF, envío de muestras a los laboratorios de prueba y diagnóstico histopatológico y microbiológico por parte de los mismos. En caso de no llevarse a cabo estas actividades, y al presentarse casos positivos de tuberculosis bovina en ganado mexicano exportado, se dispondría el cierre de la frontera a estos animales, disminuyendo el ingreso de capital a nuestro país por este concepto (Delgado *et al.*, 1999).

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 (Delgado *et al.*, 1999).

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. La prueba a realizarse es la prueba simple intradérmica en el pliegue ano caudal, inyectando 0.1 ml. de la tuberculina PPD bovina (Delgado *et al.*, 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 (Delgado *et al.*, 1999).

En la mayoría de los casos no es posible aclarar epidemiológicamente el origen del foco, pudiendo tratarse de una desinfección 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 (Delgado *et al.*, 1999).

Para aclarar este origen es importante utilizar técnicas de biología molecular que permitan conocer la heterogeneidad genética de las cepas por regiones geográficas ganaderas y de esta forma poder identificarlas, para establecer medidas que limiten su diseminación. La Biología molecular de las infecciones por *M. bovis* en los animales y el hombre está siendo usada como una nueva herramienta para examinar la transmisión de la tuberculosis bovina (Delgado *et al.*, 1999).

La detección de los animales infectados impide que su carne penetre en la cadena alimentaria y pone a los servicios veterinarios tras la pista de su rebaño de origen, que es sometido a pruebas y en caso necesario, eliminado.

La pasteurización de la leche de animales infectados hasta una temperatura de 62 °C por 30 min suficiente para matar a las bacterias ha impedido que la enfermedad se propague en poblaciones humanas (OIE, 2007).

Rara vez se intenta administrar un tratamiento a los animales infectados, porque resulta muy caro y prolongado, y porque el gran objetivo último se cifra en erradicar la enfermedad (OIE, 2007).

En medicina humana se practica la vacunación, que sin embargo en los animales no se aplica a gran escala como medida preventiva: las vacunas animales existentes presentan una eficacia variable e interfieren con la realización de pruebas destinadas a erradicar la enfermedad. Actualmente se están ensayando una serie de nuevas vacunas experimentales (OIE, 2007).

#### 4.5. Diagnóstico de Tuberculosis bovina.

El diagnóstico específico de cualquier proceso de naturaleza infecciosa estriba en la identificación del agente infeccioso; tradicionalmente por medio de su aislamiento y posterior caracterización microbiológica, si bien otros procedimientos (inmunoconjugación directa usando anticuerpos marcados con fluoresceína o con peroxidasa, PCR) pueden obviar el estudio microbiológico.

Esto también es aplicable al diagnóstico confirmativo de la tuberculosis; pero deben utilizarse antiseros monoespecíficos de la micobacteria (por ejemplo la proteína MPB70 de *Mycobacterium bovis*), pues entre las distintas micobacterias, patógenas o no, e incluso otros géneros bacterianos (*Actynomices*, *Nocardia*) ocurren reacciones cruzadas (Galey, 1998).

El diagnóstico de la tuberculosis en hatos primo-infectados se hace por la caracterización macro y microscópica de las lesiones en animales muertos en la finca o remitidos al matadero, seguido del aislamiento y tipificación en el laboratorio (Aagaard *et al.*, 2003).

En las áreas endémicas el diagnóstico se hace antes de que muera el animal por dermoreacción, además debe hacerse vigilancia en los mataderos y hacer evaluación macro y microscópica de las lesiones compatibles con tuberculosis (Aagaard *et al.*, 2003).

Las muestras a partir de las cuales se va a procurar el aislamiento variarán en función de la accesibilidad que se tenga al animal y por supuesto del asentamiento (forma anatomoclínica) orgánico de la infección (Aagaard *et al.*, 2003).

En los animales vivos el diagnóstico directo suele resultar infructuoso pues en la mayoría de los casos la tuberculosis cursa con lesiones granulomatosas encapsuladas no abiertas al exterior; únicamente cuando la evolución es más grave, en fase de generalización de la infección, o si predominan las lesiones exudativas y los órganos afectados tienen conexión directa con el exterior (pulmón, intestino, riñón), resulta factible detectar las micobacterias en sus secreciones respiratorias, heces, orina (Galey, 1998).

Más difícil es el diagnóstico directo en las infecciones subclínicas en los animales vivos, ya que no suelen comportarse como excretores de micobacterias o lo hacen accidentalmente y en muy bajas concentraciones de bacterias. En los cadáveres sospechosos de tuberculosis resulta fácil seleccionar la muestra orgánica debido al carácter típico de las lesiones. No obstante, en individuos muertos sin alteraciones macroscópicas de tuberculosis, pero presuntamente infectados (tejonos en zonas endémicas) conviene analizar por métodos inmunohistológicos seriados y por PCR los órganos donde el asentamiento de las micobacterias es más frecuente en pulmón, hígado, riñón, bazo, nódulos mediastínicos y mesentéricos (Galey, 1998).

En campo podemos usar las pruebas de dermoreacción:

- Prueba Tuberculínica Ano-Caudal
- Prueba Tuberculínica Cervical Simple
- Prueba Tuberculínica doble comparativa

#### 4.5.1. Prueba Tuberculínica Ano-Caudal

El diagnóstico de la tuberculosis bovina se basa en la prueba intradérmica de la tuberculina (PPD) y permite descubrir el 96- 98% de los animales infectados (Blaha, 1995). Esta prueba ha sido la base de todos los esquemas de erradicación de la tuberculosis que incluyen la detección y el posterior sacrificio de los animales infectados (Tizard, 2002). Existen varias maneras de realizar la prueba de la tuberculina en el ganado bovino, siendo la más simple la prueba intradérmica única (PIU). En esta prueba se inyecta 0.1 ml de PPD bovina de un miligramo por mililitro en el pliegue caudal y se examina el sitio de inyección 72 horas más tarde. Una reacción positiva consiste en una tumefacción difusa, caliente e indurada en el sitio de la inyección, la cual es fácil de identificar (Tizard, 2002).

Positivo: 5mm o mayor

Sospechoso: 3mm/ mas o menos de 5mm

Negativo: menos de 3mm

Hay que tener en cuenta que todo animal sospechoso en un establecimiento donde se hayan detectado animales reaccionantes positivos en pruebas anteriores o en la que se esta realizando se le debe considerar positivo (Baron, 2008).

#### 4.5.2. Prueba Tuberculinica Cervical Simple

Esta prueba se empleará para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis*; o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis* (NOM-031-ZOO-1995).

En esta prueba el lugar de inoculación es el tercio medio del cuello. Esta zona se debe depilar con maquina o tijera a 5 cm. de diámetro aproximadamente. Se mide con un calibre el espesor de la piel previamente y se inyectan 0.1 ml de tuberculina PPD bovina de un miligramo por mililitro. La lectura se hace mediante un calibre a las 72 horas. Cuando la lectura se ve impedida por razones climáticas u otras causas, esta puede hacerse hasta 24 horas mas tarde. Si la lectura se realiza mas tarde de esto la prueba no tiene validez por lo que el diagnostico no será confiable y debe repetirse la prueba a los 60 días (Baron ,2008).

Positivo: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación, 3mm o mayor (NOM-031-ZOO-1995)

Negativo: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación. Menos de 3mm (NOM-031-ZOO-1995).

#### 4.5.3. Prueba tuberculinica doble comparativa

Se aplican tanto PPD bovino como PPD aviar, midiendo previamente el grosor de la piel con un vernier o cutímetro antes y después de la aplicación en dos diferentes puntos. La finalidad de esta prueba es diferenciar la reacción inflamatoria con *M. bovis* y *M. avium* (Cano, 2007).

Este tipo de sensibilización puede ser atribuido a la gran reactividad antigénica cruzada existente entre las especies de micobacterias y otros géneros afines (Cano, 2007).

Esta prueba consiste en la inyección de tuberculina bovina y tuberculina aviar en diferentes puntos del cuello la inoculación se realizará en el tercio medio superior de la tabla del cuello, por lo que previo a la inoculación deberá rasurarse dos áreas de alrededor de 1cm<sup>2</sup> y se aplicará 0.1 ml de PPD aviar y 1cm por debajo 0.1 ml de PPD bovino, la distancia entre las dos inyecciones debe ser de aproximadamente 12 a 15 cm. La segunda lectura se realizará a las 72 hrs y la interpretación se realizará restando la lectura final a la inicial, comparando el resultado con una tabla de interpretación como la que se muestra a continuación (Baron, 2008).

En todas las inyecciones se realiza introduciendo la aguja oblicuamente en las capas profundas de la piel e inyectando la dosis de tuberculina. Después se comprueba que la inyección ha sido bien realizada detectándose al tacto una pequeña inflamación en el lugar de la misma (Baron, 2008).

Las tuberculinas autorizadas para efectos de Campaña son:

a) PPD bovino: elaborado con Mycobacterium bovis cepa AN5, que se utilizará en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple.

b) PPD aviar: elaborado con Mycobacterium avium cepa D4, que será utilizada en la prueba cervical comparativa.

La tuberculina de PPD aviar debe contener como colorante el rojo de Ponceau, para distinguirla de la de PPD bovino que no lleva colorante.

c) Las tuberculinas deben ser transportadas y conservadas en frío a una temperatura de 4 a 8°C y protegidas de la luz solar directa durante el trabajo de campo, debe verificarse el lote y fecha de caducidad del producto. Una vez utilizado el antígeno, deberá desecharse el resto del contenido del envase si no se va a utilizar el mismo día (NOM-031-ZOO-1996).

El instrumental necesario para la realización de la tuberculinización se ajustará a las siguientes especificaciones:

a) Se utilizarán jeringas graduadas de 1 ml con graduación de 0.1 ml, de preferencia desechables, automáticas o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado.

b) Las agujas serán hipodérmicas, calibre 24 a 26 de 0.5 a 1.0 cm de largo, de preferencia desechables o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado.

c) Para la prueba cervical comparativa se usará un cutímetro metálico o de plástico como el vernier o pie de rey, graduado en mm (NOM-031-ZOO-1996).

#### 4.5.4. Diagnóstico bacteriológico.

a) Examen directo: Mediante la tinción de Ziehl Neelsen o de nueva fucsina para microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo (NOM-031-ZOO-1995).

Puede utilizarse la microscopia de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante.

b) Examen indirecto: Cultivo, aislamiento e identificación del Mycobacterium, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con y sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petraghani, ATS y Lowenstein Jensen (NOM-031-ZOO-1995).

#### 4.5.5. Forma de envío de muestras para el aislamiento bacteriológico.

Es necesario sumergir los tejidos en solución saturada de borato de sodio, si se trata de nódulos aparentemente afectados se deberán enviar completos sin grasa; si se trata de otro tejido, se deberá seleccionar la posible lesión y enviar muestras no mayores de 2 cm por lado.

El tiempo máximo en que debe permanecer el tejido en la solución de borato de sodio es de 10 semanas, si el tiempo es mayor la muestra se deshidrata (NOM-031-ZOO-95).

#### 4.5.6 Diagnóstico histopatológico.

Se realiza en muestras de aproximadamente 2 cm por lado con lesiones sugestivas a tuberculosis fijadas con formol al 10% amortiguado con fosfatos en una relación de 1:10, es decir una parte de tejido por nueve partes de formol. Se realiza la técnica de rutina de inclusión en parafina, y las tinciones de Hematoxilina-Eosina (HE), Ziehl Neelsen (ZN).

Por medio del análisis histopatológico, las preparaciones de tejidos, teñidos con HE 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 ó células gigantes tipo Langhans (NOM-031-ZOO-96).

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 *et al.*, 1999).

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

#### 4.5.7 Forma de envío de muestras para estudio histopatológico.

Las muestras con lesiones sugestivas a tuberculosis deberán fijarse con formol amortiguado al 10%, el tamaño de las mismas deberá ser de aproximadamente de 2 cm por lado y en una proporción de una parte de tejido y nueve de formol (NOM-031-ZOO-95).

#### 4.5.8. Diagnóstico microbiológico.

Las micobacterias son bacilos aerobios, inmóviles y no formadores de esporas, con un alto contenido de lípidos de alto peso molecular en su pared. *M. bovis* crece más lentamente que *M. tuberculosis*, es microaerófilo y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. La morfología colonial de *M. bovis* es disgónica y no cromógena (Prat *et al.*, 2007).

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 (DOF, 1996).

El examen indirecto consiste en cultivo, aislamiento e identificación de material sospechoso en medios especiales (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<sup>4</sup> bacterias (Zanden *et al.*, 1998).

Tradicionalmente, los medios de cultivos a partir de huevo han sido usados para el aislamiento primario de *micobacterias*. El diagnóstico de una infección por *micobacterias* depende principalmente de la detección y recuperación de los bacilos alcohol ácido resistentes (Zanden *et al.*, 1998).

El cultivo constituye el diagnóstico en casos de formas incipientes de tuberculosis y de tuberculosis extrapulmonar (genitourinaria, pericárdica, osteoarticular, gastrointestinal, peritoneal). Actualmente se conocen diferentes medios de cultivo, como Herrolds con o sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen (DOF, 1996), que permiten el aislamiento y recuperación de las micobacterias. Estos medios pueden ser líquidos o sólidos, no selectivos y selectivos; estos últimos pueden contener uno o más agentes antimicrobianos, que permiten inhibir el crecimiento tanto de bacterias como de hongos (Hernández *et al.*,2002).

El procedimiento consiste en tomar de pulmón u otro órgano con lesiones para el aislamiento micobacterial colocando 10 gr de tejido macerado en 5 ml de solución estéril homogenizada, luego se agrega un volumen igual de hidróxido de sodio (NaOH) al 2% y luego se deja 10 min a temperatura ambiente. La muestra se diluye 10 veces en fosfato salino bufferado (pH 7.3) y se centrifuga a 3,000 rpm por 30 minutos este proceso se repite dos veces con agua destilada y al final el sobre nadante se inocula en el medio de cultivo sólido (Little *et al.*, 1982).

El medio de cultivo es incubado a 37 °C por 10 semanas y revisado cada 2 semanas para observar el crecimiento micobacterial. Las muestras de pulmón y nódulos linfáticos con presencia de crecimiento para diferenciar son teñidos con tinción Gram y PAS (ácido periódico de schiff) (Little *et al.*, 1982).

#### 4.6. Diagnóstico molecular

La epidemiología molecular basada en el ADN ha hecho posible el aislamiento específico de *M. bovis* como responsable de los brotes de la enfermedad. El desarrollo de técnicas de manipulación genética de micobacteria ha acelerado la búsqueda de los genes virulentos de *M. bovis* y la secuencia de su genoma (Feizabadi *et al.*, 1996).

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 ADN con especificidad de especie. Recientemente, una prueba de fluorescencia en hibridación in situ la cual usa péptidos de ácidos nucleicos para la identificación de la bacteria de cultivos (Hongmanee *et al.*, 2001).

La necesidad crítica de un diagnóstico de laboratorio rápido para la tuberculosis lleva al desarrollo de un gran número de procedimientos para un diagnóstico molecular como la tipificación de *Mycobacterium bovis*, que incluyen métodos de amplificación basados en la PCR (Neimark *et al.*, 1996).

##### 4.6. 1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En los años setenta se desarrollaron los métodos que permitieron de manera simple y relativamente rápida para determinar la secuencia nucleotídica de cualquier fragmento de DNA. Estos primeros intentos de secuenciar los ácidos nucleicos siguieron los pasos empleados en la secuenciación de proteínas: romper las moléculas en pequeños fragmentos, determinar su composición de bases y deducir la secuencia a partir de fragmentos solapantes (Jaques *et al.*, 1996).

Este método resulta más o menos sencillo para proteínas que resultan de la combinación de hasta veinte aminoácidos distintos, pero constituye un problema en el caso de los ácidos nucleicos donde la secuencia resulta de la combinación de únicamente cuatro nucleótidos diferentes (Jaques *et al.*, 1996).

La reacción en cadena de la polimerasa, ya más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas *in vitro*, pequeñas cantidades de ADN. Uno de los aportes fundamentales de esta metodología a la investigación básica en biología molecular consiste, precisamente, en la rapidez y eficiencia mediante las cuales se realiza una tarea que antes requería largas y tediosas jornadas (Watson *et al.*, 1992).

En 1983, Kary Mullis dio a conocer la Técnica de reacción en cadena de la Polimerasa o PCR que es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de ADN con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de ADN (Jaques *et al.*, 1996).

Desde que Watson y Crick publicaron el modelo de la estructura en doble hélice del ácido desoxirribonucleico o ADN, se ha producido una verdadera revolución que ha llevado a crear una nueva rama de la ciencia, la Biología Molecular, cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos, es decir, aquellos procesos celulares en los que participan los ácidos nucleicos; por tanto utiliza varias herramientas y técnicas para su estudio (Ramírez *et al.*, 2003).

La reacción en cadena de polimerasa o PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) fue descubierta en 1985 por Kary Mullis en el laboratorio de Cetus Corporation, California, USA, lo que le representó el premio Nobel en 1993. Su nombre lo debe a que la actividad de la enzima ADN polimerasa permite fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente. Es una técnica empleada en Biología Molecular que permite la copia *in vitro* de fragmentos específicos de ADN; consiste en la separación por calor de las dos cadenas del ADN que se quiere amplificar a partir de un punto marcado por dos segmentos pequeños de ADN conocidos como cebadores (primers o iniciadores), que están constituidos de 10 a 30 nucleótidos e indican el inicio y el final del fragmento a duplicar (Ramírez *et al.*, 2003).

Mediante la acción de una enzima denominada ADN polimerasa, se van agregando en forma complementaria los nucleótidos necesarios para obtener una replica exacta de la cadena original. Este procedimiento se repite varias veces y se obtienen múltiples copias del fragmento de ADN escogido (Ramírez *et al.*, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de la biología molecular que permite amplificar exponencialmente una secuencia específica de ADN que puede ser detectada tras electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. La técnica puede realizarse en tan solo 24 a 48 horas (Altamirano *et al.*, 1992) y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacteriano en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis y resultados negativos en la tinción de Ziehl-Neelsen o el cultivo, lo cual resulta particularmente útil en infecciones no bacilíferas y en pacientes con cuadros atípicos asociados con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana o a la inmunosupresión por trasplante (Toledo, 199; Langenegger, 1981). La amplificación de secuencias específicas de ADN micobacteriano mediante RCP ha sido utilizada en cultivo y directamente en muestras biológicas (Sommerfelt, 1989; Acha *et al.*, 2003).

#### 4.6.2. Material

La PCR es una prueba *in vitro* para la amplificación específica del ADN. Los componentes son: ADN blanco, cuatro nucleótidos de ADN, dos primeros y una reacción buffer. El ADN blanco es el ADN que es amplificado por la PCR (Frothingham *et al.*, 1994).

Para el diagnóstico de enfermedades infecciosas el ADN blanco es obtenido muchas veces del cultivo microbiológico o muestras clínicas. La polimerasa es una enzima que copia el ADN, normalmente la fracción de repetición. La polimerasa usa una cadena del ADN como template para la síntesis complementaria de una nueva cadena, usando los cuatro nucleótidos del ADN como ladrillos. Los dos primeros fragmentos sintéticos de solo una cadena de ADN (oligonucleótidos) típico entre 15 a 25 bases largas (Frothingham *et al.*, 1994).

Cada primers es complementario a la región de la cadena del ADN blanco (sitio de reconocimiento). Base de unión complementaria entre cada primer y ADN blanco proporcionan una especificidad a la PCR. Esta prueba es económica. Los elementos típicos de volumen de reacción son 50  $\mu$ l con un valor menor a US \$ 1.00. El costo actual de la prueba es alto incluyendo equipo, preparación de la muestra, controles negativos y positivos, detección de productos por PCR y mano de obra (Frothingham *et al.*, 1994).

#### 4.6.3. Equipo

La reacción es una mezcla rápida de calor y frío realizada en un equipo llamado termociclador. Son fabricados en gran variedad donde los costos varían entre US \$ 2,000 a \$ 15,000. Los modelos actuales de termocicladores pueden completar de 30 a 40 ciclos de amplificación en aproximadamente dos horas (Frothingham *et al.*, 1994).



**Figura. 2. Termociclador en el cual se hace una mezcla rápida de calor y frío de acuerdo al ciclo programado para PCR**

#### 4.6.4. Prueba de laboratorio

La PCR esta basada en un número de ciclos repetitivos de tres secuencias que ocurren a diferentes temperaturas de incubación, en un mismo tubo en presencia de reagentes termoestables, en adición a la secuencia de ADN a ser amplificada (1), dos pequeños oligonucleótidos indicadores denominados primers, (2), grandes cantidades de 4 desoxirebonucleosidos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y (3) una enzima termo estable Taq DNA-polimerasa, aislada de la bacteria termofila *Thermus aquaticus* (Eisenstein *et al.*, 1990).

El primer paso del procedimiento es la desnaturalización del ADN en esta etapa la temperatura debe de ser alta de (90 a 95° C) para fragmentar la uniones de los puentes de hidrógeno que las mantiene unidas. Esta etapa forma una fila de ADN complementaria denominada template o molde, aqui se unirá otra molécula de ADN que contendrá la secuencia complementaria a ella primers (Eisenstein *et al.*,1990).

El segundo paso del ciclo ocurre a temperaturas mas bajas (50° C) es denominado alineamiento, los primers son alineados en secuencias complementarias a filas opuestas de ADN los primers alineados de forma que la reacción de extensión del primer dirija la síntesis de ADN de una dirección a otra. Así mismo un primer "a" una síntesis de la fila de ADN que podrá ser reconocida en el próximo ciclo por el primer "b" y viceversa esto resulta de un número de síntesis de la nueva región del ADN flanqueado por los dos primers (Taylor y Quirke, 1993). Los primers no pueden templarse uno a otro en sus sitios de templación deben de ser suficientemente distantes uno de otro para permitir una la síntesis subsecuente del nuevo producto (Eisenstein *et al.*,1990).

El tercer paso del ciclo es nombrado polimerización y es una síntesis de una segunda fila complementaria de DNA que ocurre por la adición de desoxirribonucleótidos trifosfatos por la Taq DNA polimerasa en la región de templación de cada primer, a una temperatura de aproximadamente 72° C esta extensión ocurre en sentido 5' → 3' (Taylor *et al.*,1993) a una velocidad de 24 nucleótidos por segundo (Sreevatsan *et al.*,2000), de modo que cada nueva fila consiste en una secuencia de nucleótidos ligados con un primer en su extremidad 5' siendo esta complementada a un templete o molde correspondiente (Eisenstein ,1990).

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

La ADN polimerasa mas frecuentemente utilizada es la Taq ADN polimerasa aislada de *T. Aquaticus*. El uso de la Taq ADN polimerasa termoestable tiene grandes ventajas: no necesitan de reposición en una actividad máxima desde que ocurre en temperaturas elevadas, haciendo una reacción más específica y síntesis más rápida (Taylor *et al.*, 1993). Esta sustitución permite un proceso más rápido y una expansión a su aplicación (Eisenstein ,1990).

El desarrollo de métodos moleculares para la tipificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* muestran gran avance en el estudio de la epidemiología de la tuberculosis (Eisenstein ,1990).

El análisis de la restricción del fragmento de extensión polimórfica basada en la detección del elemento IS6110 (Prod'hom *et al.*, 1997).

El método más extensamente usado para diferenciar cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* son la huella de ADN por Southern blotting (tinción meridional) del ADN genómico usando el elemento móvil IS6110 como una prueba. Otro elemento usado son los elementos de pares repetitivos de diferenciación de cepas que es la secuencia abundante GC PGRS y triple (GTG)<sub>5</sub>. Sin embargo los métodos basados en la PCR visualizan y describen el polimorfismo en el ADN de las cepas relacionadas con el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, los métodos descritos no son apropiados para la detección y tipificación simultánea de *Mycobacterium tuberculosis* en muestras clínicas por una gran variación en el tamaño de ADN blanco que es unido por los primers. Se ha descrito un nuevo método llamado “espoligotipificación de espacios” (spoligo typing de espacios) donde las repeticiones directas (DR) de los blancos *in vitro* son usadas para la amplificación de ADN y la variación de espacios es aprovechada para obtener diferentes patrones híbridos de la amplificación del ADN con espacios múltiples sintéticos de oligonucleótidos, como un término de covarianza en la membrana. La espoligotipificación es un método simultáneo rápido y confiable para la detección y tipificación de *M. tuberculosis* en muestras clínicas sin necesidad del cultivo o ADN purificado (Garnier *et al.*, 2003).

Con la disponibilidad de la secuencia genética de *M. bovis*, nos encontramos con la posibilidad de dirigir las bases genéticas de las características fenotípicas claves del bacilo tuberculoso bovino (Garnier *et al.*, 2003).

Por el uso de análisis comparativos, se ha encontrado que deleciones de la información genética han sido la fuerza dominante en darle sentido al genoma. Los análisis indican que la variación en los componentes de la pared celular y expresión genética, que fueron claves para la evolución de *M. bovis* (Garnier *et al.*, 2003).

El uso de la PCR para el diagnóstico de las infecciones bovinas no ha sido evaluado a gran escala a nivel de campo o establos de estudio, así que las pautas para su uso en un programa de erradicación pueden ser recomendadas. A pesar de que existen datos limitados de estudios con animales aislados (Sreevatsan *et al.*, 2000).

El aislamiento de *M. bovis* en medios bacteriológicos de casos sospechosos de TBB requiere de tiempo y es laborioso. Así mismo, la PCR y los análisis radiométricos son procedimientos secundarios y no alternativos de los procedimientos bacteriológicos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas técnicas que ayuden a una rápida detección de micobacterias, tanto de *M. bovis* (Djonne *et al.*, 2003), como *M. tuberculosis*; *M. avium* y *M. intracellulare* en diferentes tipos de muestras (Iwamoto *et al.*, 2003).

La PCR es usada para detectar secuencias de inserción específicas, IS6110, solo para miembros del complejo *M. tuberculosis* (MTC) e IS1245 es específica de *M. avium* (Ibara *et al.*, 2003).

En la TB humana, la tipificación molecular es avanzada por el uso de la inserción de la secuencia IS6110, la cual se repite muchas veces en el genoma de *M. tuberculosis* produciendo una heterogeneidad genotípica de aislamiento. En *M. bovis*, IS6110 es menos útil porque el genoma de la mayoría de las cepas contiene solamente una o muy pocas copias IS6110. Un elemento móvil de DNA en el genoma de *M. tuberculosis* en la inserción de secuencia IS6110, es la base para un método estándar para diferenciación de cepas. El número y la localización de la copia IS6110 en el cromosoma origina los cambios con el análisis de polimorfismo extenso del fragmento amplificado fluorescente (FAFLP) con PvuII u otra enzima de restricción dentro del elemento. La técnica Spoligotyping (oligotipificación del espacio) es capaz de distinguir entre cepas, las cuales tienen unas cuantas copias IS6110 (Goulding *et al.*, 2000).

La PCR para el complejo *Mycobacterium tuberculosis* tiende a mostrar ser una útil herramienta para el diagnóstico de la infección tuberculosa. Varios estudios muestran que la PCR puede trabajar con muestras clínicas de esputo, fluidos respiratorios y tejidos homogéneos permitiendo así un rápido diagnóstico de la tuberculosis, con una sensibilidad comparable a la del cultivo pero en una cantidad de tiempo corto 3 días para la PCR, contra 2 a 6 semanas necesarias para el cultivo y la identificación (Grulia *et al.*, 1998).

Para investigación histopatológica en humanos y animales las muestras de tejidos son fijadas en formalina y hechos bloques de parafina. La ampliación pertinente de la técnica de fijación de tejidos en formalina como la de cubos de parafina, pueden mejorar la rutina de diagnóstico de la infección tuberculosa (Grulia *et al.*, 1998).

El solo material disponible en el bloque de parafina da la posibilidad de evitar el cultivo, pues el tejido se encuentra preservado (Grulia *et al.*, 1998).

La PCR ha sido aplicada con éxito en la detección de grupos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* la amplificación de secuencias específicas de ADN por técnicas de PCR proporcionan un diagnóstico rápido de muchas enfermedades y especialmente en la detección directa de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejidos bovinos. El éxito de la PCR depende de la ausencia de contaminantes en ADN que puede alterar el proceso de la amplificación para un aislamiento libre del ADN se aplica tiosinato diatomaceus de silicio para eficiente la técnica, pues la presencia de impurezas interfiere con la PCR obstaculizando la adopción universal de esta técnica en estudios recientes se muestra la adición de  $\alpha$ -caseína que puede corregir el problema. La PCR se ha adoptado para identificar el complejo *M. tuberculosis* a partir de nódulos linfáticos con lesiones macroscópicas sospechosas desde animales sacrificados y comparándose con las técnicas de cultivo (Grulia *et al.*, 1998).

Recientemente se ha desarrollado una técnica alternativa de espoligotipificación basada en la amplificación directa repetitiva enzimática del locus de *M. bovis* este método detecta la presencia o ausencia de espacios de repetición directa del locus. Es preferible utilizar espoligotipificación en lugar de IS6110-RFLP cuando IS6110 esta presente en poca cantidad. Este método puede distinguir fácilmente entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, pudiendo ser usadas con muestras clínicas positivas al cultivo, como también directamente desde muestras y puede ser usada para aislar e identificar clonaciones naturales (Grulia *et al.*, 1998).

Las pruebas de PCR distinguen entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* dependen de que *M. tuberculosis* contiene más copias IS6110 hechas que por *M. bovis*. Sin embargo algunos estudios muestran que las cepas de *M. bovis* tienen un alto número de copias IS6110, al contrario de algunas cepas de *Mycobacterium tuberculosis* el gen mtp40 se reporta solo en *M. tuberculosis*, la cual se ofrece como una alternativa para distinguir estas especies, pero estudios más allá revelan que este gen puede ser encontrado en su mayoría. Aunque no en todas las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* si no también se puede encontrar en algunas cepas de *M. bovis* (Yeboah *et al.*, 2001).

En 1997, Kamerbeek y colaboradores, reportan a la espoligotipificación basada en la PCR para las huella de las cepas del MTC. Estos trabajos fueron basados sobre trabajos tempranos del polimorfismo de repeticiones directas (DR) de las regiones de subespecies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTCs) que dependen de la presencia o ausencia de espacios específicos en la región de secuencia entre dos secuencias DR agregándose al avance de diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, como *M. bovis* contiene 33 y 34 regiones de espacio, que están ausentes en *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG dos copias con regiones de espacio 33 pero solo una región de espacio 34, para la diferenciación entre *M. bovis*, *M. bovis* BCG, y *M. tuberculosis* se usa la PCR, utilizándose también el PCR en aislamientos de cultivos, como para identificación de de géneros *Mycobacterium*, miembros del MCT y distinguir entre *M. tuberculosis*, *M. bovis*, y *M. bovis* BCG (Yeboah *et al.*, 2001).

Varios estudios sobre el uso de la PCR han sido reportados, pero ninguno de estos tiene completamente evaluado un protocolo fiable de como poder superar el problema de la amplificación del DNA del complejo *Mycobacterium tuberculosis* desde material conservado (Grulia *et al.*, 1998).

El ADN micobacterial es extraído de las colonias de que han crecido en medios sólidos de agar usando tiosina guanidin (GuSCN) con partículas de silicio el PCR multiplex actua como se describe previamente se usa para diferenciar especies de *Mycobacterium*, primero es específico para la región 33 5'-ACA CCG ACA TGA CGG CGG- 3' y otro primer es específico para la región 34 5' -CGA CGG TGT GGG CGA GG-3' ; para la sección IS6110 del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) los primer específicos son TB284 5'-GGA CCA CGC CGA ATT GCG- 3' y TB850 5'-TAG GCG TOG GTG ACA AAG GCC AC-3'; y específicos para el género *Mycobacterium* (geneses antigénicos de 65kDa) primer, TB11 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3 y TB12 5'-CTTGTC GAA CCG CAT ACC CT-3' (Jae-Hoon *et al.*, 2002)

Las condiciones de trabajo de la PCR son 95° C por 5 minutos, 30 ciclos a 95° C por 30 segundos, 60° C por 45 segundos, 72° C por 7 minutos. Después los productos de la PCR son corridos sobre agarosa al 2% por una hora. La secuencia IS6110 es especifica del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que puede ser amplificada desde *M. bovis*, *M. bovis BCG*, los espacios de la región 33 de *M. bovis* producen bandas de 99-bp y *M. bovis BCG* produce dos bandas de 172 y 99-bp correspondiente de ambos lados de los espacios de la región 33 en conjunción con el espacio de la región 34 (Jae-Hoon *et al.*, 2002).

Las técnicas moleculares para la tipificación de las cepas del complejo mycobacterium tienen a ser desarrolladas para la investigación de la epidemiología de estos organismos. El análisis por restricción de endonucleasas de ADN micobacterial produce largas bandas de ADN y después de la electroforesis, el gel dificulta la lectura y la interpretación, especialmente cuando se ocupan dos o tres enzimas de restricción (Feizabadi *et al.*, 1996)

#### 4.6.5 Ventajas de la PCR

La técnica de la PCR presenta ventajas sobre las técnicas convencionales de diagnóstico debido a que tiene una mayor sensibilidad y especificidad, presenta un menor número de falsos positivos y negativos, emplea un tiempo mucho menor para obtener los resultados y puede utilizarse en todas las ramas de la medicina (Frothingham *et al.*, 1994).

Teóricamente la PCR origina el doble del ADN blanco por cada ciclo. En la práctica se alcanza un factor de amplificación entre a  $10^8$  30 a 40 ciclos. La PCR es extremadamente sensible. Bajo condiciones artificiales es posible obtener una copia del ácido nucleico. En la práctica clínica el umbral de detección es de 10 a 1,000 copias de ácido nucleico, produce resultados rápidos en promedio de uno a dos días. Es aplicable en un gran campo como: clínica, patología, muestras forenses (Frothingham *et al.*, 1994).

El ADN es una molécula muy estable y la PCR puede ser usada con éxito en tejidos fijados en formalina, inactividad bacteriana en cultivos y muestras arqueológicas. Muchas veces proporciona una detección y caracterización simultánea de microorganismos, basándose en el análisis de amplificación de la secuencia de sus ADN entre los dos primeros (Frothingham *et al.*, 1994).

#### 4.6.6 Limitaciones

La contaminación es un importante problema de diagnóstico para la PCR; típicamente la PCR produce millones a billones de copias de un segmento de ADN por amplificación. Los productos de la PCR son una fuente de futuras reacciones a partir del ADN blanco. Ello puede ser transferido accidentalmente a una nueva muestra o contaminar los reactivos de la PCR. Los productos de la PCR son totalmente estables en el laboratorio resisten el medio ambiente, enjuague e incluso la autoclave. Una vez contaminados los productos de la reacción es difícil de eliminar el problema (Frothingham *et al.*, 1994).

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

Factores que inhiben la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR están presentes dentro de los ADN blancos de muchas fuentes (Grulia *et al.*, 1998).

La inhibición actúa en uno o más de tres puntos esenciales en la reacción de la siguiente manera: ellos interfieren con la lisis celular necesaria para la extracción de ADN, interfieren por la degradación o captura del ADN, e inhiben a la actividad de la polimerasa (Wilson, 1997).

A pesar de que una amplia gama de inhibidores se han reportado, la identidad y modos de acción de muchos de ellos permanecen sin conocerse. Estos efectos pueden tener implicaciones importantes en las investigaciones de salud pública y en lo clínico, especialmente si las muestras involucran alimentos o muestreos ambientales. Los inhibidores comunes incluyen varios componentes de los fluidos corporales y reactivos encontrados en las ciencias clínicas y forenses (e.g. hemoglobina, urea y heparina), constituyentes de alimentos, (compuestos orgánicos y fenólicos, glucogenos, grasas y Ca<sup>2+</sup>), y compuestos ambientales (compuestos fenólicos, ácidos húmicos y metales pesados). Otros inhibidores de una amplia distribución incluyen constituyentes de las células bacteriales, ADN no blancos y contaminantes y componentes en el laboratorio como por ejemplo polen, polvo de los guantes, utensilios de plástico y celulosa del laboratorio (Wilson., 1997).

#### 4.6.7 Descripción matemática de la PCR

Por definición la PCR es una reacción en cadena de la polimerasa los productos de un ciclo de amplificación sirve como templete para el próximo, generando un aumento del producto exponencial y no lineal. La ecuación que rige este aumento es:

$$N = N_0 \times 2^n$$

N= número de moléculas amplificadas

N<sub>0</sub>=número inicial de moléculas

n= número de ciclos de de amplificación (Köller *et al.*, 1995).

## V. NORMATIVIDAD

### 5.1. 1. Objetivo y campo de aplicación de la Norma

La presente Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto, regular y establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias, técnicas y características para el control y erradicación de la tuberculosis bovina. Su campo de aplicación serán todas las explotaciones pecuarias que manejen bovinos, inclusive para aquellas personas que posean únicamente un animal (NOM-031-ZOO-1995).

La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural y a los gobiernos de los estados en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

La aplicación de las disposiciones contenidas en esta Norma, compete a la Dirección General de Salud Animal, a la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis, así como a las delegaciones estatales de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, en el ámbito de sus respectivas atribuciones y circunscripciones territoriales.

Por lo que se refiere a la normatividad en materia de campaña sanitaria específicamente tuberculosis se basa en la ley de sanidad animal ,dicha 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; apoyándose 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; y expedida por la secretaría que establecerá las campañas y cuarentenas de animales necesarias (DOF,1996).

## 5.1 .2. Disposiciones generales de la Campaña.

El propósito de la Campaña en bovinos consiste en establecer el diagnóstico, prevención y control para la erradicación de la enfermedad (NOM-031-ZOO-1995).

La Campaña se orienta a los animales de las especies bovinas de cualquier raza y función zootécnica. En lo correspondiente a otras especies domésticas y a la fauna silvestre, la Secretaría determinará las especies, en que por razones que se consideren necesarias, sea aplicada esta Norma en los lugares y tiempos que se indiquen (NOM-031-ZOO-1995).

La responsabilidad de operar la Campaña en los estados, será compartida entre el gobierno federal, los gobiernos estatales, los productores, poseedores y comerciantes de ganado, transportistas y otros que determine la Secretaría, con las organizaciones previstas en la Ley de Asociaciones Ganaderas y su Reglamento, a través de los Comités específicos de la Campaña (NOM-031-ZOO-1995).

La protección de estados, regiones, zonas o hatos libres de la enfermedad o en etapas avanzadas del programa, se efectuará mediante el estricto control de la movilización animal, coordinándose para tal fin, el gobierno federal, estatal y los productores a través de la Comisión (NOM-031-ZOO-1995).

La prevención y control de la tuberculosis también se podrá enfocar a reservorios y en la identificación de las fuentes de infección, así como en el correcto diagnóstico y notificación. Las actividades de operación serán responsabilidad del gobierno federal, estatal, municipal y de los productores, a través de la Comisión (NOM-031-ZOO-1995).

Ningún animal reactor a la prueba de tuberculina se podrá movilizar a otra explotación pecuaria, con excepción del ganado productor de leche que se destine a las unidades de producción controlada o instalaciones del mismo propietario dentro de la misma área geográfica determinada por la Secretaría y en transporte flejado (NOM-031-ZOO-1995).

Los Médicos Veterinarios aprobados deberán notificar por escrito por lo menos con cinco días de anticipación a la Subdelegación de ganadería o Distrito de Desarrollo Rural, la programación de actividades de la Campaña, cuando se trate de animales sujetos a comercialización inmediata, esta notificación deberá efectuarse por lo menos con un día de anticipación de la fecha de realización de las pruebas diagnósticas (NOM-031-ZOO-1995).

Para efectos de campaña y sólo para el ganado especializado en la producción de leche, se incluye dentro de la fase de control un programa de monitoreo que permita determinar la prevalencia de la enfermedad y las estrategias a seguir para lograr el control y erradicación de la misma (NOM-031-ZOO-1995).

Para instrumentar el inicio de la Campaña en cada estado, se reunirán los representantes del Comité Estatal para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina o, en su caso, la Delegación de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, de la representación estatal de ganadería, de las Asociaciones Ganaderas Locales, de la Unión Ganadera Regional, del Colegio Estatal de Médicos Zootecnistas y de mutuo acuerdo propondrán e informarán a los ganaderos que comprendan el territorio de la Asociación Ganadera Local, los alcances de la Campaña, fecha de inicio, los procedimientos a seguir, así como las fases y opciones del programa (NOM-031-ZOO-1995).

### 5.1.3. Fases de campaña

La Campaña contempla las siguientes fases de operación:

- a) Control
- b) Erradicación
- c) Libre

### 5.1.4 .Control:

- Iniciar la elaboración de un padrón estatal de productores.
- Control de la movilización.
- Contará con algunos de los elementos del Sistema de Vigilancia Epizootiológica.
- Contará con un programa continuo de promoción de la Campaña.
- Constatación progresiva de hatos.
- Infraestructura de servicios veterinarios técnicos y de diagnóstico.
- Eliminación de reactores.
- Existencia de unidades de producción controlada (opcional).
- Existencia de URZ (opcional).
- Prevalencia de hato mayor a 2% o desconocida.
- Monitoreo en establos lecheros y desarrollo de estrategias.
- Cuencas lecheras permanecerán como áreas cuarentenadas.

### 5.1.5. Erradicación:

- Aprobación expresa de la Secretaría.
- Padrón estatal de productores actualizado.
- Control estricto de la movilización.
- SIVE en operación.
- Contar con un programa continuo de promoción de la Campaña.
- Constatación del 100% de los hatos para conocer la prevalencia de la zona.
- Infraestructura de servicios veterinarios técnicos y de diagnóstico en operación.

- Eliminación de reactores.
- Existencia de URZ, exclusivamente para prueba de ganado procedente de zonas en erradicación.
- Existencia de Unidades de Producción Controlada.
- Prevalencia de hato menor al 2% con distribución conocida.
- Monitoreo en rastros y mataderos.
- Contar con un Dispositivo de Emergencia en Salud Animal.
- Cuencas lecheras permanecerán como áreas cuarentenadas (NOM-031-ZOO-1995).

#### 5.1.6. Libre

- No haber registrado un caso de la enfermedad en los últimos 5 años.
- Aprobación expresa de la Secretaría.
- Padrón de productores actualizado.
- Control estricto de la movilización.
- SIVE en operación.
- Contar con un programa continuo de monitoreo de la Campaña.
- Constatación del 100% de los hatos.
- Infraestructura de servicios veterinarios técnicos y de diagnóstico en operación.
- Existencia de URZ, exclusivamente para prueba de ganado procedente de zonas en erradicación.
- Monitoreo en rastros y mataderos.
- Contar con un Dispositivo de Emergencia en Salud Animal.

La determinación de zona libre se hará mediante acuerdo del Secretario de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, que deberá publicarse en el Diario Oficial de la Federación (NOM-031-Z00-1995).

### 5.1.7. Identificación

Para efectos de la Campaña se deberá identificar plenamente a los animales inscritos en la misma, y para esto se utilizarán las siguientes identificaciones:

a) Arete Oficial de Campaña: utilizado en animales inscritos en la Campaña y a los que se les aplica la prueba de tuberculina.

El arete debe mostrar las siguientes características:

\* La abreviatura del estado de origen.

\* Número progresivo.

b) Arete azul: utilizado en animales que fueron probados y resultaron negativos a la prueba de tuberculina, con fines de exportación.

c) Arete azul con las siglas "HL": utilizado en animales procedentes de un hato libre y con fines de exportación.

El arete debe mostrar las siguientes características:

\* Siglas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR) y de su respectivo logotipo.

\* La abreviatura del estado de origen.

\* Número progresivo.

Todos los animales que sean probados, resulten negativos y que sean destinados para la exportación, deberán ser marcados a fuego con la letra "M" al lado derecho de la base del maslo de la cola (región sacrococcígea).

d) Arete rojo: utilizado en animales reactivos a la prueba de tuberculina. Todos los animales reactivos a las pruebas de tuberculina serán marcados con una perforación circular, en la parte central de la oreja izquierda de 2.5 cm de diámetro o con la letra "T" en forma permanente en el masetero izquierdo, además deberán ser aretados con el arete color rojo, para su clara identificación y enviados directamente a rastro autorizado por la Secretaría. En el caso de bovinos lecheros podrán ser trasladados a Unidades de Producción Controlada.

Para el ganado de registro que se desee movilizar a ferias y exposiciones, podrá utilizarse como identificación el número de registro oficial tatuado en la oreja en vez del arete de Campaña (NOM-031-ZOO-1995).

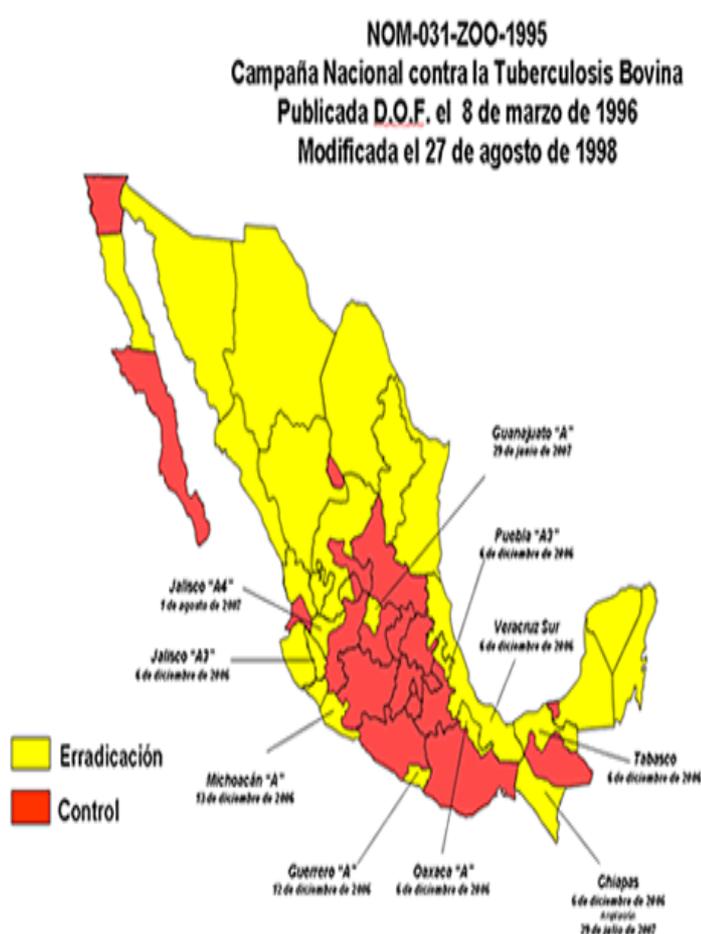
## 5.2. Estrategias de la Campaña.

La estrategia en zonas de baja prevalencia (ganado de carne) son: el diagnóstico y sacrificio de animales positivos, la cuarentena de los hatos infectados, la vigilancia epidemiológica en rastros y mataderos y la constatación de hatos libres (NOM-031-Z00-1996).

En zonas de prevalencia mediana y alta (ganado lechero y doble propósito) son el diagnóstico, sacrificio o segregación de reactores, cuarentena de predios positivos, vigilancia en rastros, aplicación de medidas de bioseguridad y el manejo de hatos infectados.

### 5.2.1. Situación actual de la Tuberculosis Bovina

**Figura 3. Situación actual de la tuberculosis bovina**



**Cuadro 3. Estados erradicados y en control de la tuberculosis bovina de acuerdo a la campaña nacional de Tuberculosis bovina.**

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

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Localización geográfica de la Comarca Lagunera.

El muestreo se realizó en las instalaciones del Rastro Municipal Tipo Inspección Federal (TIF) de Torreón Coahuila.

La investigación y las pruebas de diagnóstico se realizaron en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna, con dirección Periférico y carretera Santa Fe S/N, en Torreón, Coahuila, ciudad que forma parte de la Comarca Lagunera y en el Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila.

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

### 6.2. Sitio de Muestreo

Se realizaron muestreos de órganos considerados sospechosos a tuberculosis de animales sacrificados en el Rastro Municipal (TIF) en Torreón, Coahuila.

### 6.3 Toma de muestras postmortem

Las muestras recolectadas fueron de tejido pulmonar y nódulos linfáticos bronquiales los cuales pertenecían a animales sospechosos a tuberculosis bovina sacrificados en el Rastro.

#### 6.4 Preparación de muestras postmortem.

Las muestras de tejidos fueron obtenidas de animales con lesiones granulomatosas características de infecciones micobacteriales durante la inspección. Los tejidos fueron introducidos a recipientes que contenían borato de sodio para la conservación y transporte del tejido de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995.

#### 6.5 Extracción de ADN.

Para la extracción del ADN se utilizaron 2 técnicas.

La primera fue utilizando el Kit DNAzol (invitrogen Inglaterra) y se realizo de la siguiente manera:

1. Se molió en un mortero 100-250 mg de tejido pulmonar o nódulo linfático.
2. Se le adiciono 1  $\mu$ l de DNAzol (invitrogen Inglaterra).
3. Se coloco en la centrifuga durante 10 minutos a 10,000Rpm.
4. Se tomo el sobrante y se le agrego 0.5 ml de Alcohol absoluto ( Etanol), se mezclo por inversión varias veces y se dejo a temperatura ambiente 3 minutos.
5. Al agregar el alcohol se forma una hebra la cual se lava con 1 ml de alcohol al 75% 3 veces.
6. Se saco el sobrante y se dejo solo la pastilla la cual se coloca el tubo horizontalmente y se coloca un mechero de alcohol para que seque la pastilla.
7. Se le agrego 3  $\mu$ l de TE.
8. Se realizo la lectura del ADN
9. Se anotaron resultados.

La segunda técnica que se realizó para la extracción de ADN es la siguiente:

Se maceró la muestra de tejido y se agregó

Tubo	Adicionar	Peso de tejido
1	40 µl de Proteinasa K [10 mg/kg] 166 µl Buffer lisis celular 40 µl SDS (10%)	100 mg
2	20 µl de Proteinasa K [10 mg/kg] 166 µl de Buffer de lisis celular 20 µl de SDS (10%)	50 mg
3	10 µl de Proteinasa K [10 mg/kg] 166 µl de Buffer de lisis celular 10 µl de SDS (10%)	25 mg
4	30 µl de Proteinasa K [10 mg/kg] 166 µl de Buffer de lisis celular 30 µl de SDS (10%)	75 mg

1. Se incubó durante 24 horas las muestras a una temperatura de 55°C
2. Se sacaron las muestras de la incubadora y se agregó 166 µl de NaCl a cada muestra.
3. Se metieron a la centrifuga a 13,000 Rpm durante 15 minutos.
4. Se tomó el sobrante y se agregó 750 µl de Isopropanol frío.
5. Se agita hasta formar una hebra.
6. Se lava la hebra con 500µl de etanol al 70% 2 veces y se mete a centrifugar nuevamente a 13,000 Rpm durante 5 minutos.
7. Se saca el sobrante y se colocan los tubos horizontalmente y con un mechero de alcohol se coloca para que se evapore el etanol restante y seque la pastilla.
8. Se le agrega al tubo que contiene la pastilla TE.
9. Se realiza la lectura del DNA mediante el Strectrophometer.
10. Se anotó los resultados.

## 6.6. Condiciones de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

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

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

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

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

### 6.6.1 A partir de muestras de tejido

Para la realización de la técnica se utilizaron obtuvo una lectura de ADN de 250-500 µl de ADN para la PCR simple. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen total de 20 µl. La mezcla de PCR contenía una concentración de agua 2.5 µl, Master mix 12.5µl, Oligo TB1F 1.0µ, Oligo TB1R 1.0µl, y 3 µl de ADN y una segunda con técnica utilizando una concentración de agua de 4.0 µl, Mater Mix 13.5, Oligo TB1F 0.75µl, Oligo TB1R 0.75µl y 1 µl de ADN.

### 6.6.2. Condiciones de PCR simple

Para muestras de ADN a partir de tejido, precalentamiento a 94° C 12' (para Taq Gold), 24 ciclos de 94°C por 30 '' ,58°C por 30'' a 72 °C 30'' y una extensión final de 72 °C 5'.

### 6.6.3. Condiciones para PCR anidada

Para muestras de ADN a partir de tejido, precalentamiento a 94°C 12' (para Taq Gold), 35 ciclos de 30'' a 94°C, 30'' a 72 °C y una extensión final de 72°C 10'.

Para muestras de ADN a partir de exudado, precalentamiento a 94°C 12'' (para Taq Gold) ,24 ciclos de 30'' a 94 °C ,30'' a 68 °C, 30'' a 72°C y una extensión final de 72°C 10'.

**Cuadro 4. Protocolo para tejido PCR Simple.**

Simple	1X
Agua	2.5 µl
Master Mix	12.5 µl
Oligo TB1F	1.0 µl ( 25 pmol)
Oligo TB1R	1.0 µl ( 25 pmol)
ADN	3µl

Simple	1X
Agua	4.0 µl
Master Mix	13.5 µl
Oligo TB1F	0.75 µl ( 25 pmol)
Oligo TB1R	0.75 µl ( 25 pmol)
ADN	1.0 µl

**CI (TBBE1)**

96°C 15seg }  
 94°C 30seg } 34 ciclos  
 58°C 40seg }  
 72°C 30seg }  
 72°C 5min }

**TB (TBB2)**

94°C 12seg }  
 94°C 30seg } 24 ciclos  
 58°C 30seg }  
 72°C 30seg }  
 72°C 5min }

Los productos de amplificación se visualizan en un gel de agarosa al 2.5 % ,40 min a 90v. 3 µl de producto de amplificación y 1 µl de buffer de muestra (azul).

**6.6.4. Protocolo para Control Interno.**

Para descartar cualquier tipo de inhibición endógena de la reacción ,se realiza una PCR control utilizando los oligonucleótidos C y B1´5-CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3´y CyB2´5 GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3´. Que amplifica una región de 375 pb del gen que codifica al Citocromo B mitocondrial. Volumen final 20µl ADN 250- 500ng. 34 ciclos desnaturalización 30seg a 94°C, alineación 40 seg a 58°C, y extensión 5min a 72°C.

Los productos se visualizan en un gel de agarosa al 2.5 %.

## 6.7 Electroforesis en gel de Agarosa.

Para visualizar los productos de la reacción de PCR se realiza una electroforesis en geles de agarosa.

### PROCEDIMIENTO

1. Se preparo un gel de agarosa al 2.5%
2. Se coloca dentro de una cámara de electroforesis conteniendo TBE 1x.
3. Se coloca en un parafilm 1  $\mu$ l de jugo azul (azul bromoferol) por cada muestra, tomando en cuenta el marcador molecular.
4. Se dejo correr la electroforesis 40 min a 95v.
5. Al concluir el tiempo de la electroforesis se saco el gel y se metió a un recipiente que contenía bromuro de etidio durante 2 minutos para teñirlo.
6. Se saco y se coloco en otro recipiente con agua durante 10 minutos.
7. Se observo en el transiluminador.
8. Se anotaron los resultados.

## VII. RESULTADOS

Del presente estudio en el cual se pretendió establecer la técnica de PCR para la detección de *Mycobacterium* en muestras clínicas presuntivamente positivas, se encontró lo siguiente.

### **Obtención de DNA.**

La extracción de DNA se logró mediante dos procedimientos. Empleando el Kit comercial DNAzol (Invitrogen, Inglaterra) y un segundo método, empleando digestión mediante proteinasa K, uso de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS 10%) y Buffer de lisis celular. En el primer caso se logró obtener DNA (Cuadro 5), de la 1 a la 7, mientras que por el segundo método se obtuvo más DNA (8-15).

### **Amplificación Mediante PCR.**

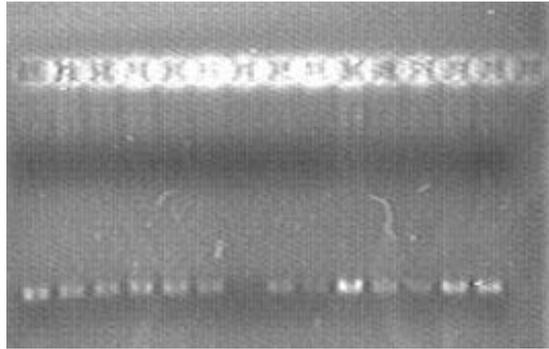
De acuerdo con los resultados encontrados, no fue posible lograr la amplificación del DNA, en ninguno de los dos métodos de extracción, así como tampoco en el control interno (CI), ni en la detección de *Mycobacterium* (Figura 4 y 5), se logro demostrar que los reactivos están funcionales, dado que se logró la amplificación de PCR para un gen de Caspasa 8, desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biomédicas, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila (Figura 6).

Al analizar las muestras y procesarlas se esperaba obtener un resultado satisfactorio, pero algo en la técnica de amplificación fallo, quizás el ADN obtenido pertenecía a otras células cercanas al tejido pulmonar y nódulo linfático el cual intervino en la lectura del ADN que se necesitaba.

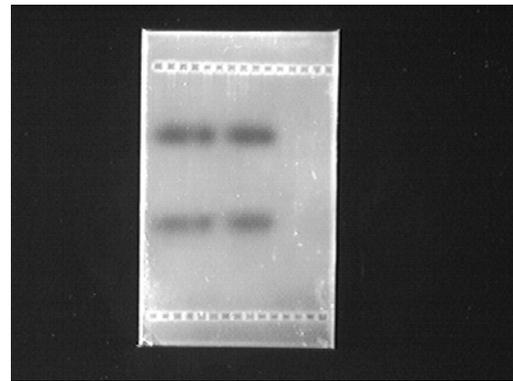
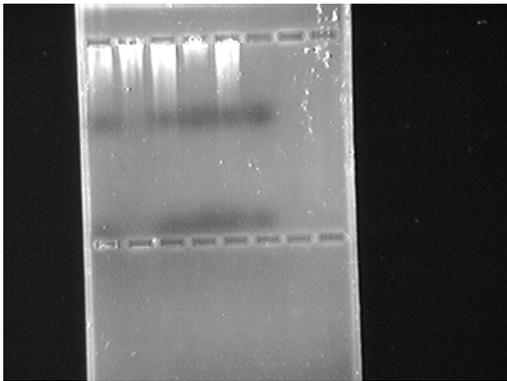
Este método diagnostico que se utilizó tiene costos elevados, además de que se necesita tiempo, dedicación y dinero para su procesamiento, ya que los reactivos, el material y sobre todo el equipo necesario para la realización de esta técnica es costoso.

**Cuadro 5. Resultados de análisis de muestras de nódulos linfáticos y pulmón de animales sospechosos a Tuberculosis bovina en el Rastro Municipal de Torreón, Coahuila (TIF).**

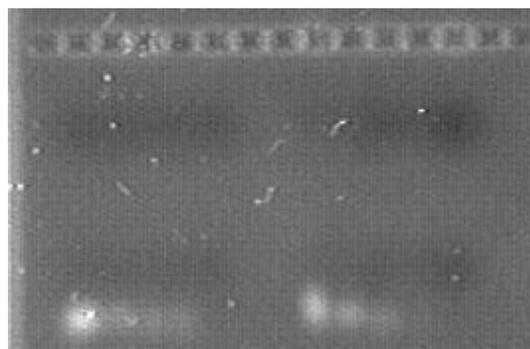
Muestra	Tejido	Cantidad de ADN ng/ $\mu$ l	Resultado PCR
1	Nódulo linfático bronquial	177.4	Negativo
2	Pulmón	165.8	Negativo
3	Nódulo linfático bronquial	182.1	Negativo
4	Pulmón	214.1	Negativo
5	Nódulo linfático bronquial	245.5	Negativo
6	Pulmón	279.0	Negativo
7	Nódulo linfático bronquial	30.1	Negativo
8	Nódulo linfático bronquial	1591.6	Negativo
9	Nódulo linfático bronquial	2753.8	Negativo
10	Nódulo linfático bronquial	1569.7	Negativo
11	Nódulo linfático bronquial	380.8	Negativo
12	Nódulo linfático	1591.9	Negativo
13	Pulmón	395.9	Negativo
14	Nódulo linfático	2846.9	Negativo
15	Nódulo linfático	390.9	Negativo
Total Muestras	de 15	15	15



**Figura 4.** Resultados PCR simple en muestras de exudado nasal de bovinos reactivos a tuberculina



**Figura 5.** Resultados de PCR simple negativos de muestras de tejido pulmonar y nódulo linfático de animales con lesiones predisponentes a tuberculosis



**Figura 6.** PCR para confirmar la funcionalidad de reactivos mostrando resultados satisfactorios.

## VIII. DISCUSIÓN

El uso de PCR para el diagnóstico de infecciones por micobacterias a partir de tejido fresco, exudado nasal, leche u otra muestra clínica se tiene una gran necesidad de poder obtener una sensibilidad y especificidad (>95%) y sobre todo con reducción en tiempo que los métodos de diagnósticos tradicionales.

El uso de la PCR para la identificación de micobacterias involucra la evaluación de características fenotípicas, bioquímicas y de crecimiento, las cuales son laboriosas y costosas.

La PCR ha sido aplicada con éxito en la detección de grupos pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* la amplificación de secuencias específicas de ADN por técnicas de PCR proporcionan un diagnóstico rápido de muchas enfermedades y especialmente en la detección directa de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejidos bovinos. El éxito de la PCR depende de la ausencia de contaminantes en ADN que puede alterar el proceso de la amplificación para un aislamiento libre del ADN (Zanini *et al.*, 2001)

La aplicación de tiosianato y  $\alpha$ -caseína para eficientar la técnica, por la presencia de impurezas interfiere con la PCR obstaculizando la adopción universal de esta técnica. La PCR se ha adoptado para identificar el complejo *M. tuberculosis* a partir de nódulos linfáticos con lesiones macroscópicas sospechosas desde animales sacrificados y comparándose con las técnicas de cultivo (Zanini *et al.*, 2001).

La contaminación y otros factores externos pueden causar la inhibición en algunos puntos de la interacción molecular. Su modo de acción no es del todo comprendido, pero puede ser una interferencia química o física con disponibilidad o actividad de los componentes esenciales. La contaminación puede ser endógena (muestra, enzima, tubos, manipulación), o exógena (bacterial, polvo) a los componentes de la reacción en donde encontramos células bacterianas, DNA no blancos y contaminantes y los mismos componentes del laboratorio para la realización de la técnica (Wilson, 1997).

Los métodos de identificación para micobacterias abarcan las características fenotípicas y bioquímicas que consumen grandes cantidades de tiempo, dinero y esfuerzo para la identificación de micobacterias en los distintos métodos convencionales incluyendo ensayos serológicos y cultivo fecal.

La técnica de PCR requiere del uso de controles internos, así como de controles positivos, sobre todo en aquellos casos, donde la presencia o ausencia de un producto de amplificación es relevante en el diagnóstico, i.e., con la supresión de la secuencia genética y cromosomal.

El resultado negativo puede distinguirse claramente debido al fracaso en la técnica. Así la garantía de la amplificación no tiene éxito debido a una baja proporción de ADNs y un conjunto de reagentes, usando un control blanco es esencial para los organismos que sobrevivan (Neumaier et al., 1998).

En nuestro estudio realizado los resultados obtenidos negativos pudieron ser por la presencia de ADN de otras células cercanas al tejido recolectado y que al momento de la maceración y procesamiento de muestras intervenga en la lectura del ADN, y también por la presencia de algún agente ajeno a la muestra.

La contaminación al momento de estar preparando las reacciones para poder correr la PCR quizás intervino en que no se realizara bien la amplificación, al momento de colocar las diluciones requeridas para cada muestra.

Marchetti *et al.*, 1998, menciona que hay algunos factores que intervienen con la efectividad en la realización de la PCR en tejidos fijados en parafina, formol y puede ser afectada por la interacción de muchos factores como, el tipo de fijación usada, tiempo de fijación, procedimientos de extracción del ADN concentración de ADN blanco amplificada y el protocolo, lo cual está de acuerdo con nuestros resultados, dado que por lo encontrado, es necesario seguir trabajando en la sensibilidad, especificidad del método con el propósito de realizar un diagnóstico rápido y certero como inicialmente queríamos obtener.

Varios estudios sobre el uso de la PCR han sido reportados, pero ninguno de estos tiene completamente evaluado un protocolo fiable de como poder superar el problema de la amplificación del DNA del complejo *Mycobacterium tuberculosis* desde material conservado (Giulia *et al.*, 1998).

En un estudio realizado por Estrada *et al* (2004) quienes pretendían diagnosticar mediante PCR dos grupos de animales: El primero de ellos constituido por 21 bovinos reactivos y el segundo de 20 animales negativos a la tuberculina.

La PCR anidada detectó como positivos los 21 casos con lesiones sugestivas de TB (100%). Considerando las lesiones compatibles (ZN) como diagnóstico confirmativo, tanto el cultivo como la PCR simple mostraron 53% de sensibilidad y 88% de especificidad, mientras que la PCR anidada mostró 100% de sensibilidad y 77% de especificidad. La PCR anidada puede permitir la confirmación del diagnóstico de TB en 24 horas.

En conclusio lo que se obtuvo en la realizacion del presente estudio mediante la tecnica PCR fue un resultado Negativo, con lo cual se requiere seguir mejorando la tecnica de extraccion del ADN y comprobar si es eficiente la PCR anidad para las condiciones de trabajo del tipo de muestras clínicas.

## IX. CONCLUSIONES

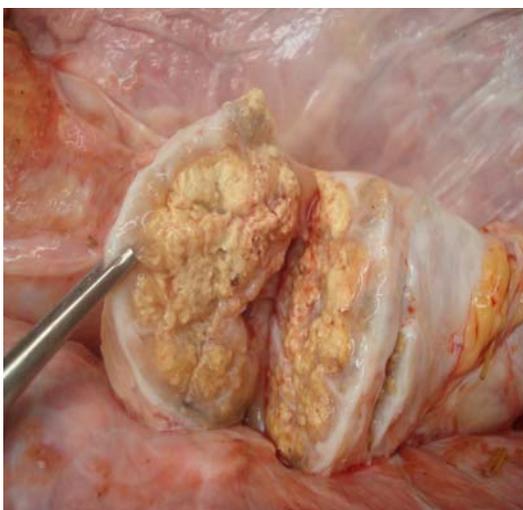
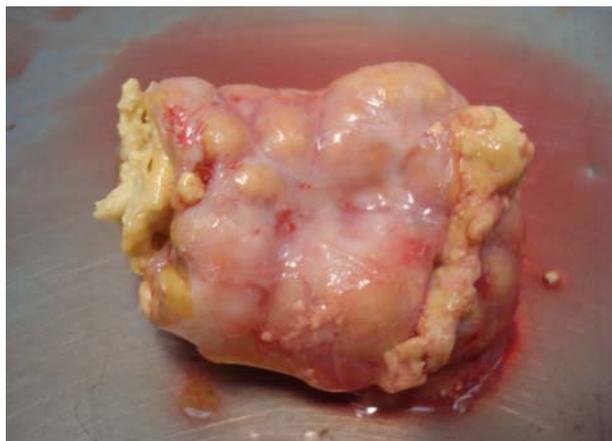
- a. Se concluye que mediante las 2 técnicas de extracción, se logró obtener el DNA.
- b. Que no se puede asegurar la presencia de DNA de *Mycobacterium*, de acuerdo al control Interno.
- c. Que es posible que existan sustancias inhibidoras que impidan el proceso de amplificación
- d. Que el desarrollo de técnicas moleculares de diagnóstico son complicadas, requieren de una inversión inicial fuerte, tiempo, dinero y esfuerzo.

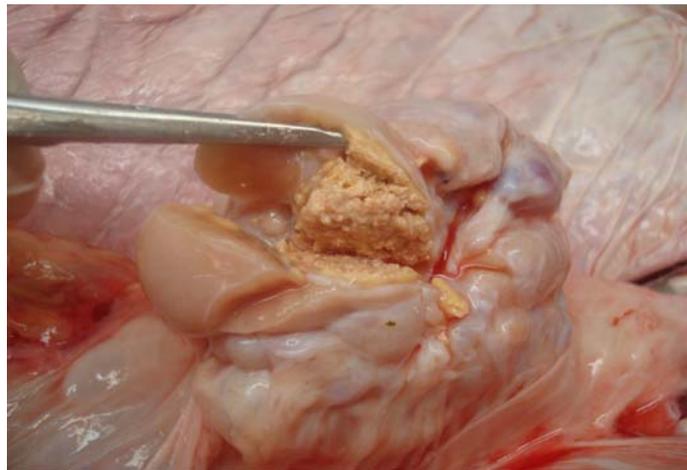
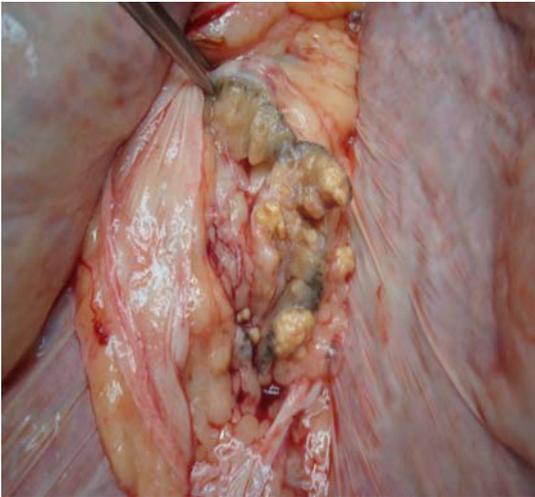
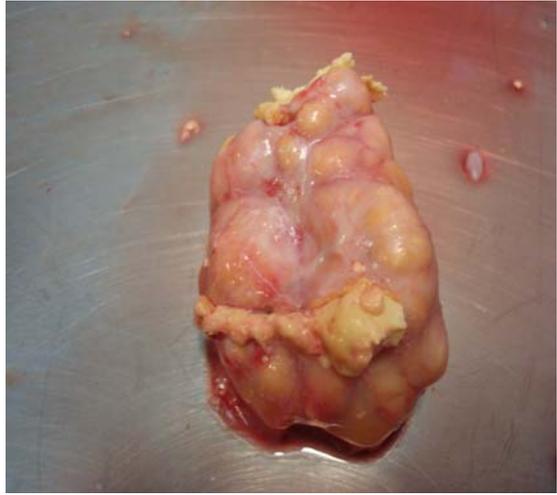
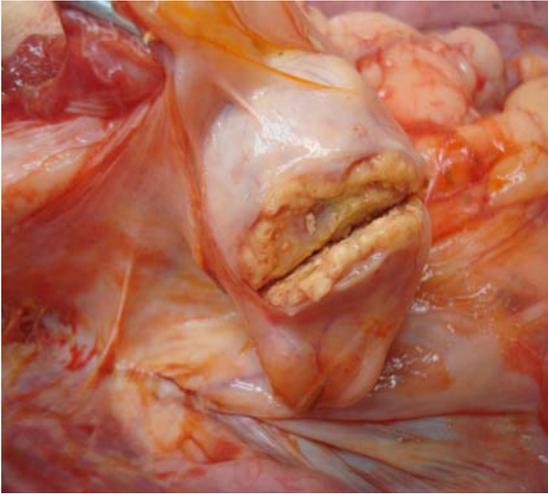
## IMAGENES

### 1. Canal con lesiones granulomatosas

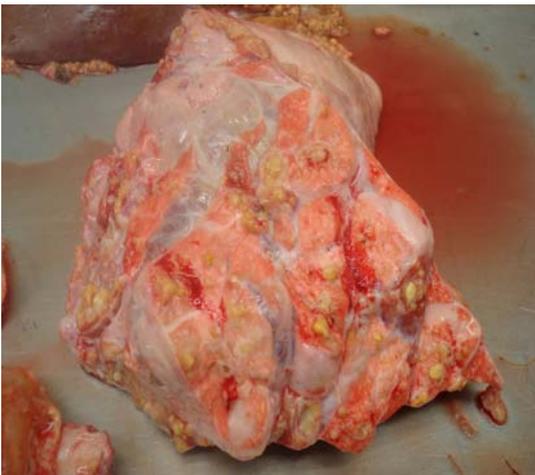


## 2. Nódulos linfáticos con lesiones granulomatosas





### 3. Pulmón con lesiones granulomatosas



## X. REFERENCIAS

1. **Aagaard C. y Govaerts M.** 2003. Genomic Approach to Identification of *Mycobacterium bovis* Diagnostic Antigens in Cattle. J Clin Microbiol 41: 3719-3728.
2. **Abdala, A.** 1998. Tuberculosis bovina, Rev. Sancor 56(604): 26-30. Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
3. **Acha, P. N y B. Szyfres.** 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y animales. Vol. I. 3a ed. p 266-280. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC.
4. **Aguirre, S. O.** 1981. Guía Climática de la Comarca Lagunera. CIAN-CAELALA-ANIA-SARH.
5. **Altamirano. M.** 1992. Characterization of a DNA probe detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 30: p. 2173-2178.
6. **Anónimo.** Tuberculosis bovina Fecha de consulta 23 de Julio del 2008, disponible en: <http://www.invdes.com.mx>. Fecha de la última actualización Octubre del 2000.
7. **Anónimo.** 2008. Programa nacional de diagnóstico y saneamiento de tuberculosis bovina. Fecha de consulta: 8 de Julio 2008. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/PAGE/PG-SAGE>. Fecha de última actualización Diciembre 2004.
8. **Aymerich, C y J. Dominguez-Benitez y V. Ruiz Ausina.** 2000 *Mycobacterium bovis*. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona.pag.4-7.
9. **Barnes, P. H. Quoc Le y Davidson P.** 1993. Tuberculosis en pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana., vol. 6.
10. **Beer, J.** 1981. Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos, Tomo II. p 229-249.Ed. Acribia. España.
11. **Blaaha, T.** (1995). Epidemiología especial veterinaria. p. 164-172 .Ed. Acribia, España.
12. **Caimi, K.** 2001. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp, paratuberculosis in formalina- fixed paraffin-embedded tissues from cattle. J Clin Microb 38:3048-3054.

13. **Campillo Paez. M.T, M. Duro, E, y S. S. Causin.** 2001. Tuberculosis ganglionar, *Medicina general* 35: 529-532.
14. **Cano, C. J. P. y Camacho, L. A.** 2007. Tuberculosis bovina. Fecha de consulta 20 de Julio de 2008, disponible en: [http://fmvz.unam.mx/fmvz/departamento/rumiantes/archivos/tuberculosis\\_bovina](http://fmvz.unam.mx/fmvz/departamento/rumiantes/archivos/tuberculosis_bovina).
15. **Casal, M.** 1987. Sistema radiométrico semiautomático (Bactec 460 TB) para microbiología clínica de tuberculosis y mycobacterias. *J. Microbiol Clin* 5(46-51).
16. **Cosivi, O., J. M. Grange, C. J. Daborn, M. C. Ravigliome, T. Fujikura y Cousins. D.** 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries *J Infect Dis* 4:1-14.
17. **Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, y Reilly PF.** 1998. A study of cattle to cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *J. Vet.* 155:245-250.
18. **Dannenbeg A. M., y Tomaszefski. J.F.** 1988. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis. Mc Graw- Hill Interamericana, España.
19. **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 Buiatrical: 5-10.
20. **DOF.**1993. Ley de Sanidad Animal.Diario Oficial de la Federación, México 18 de junio de 1993.
21. **DOF.** 1996. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-96. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. *Mycobacterium bovis* 6:6-36.
22. **Djonne. B.** 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp paratuberculosis in milk from dairy goats in norway. *J Vet Microbiol* 92:135-143.
23. **Dungworth, D. L.** 1993. The respiratory system. Pathology of domestic animals 4ta edición, vol. 2.
24. **Dunlop, N., y Briles.** 1993. Inmunología de la tuberculosis, vol. 6. Mc Graw-Hill Interamericana.España.
25. **Eisenstein, B.I.** 1990. The polymerase chain reaction: A new method of using molecular genetics for medical diagnosis. The new england *J. Med.* 322:178-183.

26. **Estrada, C. Díaz, y Arriaga, C.** 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Veterinaria, Mexico.35 (3):2-13
27. **Feizabadi, M. M., y Robertson J.D.** 1996. Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 34(5):1136-1142.
28. **Frothingham, R., G. y Hills, H.** 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *M. tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol 32: 1639-1643.
29. **FSAI.** 2003. Zoonotic Tuberculosis and Food Safety, Tuberculosis and Food Scientific Committee.1-18.
30. **Galemis, P.** 1998. Broad scale possum and ferret correlates of macroscopic *Mycobacterium bovis* infection in feral ferret population. J Vet Microb. 46:157-162.
31. **Garbaccio S.** 2001. Una barrera para la comercialización. Instituto de Patología INTA, Castelas.pag.1-4.
32. **Garnier T, Eiglmeier K y Camus JC.** 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci USA; 100:7877-7882.
33. **Goulding, J. N.** 2000. Genome sequence -based fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 38 (3):1121-1126.
34. **Grange, J. M., y Yates, M.D.** 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. J. Microbiol Vet 40:137-157.
35. **Grulia, M., Gori.A, Catozzi L, L. Vago, Nebuloni. M, Rossi.C.M, Degli A, Bandera A, y F. F.** 1998. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin- fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assay. J Clin Microb 36:1512-1517.
36. **Hernández, C. Z., M. Gómez, y Villarreal M.** 2002. Recuperación de micobacterias mediante el uso de dos diferentes medios de cultivo. Secreción de bacteriología. Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela: 1-5.

37. **Hongmanee, P., H. Stender.** 2001. Evaluation of a fluorescence in situ hybridization assay for differentiation between tuberculosis and nontuberculous *Mycobacterium* species in smears of Lowenstein-Jensen and *Mycobacterium* Growth Indicator Tube cultures using peptide nucleic acid probes. J Clin Microb 39(3): 1032-5.
38. **Hopew, P. C.** 1988. Textbook of Respiratory Medicine. Mycobacterial disease. Murray/Nadal. Filadelfia.
39. **Huitrón, G.** 2001. Seminario sobre tuberculosis bovina en Jalisco.
40. **Ibara-Tanaka, I., y Shizuko Anno.** 2003. Comparison of a multiplex - PCR assay with mycolic acids analysis of *mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microb. 47:307-312.
41. **Iwamoto, T., y T. Sonobe.** 2003. Loop mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. J. Clin. Microb. 41:2616-2622.
42. **Jae, H.** 2002. *Mycobacterium bovis* infection in a farmed elk in Korea. J. Vet. Sci. 3:163-166.
43. **Jaques, M., Jacobo Francois.** 1996. Biología Molecular. Ciencia y desarrollo, México, D.F.
44. **Kamerbeek, J., y Scouls, L.** 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology J. Clin. Microb. 35:907-914.
45. **Kantor, I., L. Leoni de Craig, (S/F).** Actualizaciones en tuberculosis bovina. (SAGP. Y A-INNAPPAZ OP/OMS SENESA).
46. **Köller, T., Thamm, B.** 1995. Quantitation of mRNA by Polimerase Chain Reaction. Berlin: Springer-Verlag: 165.
47. **Langenegger, C. H., y O. J.** 1981. Tratamiento de tuberculosis bovina en isoniazida. Pesq. Veterinaria Bras 1:1-6.
48. **León, y Vizcaino. L.** 1990. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in wild board. Int.Symp. Erkrankungen Zoo, Wildtiere, Eskilstuna pag. 185-190.
49. **Little, T.** 1982. Bovine tuberculosis in domestic and wild animals in a arca of dorset III. The prevalence of tuberculosis in mammals other than badgers and cattle. J. Hygiene (London) 89:225-234.
50. **López, A.** 1997. Usos y efectos del bacilo *Mycobacterium bovis* calmette- Guerin (vacunación con BCG) Salud Pública de México 39:156-161.

51. **Mahairas, G. G., y J. P. Sabo.** 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M.bovis*. J. Bacteriology 178:1274-1284.
52. Manual de Brucelosis del comité de la campaña de Tuberculosis bovina y Brucelosis de la Región Lagunera .Fecha de consulta 20 de julio2008.
53. **Moore, D. F., y Curry I.J.** 1998. Detection of the mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by ligase chain reaction. J. Clin. Microb. 36:1028-1031.
54. **Neimark.H, y Ali M.B** 1996. Direct identification and typing of *mycobacterium tuberculosis* by PCR. J. Clin. Microbiol. 34(10):2454-2459.
55. **Neumaier M, Braun A** .1998. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostic. International Federation of clinical chemistry scientific division committee on molecular biology techniques.44:12-26.
56. **Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-95.** Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). *Diario Oficial de la Federación*. Marzo, 1996. 6: 35.
57. **OIE.** 1996. Tuberculosis bovina. Manual OIE. p 267-275. Fecha de consulta 25 de Julio de 2008, Disponible en <http://www.oie.int/ep/normes/mmanual/A00054.htm>.
58. **OPS.** 1985. El cultivo del *Mycobacterium tuberculosis* Organización Panamericana de la Salud, Fecha de consulta 23 de Julio del 2008, Bacteriología de la tuberculosis.
59. **O Reilly, L., y D. C.** 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man. Review Tuberc. Lung. Dis 76 (supl):1-46.
60. **Phillips, C. J., y Foster. C.R.** 2003. The transmission of *mycobacterium bovis* infection to cattle. Rev. Vet. Sci. 74:1-15.
61. **Pollock, J. M., y Neils.D.S** 2001. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. The veterinary journal 163:115-127.
62. **Prod'hom, G., y G. C.** 1997. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain by ligation-mediated PCR fingerprint analysis. J. Clin. Microbiol. 35:3331-3334.
63. **Radostits, O.; O. Blood; C. Gay; y Hinchcliff. K.** 2002. Medicina veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9a ed. p 1076-1085. Ed. Mc Graw- Hill Interamericana. España.

64. **Ramírez, C. C., y Antonio.S.F.M.** 2008. Proyecto de tuberculosis bovina. Diagnostico de la tuberculosis en el ganado bovino.
65. **Ramírez, R.** 2003. Reacción en cadena de polimerasa. 3 (1): 1-6.
66. **Ruiz-Manzano J., Manterola M. J, et al.,** 1998. Nomenclatura y clasificación de las micobacterias. arch bronconeumol 34: 154-157.
67. **Silver, R. F., y Li.Q.** 1998. Expression of virulence of mycobacterium tuberculosis within human monocytes virulence corelates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte dependent monocyte effector funetion. Infect. Immun. 66:1190-1199.
68. **Sommerfelt, I.** 1989. Epidemiología de la tuberculosis bovina, en programas de control de erradicación de la tuberculosis, brucelosis bovina y fiebre aftosa.1-6. Arequipa, Perú. OPS.
69. **Sreevatsan, S., y B. S.B.** 2000. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J. Clin. Microbiol. 38:2602-2610.
70. **Taylor.** 1993. Polimerase chain reaction: Basic principles and automation PCR.1-13.
71. **Tizar, I.** 2002. Inmunología veterinaria 6a. p 371-379. Mc Graw-Hill, Interamericana. España.
72. **Toledo, P.; M. Santillán; F. Milián; y Ramírez. I.** 1999. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios. Vet. Méx. 30: 227-229.67.
73. **Watson J.D, M. Gilman, Witkowski. J, y Zoller. M.** 1992. Recombinant DNA, 2da. Ed, Freeman, New York.
74. **Wedlock.** 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human population. Microb. Infec. 4:471-480.
75. **Wilson.I.G.** 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification Minireview. App.Envirion. Microbiol. Infection 63:3741.
76. **Yeboach, M. D., y Yates M.D.** 2001. Application of simple multlipex PCR to aid in rutine work of the *Mycobacterium* reference Laboratory. J Clin Microbiol 39:4166-4168.
77. **Zanden, A. G., M, y Hoentjen. A.** 1998. Simultaneos detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in strain microcopi preparations. J. Clin.Pathol 51:209-214.

78. **Zanini, M. S., E. C. Moreira.** 2001. *Mycobacterium bovis*: Polymerase Chain Reaction Identification in Bovine Biopsies and Genotyping in Isolates from Southeast Brazil by Spolygotyping and restriction. Fragment Length Polymorphism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 96: 1-5.