

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**IDENTIFICACIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE
PCR EN MUESTRAS DE EXUDADO NASAL EN VACAS
POSITIVAS A TUBERCULOSIS**

POR:

BRENDA LIMA PASTRANA

TESIS:

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

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México

Agosto del 2011

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA- DIVISIÓN DE REGIO NALCIENCIA ANIMAL

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como requisito parcial para obtener el grado de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

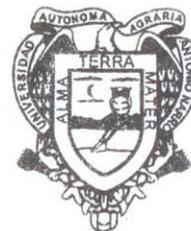
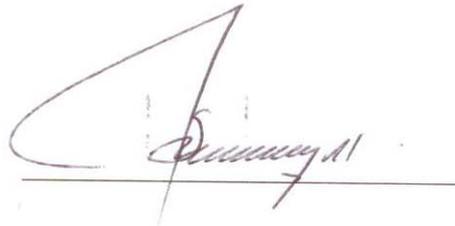
M.C. María Hortensia Cepeda Elizalde



PRESIDENTE

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

M.V.Z. Rodrigo I. Simón Alonso



**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA - DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TESIS:

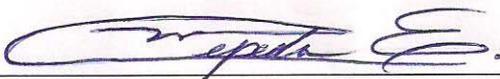
IDENTIFICACIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE PCR EN
MUESTRAS DE EXUDADO NASAL EN VACAS POSITIVAS A TUBERCULOSIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

JURADO EXAMINADOR

PRESIDENTE: _____



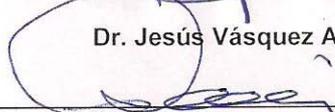
M.C. María Hortensia Cepeda Elizalde

VOCAL: _____



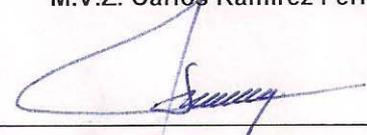
Dr. Jesús Vásquez Arroyo

VOCAL: _____



M.V.Z. Carlos Ramírez Fernández

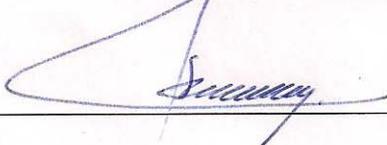
VOCAL SUPLENTE: _____



M.V.Z. Rodrigo I. Simón Alonso

COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

M.V.Z. Rodrigo I. Simón Alonso



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila. México

Agosto de 2011

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

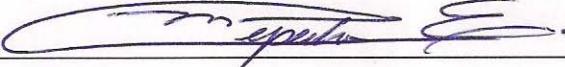
TESIS:

IDENTIFICACIÓN DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE PCR EN
MUESTRAS DE EXUDADO NASAL EN VACAS POSITIVAS A TUBERCULOSIS

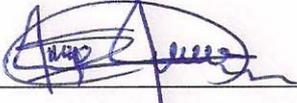
Tesis elaborada bajo la supervisión del comité asesoría y aprobada como requisito parcial para
obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

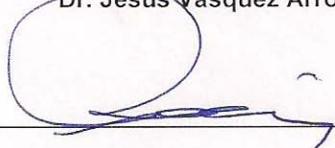
COMITÉ PARTICULAR

Asesor Principal: 

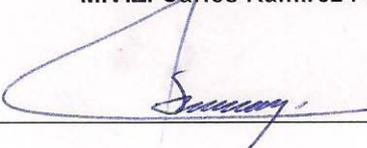
M.C. María Hortensia Cepeda Elizalde

Co-Asesor: 

Dr. Jesús Vásquez Arroyo

Asesor: 

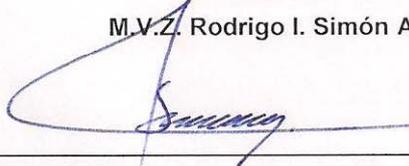
M.V.Z. Carlos Ramírez Fernández

Asesor: 

M.V.Z. Rodrigo I. Simón Alonso

COORDINADOR DE LA DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

M.V.Z. Rodrigo I. Simón Alonso





Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

DEDICATORIAS

A mis padres:

ROSA Y CLEMENTE

Gracias Papá por la disciplina que inculcó en mí, que hizo de cada día de mi carrera, la prioridad para dar lo mejor de mí.

Para ti Mamá que eres lo más importante de mi vida, gracias por todo el amor, comprensión y por ser una excelente amiga.

A mis hermanos Víctor, Ivan y Omar, por hacer que la familia Lima crezca y sea más unida.

Para la familia Pastrana

Con mucho cariño y admiración a usted Maestra Tensy por sus excelentes consejos, que hacen de mí una mejor persona cada día.

A mis Amigos que compartieron mis alegrías y tristezas en el transcurso de la carrera y por hacer de esta etapa de mi vida una de las más inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

Como un agradecimiento para la M.C. María Hortensia Cepeda E. por el cariño y apoyo moral y estímulos brindado con infinito amor y confianza, por infundir en mí un ejemplo a seguir, gracias Dra. Tensy por su amistad desde el inicio hasta el final de mi carrera profesional.

Gracias Dr. Jesús Vázquez A. por creer en mí para realizar esta investigación, por la paciencia con la que me enseñó, por el tiempo que me dedicó, por abrirme las puertas a nuevas personas que aportaron en la realización de esta tesis.

Gracias a la Dra. Clara Inés Espitia P. por darme la oportunidad de trabajar en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Al Dr. Antonio J. Vallecillo, gracias por todos los conocimientos que compartió en la realización de la investigación, le agradezco la paciencia con la que me enseñó y por la confianza que me dió para que este trabajo diera resultados. Por todos sus consejos de amigo, que cada día tendré presente.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio de Biomédicas, en especial a ti Cristi y Gaby, por brindarme su amistad para hacer mi estancia más ligera.

Gracias Dios por permitir descubrir lo maravilloso de esta carrera, por la oportunidad de conocer a todas estas personas de quienes recibí consejos, compañía, motivación y de esta manera su Amor llegaba a mí haciéndome sentir que nunca estuve sola.

Ni ninguna nación podrá dominar debidamente la tuberculosis humana mientras permita que la enfermedad exista en el ganado (MYERS).

RESUMEN

La tuberculosis bovina constituye un grave problema de salud animal y un riesgo en la salud pública. El agente causal, *Mycobacterium bovis*, está ampliamente distribuido en México. La tuberculosis es motivo de regionalización del país de acuerdo a la prevalencia, por tal motivo, la comercialización y exportación de bovinos, así como su movilización, es restringida. El diagnóstico oficial de la tuberculosis en bovinos en el campo se realiza con la prueba de tuberculina y posmortem con histopatología o por aislamiento del agente etiológico. Aunque la prueba de la tuberculina tiene baja especificidad, es suficiente para enviar animales reactivos a sacrificio, lo que no garantiza que el animal esté infectado. Lo anterior, hace patente la necesidad de métodos más sensibles y específicos (Morales *et al.*, 2008). En la presente investigación se analizaron muestras de exudados nasales de bovinos, para detectar microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todos los animales positivos a la tuberculina se consideraron como animales infectados y éstos fueron comparados con la técnica de PCR. Se muestrearon 22 animales reactivos a PPDB. El ADN de los exudados nasales se obtuvieron con el método de extracción bromuro de cetiltrimetilamonio y éste se utilizó en una PCR simple para amplificar el fragmento (372 pb) del gen MPB70 del complejo *M. tuberculosis*. La prueba de PCR logró detectar 7 muestras positivas (31.8%). La PCR es específica, comparada con la prueba de tuberculina. Quedó demostrado que la prueba de PCR en secreciones nasales pueden utilizarse en situaciones de compra-venta o en exposiciones ganaderas como un análisis de tamizaje para prevenir el contagio y la introducción de la enfermedad en los rebaños sanos.

Palabras clave: *Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), inspección post mortem (IP), histopatología, tuberculosis bovina (TB), Mycobacterium bovis, diagnóstico molecular.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	v
1. Introducción.....	1
2. <i>Complejo Mycobacterium</i>	2
3. Objetivo.....	6
3.1. Hipótesis.....	7
3.2. Salud Pública.....	8
3.3. Historia.....	9
3.4. Tuberculosis Bovina.....	11
3.5. Transmisión.....	12
3.6. Patogenia.....	13
3.6.1. Periodo del complejo primario.....	13
3.7. Signos Clínicos.....	14
3.8. Lesiones.....	16
3.8.1. Lesiones post mortem.....	16
3.9. Diagnóstico diferencial.....	17
3.10. Normatividad.....	18
3.11. Situación internacional.....	22
3.11.1. Plan estratégico 2008-2012.....	24
3.11.2. Objetivos.....	24
3.12. Estrategias.....	24
3.13. Péptidos antimicrobianos en la tuberculosis.....	27
3.14. Control.....	29
3.14.1. Control en explotaciones lecheras.....	30
3.15. Limpieza, desinfección y esterilización Antisépticos y desinfectantes.....	33

3.15.1. Diagnóstico.....	34
3.15.2. Prueba intradérmica de la Tuberculina (PPD).....	35
3.15.3. ELISA.....	36
3.15.4. Los ensayos de liberación de interferón gamma.....	37
3.15.5. Identificación Bioquímica.....	37
3.15.6. Inspección post mortem (IP).....	37
3.15.7. Inspección post mortem, histopatología y bacteriología.....	38
3.15.8. PCR.....	38
3.15.9. Electroforesis.....	40
4. Localización geográfica de la Comarca Lagunera.....	43
4.1. Extracción del DNA genómico Micobacteriano a partir de muestras de exudados nasales	45
5. PCR simple.....	47
5.1. Electroforesis en gel de agarosa.....	51
6. JUSTIFICACIÓN.....	52
7. RESULTADOS.....	53
8. DISCUSIÓN.....	55
9. CONCLUSIÓN.....	56
10. LITERATURA.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura.1 La estructura de la pared celular micobacteriana	3
Figura. 2. Clasificación de las micobacterias patógenas seleccionadas para el ser humano.	4
Figura.3. Fotocromógenos de crecimiento lento.	4
Figura.4. Escotocromógenos de crecimiento lento.	5
Figura.5 Crecimiento rápido.	5
Figura.6. Ciclo de amplificación de PCR	39
Figura. 7. Esquema de trabajo.	42
Figura.8. Reactivos para la extracción del DNA.	45
Figura.9.Reacciones de PCR.	47
Figura.10.Centrífuga.	48
Figura. 11, 12. Termociclador	48
Figura. 13. Ampliación exponencial.	50
Figura.14.Preparacion de electroforesis.	51
Figura.15. Amplificación de PCR.	54

ÍNDICE DE IMAGEN	
Imagen 1. Nódulos linfáticos agrandados de 2 a 10 cm de diámetro,	17
Imagen 2. El pulmón con múltiples focos de necrosis	17
Imagen 3. Estados en fase de Erradicación.	19
Imagen 4. Clasificación de los estados de baja prevalencia de tuberculosis bovina.	22
Imagen 5. Infección por <i>M. tuberculosis</i> a través de los receptores TLR 2-1.	28

TERMINOLOGÍA TÉCNICA	
ADN.	Ácido desoxirribonucleico
ADN <i>Taq</i> Pol	Enzima ADN polimerasa extraída de <i>Thermus aquaticus</i> .
CTAB	Cetil-dimetil-etil bromuro de amonio
dNTPs	Deoxi-nucleósidos Tri-fosfatos
EDTA	Sal disódica del ácido etilendinitrilo tetracético
KCl	Cloruro de Potasio
M	Molar
MPM	Marcador de Peso Molecular
TBE	Amortiguador de Corrida Tris-Borato-EDTA
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
μl	Microlitro
μg	Microgramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de Sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPD	Derivado Proteico Purificado
TE	Amortiguador Tris-EDTA
Tris- HCl	Tris-Ácido Clorhídrico
UV	Ultravioleta
V	Voltios

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad a lo largo de la historia, normalmente evoluciona de forma crónica y se acompaña de procesos inflamatorios específicos. Puede afectar tanto a seres humanos como a animales (domésticos o salvajes). Es una importante zoonosis de declaración obligatoria. *Mycobacterium tuberculosis*, es el principal causante de muerte en la edad adulta y ocupa el octavo lugar como causa de muerte a nivel mundial (García y Valdespino, 2001).

El nombre de tuberculosis proviene de los nódulos, llamados tubérculos, que se forman en los nódulos linfáticos del animal afectado (Barrios *et al*, 2010).

M. tuberculosis es un patógeno intracelular capaz de producir infecciones de por vida. En el período de exposición, *M. tuberculosis* ingresa en las vías respiratorias y las diminutas partículas infecciosas alcanzan los alvéolos, y son digeridas por los macrófagos alveolares. Las bacterias fagocitadas también pueden eludir la destrucción mediada por los macrófagos con la formación de intermediarios reactivos del nitrógeno. Los macrófagos circulantes y los linfocitos son atraídos hasta los focos de infección por las bacterias, los restos celulares y los factores quimiotácticos propios del organismo. La característica histológica de este foco es la formación de células gigantes multinucleadas a partir de los macrófagos fusionados, conocidas como células de Langhans. Los macrófagos infectados se pueden diseminar también durante la fase inicial de la enfermedad a los nódulos linfáticos locales, así como al torrente circulatorio y a otros tejidos (médula ósea, bazo, riñones, sistema nervioso central). La eficacia de la destrucción bacteriana se relaciona en parte con el tamaño del foco de la infección. Las colecciones localizadas de macrófagos activados (granulomas) evitan la posterior diseminación de las bacterias. Las bacterias pueden permanecer latentes en esta fase o se pueden reactivar algunos años más tarde. Este es el motivo de que la enfermedad pueda no desarrollarse hasta etapas tardías de la vida en pacientes expuestos a *M. tuberculosis* (Murray y Rosenthal, 2007).

El agente causal, *Mycobacterium bovis*, está ampliamente distribuido en México. La tuberculosis bovina es una de las enfermedades zoonóticas más importantes del país, debido a que provoca cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería nacional, además del impacto en la salud pública. En México, la tuberculosis limita la movilización, comercialización y exportación del ganado, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores y el país (Morales *et al.*, 2005).

El mecanismo de transmisión en el ganado es por inhalación, y también por ingestión y posterior diseminación hematógona, hasta alcanzar el pulmón (Prat *et al.*, 2004).

En México, el diagnóstico de tuberculosis bovina se realiza mediante pruebas de tuberculina, cultivo e histopatología, pero éstas presentan algunas limitantes de sensibilidad y especificidad (Morales *et al.*, 2005).

Un animal que resulta positivo a la prueba de tuberculina se conoce como reactor. La prueba de tuberculina es relativamente rápida, en comparación al cultivo que dura de 7 a 8 semanas, pero tiene una sensibilidad del 72,0% y presenta reacciones antigénicas cruzadas con bacterias atípicas. El aislamiento del agente etiológico es una prueba confirmatoria, pero el cultivo es un proceso largo, pues se trata de un microorganismo que crece lentamente por lo que se requieren semanas para que las colonias puedan ser observadas (Morales *et al.*, 2005).

La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), tiene una ventaja ya que identifica bacterias del complejo *M. tuberculosis* donde se incluye a *M. bovis*. Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han implementado diferentes protocolos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en humanos y animales (Morales *et al.*, 2005).

2. Complejo *Mycobacterium*

Características generales

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos aerobios inmóviles y no esporulados con un tamaño de 0.2-0.7 µm de grosor y 1-10 µm de longitud. En algunos casos, estos bacilos forman filamentos ramificados. La pared celular es rica en lípidos, lo que hace que su superficie sea hidrofóbica y confiere a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes y frente a las tinciones habituales de laboratorio. Cuando han sido teñidos, los bacilos tampoco se pueden decolorar con las soluciones ácidas, motivo por el que reciben el nombre de bacilos acidorresistentes. Las *micobacterias* pertenecen al orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae* (Murray y Rosenthal, 2007).

Debido a que la pared celular de las *micobacterias* es compleja, la mayoría de estas crecen lentamente y se dividen cada 12 a 24 horas.

Las *micobacterias* son ricas en lípidos. Estos incluyen ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena larga), cera y fosfátidos. En la célula, los lípidos están unidos en su mayor parte a proteínas y polisacáridos. El dipéptido muramil (procedente de peptidoglucanos) forma complejos con el ácido micólico y puede generar la formación de granulomas; los fosfolípidos inducen necrosis caseosa (Llop *et al.*, 2001).

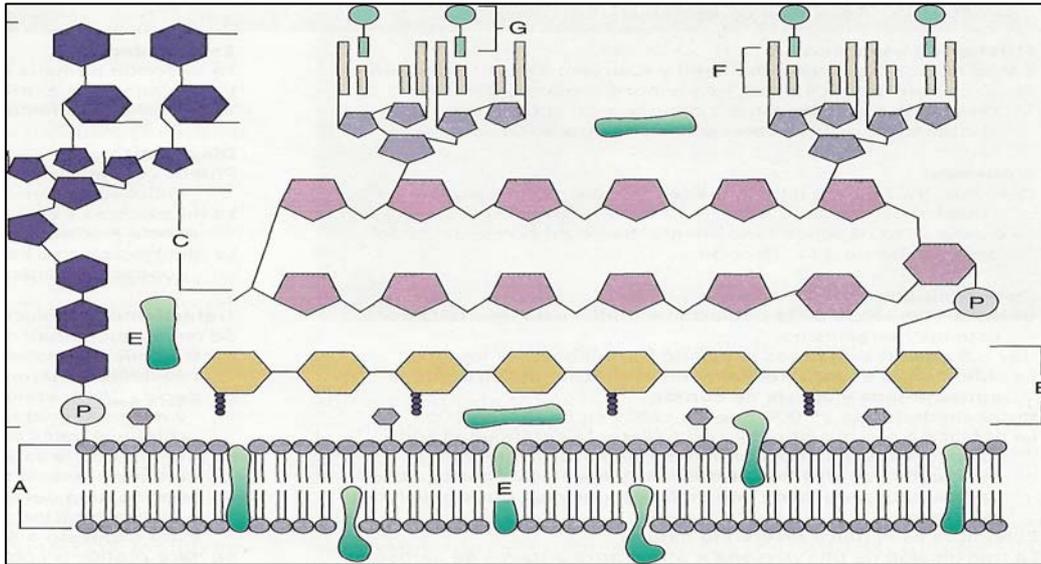


Figura.1 La estructura de la pared celular micobacteriana

- (A) membrana plásmica
- (B) peptidoglucano
- (C) arabinogalactano
- (D) lipoarabinomano con cabeza de mañosa
- (E) proteínas asociadas a la membrana plasmática y a la pared celular
- (F) ácidos micólicos
- (G) moléculas de glucolípidos de superficie asociados a los ácidos micólicos

Las cuatro primeras especies que integran el Complejo *M. Tuberculosis* (complejo CMTTB) desde el punto de vista patogénico, son:

- *M. tuberculosis*, atogénico de la enfermedad en el hombre,
- *M. bovis*. Afecta principalmente a rumiantes domésticos y salvajes.
- *Mycobacterium africanum* (subtipos I y II) causa de tuberculosis humana en África tropical,
- *M. microti*. Afecta a roedores,

M. avium. Infecta principalmente a aves y a cerdos (Aranaz *et al.*, 1996). Los bovinos son resistentes al bacilo aviar y pocas veces sufren TB evolutiva. Sin embargo los *M. avium* tienen importancia en los programas de control porque sensibilizan a los bovinos a la tuberculosis ocasionando problemas en el diagnóstico (Abdala, 1998).

Runyon clasificó las micobacterias en función de su velocidad de crecimiento y su capacidad de producir pigmentos en presencia o ausencia de luz. Las

micobacterias pigmentadas producen carotenoides amarillos intensos. Los microorganismos fotocromogénicos generan estos pigmentos únicamente después de la exposición a la luz, mientras que los microorganismos escotocromogénicos fabrican pigmentos tanto en la oscuridad como en la luz (figuras 2, 3, 4 y 5) (Murray y Rosenthal, 2007).

<u>CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS PATÓGENAS SELECCIONADAS PARA EL SER HUMANO.</u>	
Grupos no clasificados por Runyon	
MICROORGANISMO	PATOGENICIDAD
<i>Ni. Tuberculosis</i>	Patógeno estricto
<i>Ni. leprae</i>	Patógeno estricto
<i>Ni. africanum</i>	Patógeno estricto
<i>Ni. bovis</i>	Patógeno estricto
<i>Ni. bovis (cepa BCG)</i>	Patógeno ocasional

Fig. 2. Clasificación de las micobacterias patógenas seleccionadas para el ser humano.

<u>FOTOCROMÓGENOS DE CRECIMIENTO LENTO</u>	
<i>M. kansasii</i>	Generalmente patógeno
<i>Ni. marinum</i>	Generalmente patógeno
<i>Ni. simiae</i>	Generalmente patógeno

Fig.3. Fotocromógenos de crecimiento lento.

ESCOTOCROMÓGENOS DE CRECIMIENTO LENTO

<i>Ni. szulgai</i>	Generalmente patógeno
<i>Ni. scrofulaceum</i>	Patógeno ocasional
<i>Ni. xenopi</i>	Patógeno ocasional

Fig.4. Escotocromógenos de crecimiento lento.

CRECIMIENTO RÁPIDO

<i>Ni. abscessus</i>	Patógeno ocasional
<i>Ni. chelonae</i>	Patógeno ocasional
<i>Ni. fortuitum</i>	Patógeno ocasional
<i>Ni. mucogenicum</i>	Patógeno ocasional

Fig.5 Crecimiento rápido.

Tradicionalmente, la clasificación de Runyon ha constituido un esquema de clasificación útil para organizar los distintos grupos de especies clínicamente importantes, en especial en los casos en los que la detección y la identificación de las micobacterias en el laboratorio requirió un plazo comprendido entre semanas y meses (Murray y Rosenthal, 2007).

3. OBJETIVO

1. Detectar mediante PCR la amplificación del gen de *Mycobacteria bovis*, en exudados nasales de bovinos reactivos a PPDB.

2. Determinar si existe especificidad en la técnica de PCR para el diagnóstico de tuberculosis bovina.

3.1. HIPÓTESIS

Lograr diagnosticar la tuberculosis bovina por medio de PCR a partir de exudados nasales de vacas.

El diagnóstico molecular de la tuberculosis bovina por PCR a partir de exudados nasales de bovinos lecheros, es más sensible que la prueba de tuberculina.

3.2. Salud Pública

Hoy en día se estima que anualmente existen 9 millones de nuevos casos de enfermedad activa a nivel mundial y un tercio de la humanidad mantiene un estado de infección latente, de los que se calcula que 10% desarrollará eventualmente TB. Con un reservorio de tal magnitud, el control de la TB parece ser una tarea difícil de cumplir (Barrios *et al.*, 2010).

La tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa que más ha afectado a la humanidad a lo largo de su historia, siendo una importante causa de enfermedad y muerte, sobre todo en los estratos más pobres de la sociedad (García y Valdespino, 2001). La OMS señala que en 1979 en el mundo aparecieron aproximadamente un millón de nuevos casos; sin embargo, en 1993, esta cifra ascendió a 10 millones y el número de muertes que causó la enfermedad en ese año fue de 3 millones de personas. Estas cifras son superiores a las producidas por el sida, el tifus, el cólera y la malaria juntos (Martín y León, 1998).

Se demuestra que *M. bovis* juega un papel importante en la epidemiología de la tuberculosis humana y representa un riesgo para la salud pública. La tuberculosis en el ser humano se debe a *M. tuberculosis*, pero también puede ser efecto de otras micobacterias, como *M. bovis*, la segunda causa más común de tuberculosis en las personas (Guerrero *et al.*, 2008).

Uno de los sectores más involucrados en la salud pública es el ganadero. El ser humano depende de los animales por razones de nutrición por lo que el hombre puede enfermarse por vía digestiva (carne, leche y productos lácteos sin pasteurizar) (Abdala, 1998). Sin embargo, estos animales pueden transmitirle enfermedades y producir pérdidas en la ganadería al disminuir la producción láctea y de carne, además de significar pérdidas a los ganaderos cuando se decomisan canales o partes de las mismas debido a la presencia de lesiones de esta enfermedad. Por lo que repercute económicamente en los países en desarrollo (Doménech, 2003).

La tuberculosis es la causa más frecuente de muerte en adultos por un único agente infeccioso en el mundo. El agente más común es *M. tuberculosis*, pero una proporción desconocida de casos es debida a *M. bovis*. Se calcula que *M. bovis* es responsable de aproximadamente un 3% de los casos de tuberculosis en el mundo. Existe una correlación entre la erradicación de la tuberculosis en el ganado y la prevalencia en humanos (García y Valdespino, 2001; Fanning, 1998). Por lo tanto podemos asegurar que la tuberculosis es la enfermedad infecciosa más importante de nuestro tiempo (Doménech, 2003).

3.3. Historia

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

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. 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) (Martín y León, 1998).

Gurlt en 1831, Hering en 1849 y Fuchs en 1859, consideraron la tuberculosis pulmonar del ganado vacuno es esencialmente igual a la tuberculosis pulmonar humana.

En 1868, Villemin confirmó la tuberculosis como una enfermedad transmisible entre hombre a animal 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 (Martín y León, 1998).

En 1882 Koch descubre el bacilo tuberculoso (*Mycobacterium tuberculosis*), demostrando así la etiología bacteriana de la enfermedad.

En 1882 Ehrlich observó que las bacterias de la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) no se decoloraban al tratarlas con un ácido después de haberlas teñido con colorantes de anilina. Según la técnica de Ziehl-Neelsen, un frotis de bacterias fijadas se calienta con carbolfucsina, se lava y se diferencian con alcohol clorhídrico. Las *micobacterias* y *nocardias* no liberan el colorante durante este tratamiento ácido; son ácido-resistentes (Günter, 1997).

El nombre específico de *Bacterium tuberculosis* fue propuesto por Zopf en 1883.

En 1889, tuvo lugar en Finlandia la primera campaña de erradicación de la *tuberculosis bovina*.

En 1890 Koch desarrolla el medio de diagnóstico de la tuberculina, tras la fallida pretensión de utilizarla como vacuna (Günter, 1997).

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 (Aranaz *et al.*, 1996).

La tuberculosis Bovina es producida por el *Mycobacterium bovis*, aislado por primera vez por el año 1898 por Theobald Smith, el cual diferencio el bacilo tuberculoso humano del bacilo bovino, por las características de los cultivos y su diferente patogenicidad para animales de experimentación (Mantilla *et al.*, 2007).

El primer intento para evitar el contagio de la tuberculosis bovina a humanos (1899) se realizó cuando la Royal Comission 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.

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* (Martín y León, 1998).

El nombre *M. bovis* para el bacilo bovino, que constituye parte del complejo *M. tuberculosis*. Fue oficialmente asignado en 1970 por Karlson y Lessel (Pérez *et al.*, 2008).

En 1983, se descubrió el receptor de Vit. D y su presencia en células inmunitarias y su posible aplicación en la patología humana. Los macrófagos infectados por *M. tuberculosis*, a través de los receptores TLR1,2, activan la respuesta innata y además la producción local de Vit. D activa lo que explicaría la hipercalcemia y la calcificación del granuloma caseoso características de la tuberculosis.

1890 por Konig quien realizó laparotomías y exposición solar del peritoneo a 131 enfermos de tuberculosis abdominal, observando mejoría en 107 de ellos (Quirós *et al.*, 2009).

3.4. Tuberculosis Bovina

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa contagiosa causada por *Mycobacterium bovis* una bacteria grampositiva, ácido alcohol resistente (BAAR) del complejo *Mycobacterium tuberculosis* de la familia *Mycobacteriaceae*, se caracteriza por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos; Pertenece al grupo de las enfermedades zoonóticas y es de carácter crónico.

M. bovis es el agente causal específico del ganado vacuno (Acha y Szyfres, 2003) la cual no solo infecta a los bovinos, sino también a un amplio rango de hospederos entre ellos, caprinos, ovinos, caballos, cerdos, perros, gatos, también se ha descrito la enfermedad en muchos otros animales como: búfalos, bisontes, camellos, jabalíes, ciervos, antílopes, zorros, visones, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, cudúes, elanes, tapires, alces, elefantes, sitatungas, órices, addaxes, rinocerontes, zarigüeyas, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como el león, el tigre, el leopardo o el lince; la mayoría de las especies se consideran huéspedes accidentales. Estas poblaciones no mantienen a *M. bovis* de forma indefinida, ante la ausencia de huéspedes que mantienen la infección, pero pueden transmitirla entre sus miembros (o a otras especies) durante un tiempo. Algunos huéspedes accidentales se pueden convertir en huéspedes que mantienen la infección si la densidad de la población es elevada.

Sin embargo, los reservorios existentes, en la fauna silvestre pueden dificultar su completa erradicación. Esta enfermedad también puede representar una grave amenaza para las especies en peligro de extinción.

La tuberculosis bovina aún es frecuente en países subdesarrollados y pueden ocurrir pérdidas económicas graves por la muerte del ganado bovino e igualmente es una restricción severa en el comercio internacional como de productos y subproductos de origen pecuario, ocasionando un impacto directo en la eficiencia de los sistemas productivos y en la industria del sector pecuario, por que provoca importantes pérdidas en la producción de carne, leche y sus derivados, produciendo detrimentos considerables tanto en animales como en la salud pública (Mantilla *et al.*, 2007).

La TB está presente en el mundo entero. La prevalencia más elevada se registra en buena parte del territorio de África y ciertas partes de Asia y las Américas; El agente causal, *Mycobacterium bovis*, está ampliamente distribuido en México (Chávez y Díaz. 2004).

En México, el riesgo se explica por la elevada prevalencia de la enfermedad en el ganado lechero (16%), la falta de participación de los establos lecheros en

campañas de erradicación y el hecho de que 30 a 40% de la leche que se produce se vende en la forma de leche bronca (Pérez *et al.*, 2008).

3.5. Transmisión

El ganado bovino elimina la *M. bovis* en las secreciones respiratorias, heces, leche, a veces en la orina, secreciones vaginales o el semen. En algunos casos, se han observado infecciones cutáneas, genitales y congénitas, pero éstas son poco frecuentes. La mastitis tuberculosa es de gran importancia, no solo por ser fuente de transmisión por medio de la leche al ternero como así también para el hombre. Algunos animales se infectan al ingerir *M. bovis*; esta vía puede ser particularmente importante en terneros que se amamantan de vacas infectadas (Acha y Szyfres, 2003).

La carne cruda o mal cocida también puede ser una fuente de transmisión del microorganismo; la transmisión de persona a persona es poco frecuente en personas inmunocompetentes, pero *M. bovis* en ocasiones se transmitió a grupos reducidos de personas, particularmente alcohólicos o personas infectadas con el VIH. Con menor frecuencia, los humanos han contagiado al ganado bovino a través de aerosoles o la orina (Acha y Szyfres, 2003).

Ningún animal que haya estado en contacto con ganado tuberculoso puede ser considerado totalmente a salvo de la enfermedad mientras viva cualquiera sea su edad. Los animales jóvenes son más propensos a adquirirla y las hembras por factores estresantes como la preñez avanzada, parición, alta producción lechera. La frecuencia de la tuberculosis aumenta a medida que aumenta la edad.

La tuberculosis es una enfermedad de riesgo profesional para trabajadores rurales, tamberos, veterinarios, trabajadores de la industria frigorífica y carniceros (SENASA, 2007).

- **Vía Respiratoria:** Es la principal vía de contagio (80 - 90% de los casos). Se transmite por mugidos, estornudos o tos. Al mugir el bovino elimina microgotas con 100 a 200 bacilos. Al estornudar o toser produce pequeñas microgotas con 1 ó 2 bacilos.
- **Vía digestiva:** Del 10 al 20% de los casos ocurren por esta vía. La transmisión se da por mamar leche de vaca con ubre tuberculosa y de leche infectada no pasteurizada, del suelo, pasto o aguas contaminadas con el bacilo por heces u orines infectados.
- **Vía Congénita:** Cerca del 5% de las vacas tuberculosas, presentan metritis tuberculosa, de las cuales el 50% abortan.

- Ubre: Del 1 al 3% de las vacas tuberculosas tienen mastitis tuberculosa, siendo diseminadora permanentes de bacilos por la leche.
- Ubres infectadas por vía hemática (sanguínea), puede eliminar bacilos en leche sin que exista mastitis tuberculosa.
- Genital: Los toros se enferman montando vacas con metritis tuberculosa. La transmisión más importante se produce por medio de la inseminación artificial al utilizar semen de toros infectados.
- Por heridas: Por introducción del bacilo en lesiones de piel con material infectado (SENASA, 2007).

3.6. Patogenia

El bacilo tuberculoso una vez dentro del animal, puede diseminarse en dos etapas:

1° Tuberculosis primaria (Período del Complejo primario)

2° Tuberculosis secundaria (Período de diseminación Post - primario).

El mecanismo de acción patógena del bacilo se desarrolla, a grandes rasgos penetrando 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 (nódulo). Poco después acaba afectándose el nódulo linfático regional, a partir de la lesión inicial y a este conjunto se denomina complejo primario (García *et al.*, 2001).

3.6.1. Periodo del complejo primario

En este período la lesión inicial en el órgano actúa como puerta de entrada denominado foco primario. Posteriormente o simultáneamente los bacilos drenan por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales donde se origina el mismo tipo de lesión. La combinación de lesiones en el órgano de entrada y en el nódulo linfático regional constituye el complejo primario.

Ejemplo en el complejo primario pulmonar el bacilo penetra en los pulmones, se multiplica y se disemina en los mismos, produciendo una lesión en forma de Tubérculo, infectando al mismo tiempo los nódulos linfáticos bronquiales.

Periodo de diseminación post- primaria

Al disminuir las defensas del animal, la diseminación post-primaria es aquella en la cual los bacilos dan origen a granulomas en los órganos donde se detienen; la extensión de las lesiones se puede realizar por vía linfática, sanguínea o por contacto seroso.

En el caso de la diseminación por vía sanguínea los focos de infección se producen sobre todo en los pulmones, riñones, hígado y bazo (García *et al.*, 2001).

3.7. Signos Clínicos.

La tuberculosis puede ser difícil de diagnosticar basándose sólo en los signos clínicos. Gran parte del tiempo durante el cual el animal permanece infectado transcurre sin que presente alteraciones clínicas evidenciables mediante signos externos de la enfermedad; el periodo de incubación es muy prolongado (varios meses e incluso años). El período clínico, a excepción de los casos en que la tuberculosis cursa bajo la forma de generalización precoz, tiende a ser crónico aunque más corto que el de incubación. La sintomatología resulta poco característica ya que depende de la intensidad de las lesiones así como del órgano que se afecta: junto a la debilidad y la caquexia, predominan los signos de afección respiratoria y las adenopatías subcutáneas (García *et al.*, 2001).

En los animales vivos no suele ser posible el diagnóstico clínico, puesto que la mayor parte de los casos, las lesiones no son visibles ni abiertas al exterior; únicamente cuando la evolución es más grave y cursa con generalización y emaciación, o bien porque predominen las lesiones exudativas en órganos que tienen contacto con el exterior como pulmón, intestino, etc. (Barrios *et al.*, 2010).

Sólo en casos muy avanzados se pueden observar ciertos signos respiratorios, tumefacciones de nódulos superficiales y enflaquecimiento a pesar de la buena alimentación. Estos animales constituyen una fuente de infección para el resto del establo y para el hombre. La prevalencia de la enfermedad suele ser más elevada en los establos lecheros que en los de carne, debido a su vida útil más prolongada y al mayor contacto de los animales entre sí (Abdala, 1998).

La mayoría de las veces la tuberculosis bovina tiene un curso crónico y limitado a un solo órgano: El pulmón.

En estos casos los animales presentan tos crónica, casi nunca fuerte, que suele presentarse como uno o dos golpes, en forma apagada, húmeda, ruda, sin mucha fuerza y expulsando con ella una secreción mucopurulenta.

Suele presentarse fiebre sin signos clínicos especiales, hay una disminución paulatina de la producción láctea en períodos avanzados de la enfermedad.

Algunas vacas enfermas de tuberculosis presentan mastitis tuberculosa, la cual se caracteriza por un endurecimiento y una hinchazón que al principio se desarrolla en la parte superior de la ubre, observándose en ciertos casos los nódulos linfáticos mamarios duros y aumentados de volumen.

En los animales salvajes ocurre lo mismo, pero con el inconveniente del poco acceso y la dificultad de observación de los animales, lo cual hace aún menos practicable el diagnóstico clínico, de tal modo que hay que apoyarse en los hallazgos de la necropsia, y en los datos epidemiológicos de la zona (Barrios *et al.*, 2010).

La Tuberculosis se manifiesta en dos formas principales: Tuberculosis (TB) activa e infección latente (TBL) (Cardona y Ruiz. 2004).

TB activa es el resultado de la reactivación de una infección latente. La TBL se presenta en seres humanos, algunos primates, bovinos y posiblemente otros animales de fauna silvestre. En TBL no hay sintomatología clínica ni es transmisible, debido a que la respuesta inmune es capaz de contener el crecimiento del patógeno pero no de eliminarlo, de manera que la bacteria persiste en el organismo manteniendo una baja o nula actividad replicativa (Cardona y Ruiz. 2004).

3.8. Lesiones

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, en 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 (Etter *et al*, 2006).

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. Mientras que las restantes formas patogénicas de tuberculosis causan una enfermedad crónica.

En el ganado, del 80 al 90% de las lesiones son pulmonares y menos frecuentes, están implicados hígado, riñón o bazo. Ya que durante la diseminación hematogena, alcanza el pulmón. La lesión primaria en el pulmón aparece habitualmente en las áreas dorsales, de localización subpleural y se acompaña de un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos bronquiales.

Por lo general en los estadios avanzados se presenta con una emaciación progresiva, en otros casos suelen toser y ocasionalmente presentan nódulos linfáticos agrandados (Etter *et al*, 2006).

3.8.1. Lesiones post mortem

La tuberculosis bovina se caracteriza por la formación de granulomas (tubérculos) donde se localizan las bacterias. Los que generalmente son amarillentos y caseosos, calcáreos o calcificados y están encapsulados. Con el tiempo, pueden seguir distintos caminos:

- Estabilización: sin modificación aparente durante un largo periodo (lesiones enquistadas).
- Calcificación: las sales cálcicas precipitan sobre el caseum (pueden persistir bacterias en latencia).
- Reblandecimiento: los focos caseosos se ablandan y posteriormente se licúan.

En el ganado bovino, los tubérculos se encuentran en los nódulos linfáticos, particularmente los que se encuentran en la cabeza y el tórax (Biberstein *et al*, 1987).



Imagen 1. Nódulos linfáticos agrandados de 2 a 10 cm de diámetro,

También son frecuentes en los pulmones, bazo, hígado y las superficies de las cavidades corporales. En casos aislados, se pueden hallar múltiples granulomas pequeños en diversos órganos. Las lesiones a veces aparecen en los genitales de la hembra, pero son poco frecuentes en los genitales del macho (Mantilla *et al*, 2007).



Imagen 2. Pulmón con múltiples focos de necrosis.

El pulmón contiene múltiples focos de necrosis caseosa que se unen, rodeada por capsulas fibrosas delgadas y pálidas (tubérculos) (Mantilla *et al.*, 2007).

3.9. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial incluye pleuroneumonía contagiosa bovina, neumonía por *Pasteurella* o *Corynebacterium pyogenes*, neumonía por aspiración, pericarditis traumática, linfadenitis caseosa o mieloidosis en rumiantes pequeños.

3.10. Normatividad

En 1994, se publica de forma emergente, la primera Norma Oficial Mexicana contra la Tuberculosis bovina.

En 1996, se publica la Norma Oficial Mexicana que regula la Campaña contra la Tuberculosis bovina, la cual es modificada en 1998 y es la que actualmente continúa vigente.

La NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto, regular y establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias, técnicas y características para el control y erradicación de la tuberculosis bovina. Su campo de aplicación serán todas las explotaciones pecuarias que manejen bovinos, inclusive para aquellas personas que posean únicamente un animal.

La 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.

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

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

El propósito de la Campaña en bovinos consiste en establecer el diagnóstico, prevención y control para la erradicación de la enfermedad. La erradicación de esta enfermedad es necesaria para evitar a la población humana el riesgo de contraerla, mejorar la productividad de los bovinos, evitar las pérdidas económicas y las restricciones a la movilización de animales, tanto nacional como internacionalmente.

Fases de campaña. Corresponde a la clasificación sanitaria de las etapas en que se encuentra el municipio, región o estado de acuerdo a los avances en la Campaña verificados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural a través de la Comisión.

La Campaña contempla las siguientes fases de operación:

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

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

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

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

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

Arete rojo: utilizado en animales reactivos a la prueba de tuberculina.

Actualmente se encuentran en Fase de Erradicación 11 estados y parte de 15 estados.



Imagen 3. Estados en fase de erradicación.

- ✚ Zonas en Erradicación, prevalencia menor al 2%: Baja California Sur, Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y parte de Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí y Zacatecas.

- ✚ Zonas en Control, prevalencia mayor al 2% o desconocida: el resto del país. Sin embargo, la prevalencia real de Tuberculosis es menor al 2% en muchas regiones del país y esto es más palpable cuando vemos la clasificación que para efectos de la exportación de ganado en pie a los Estados Unidos, otorga el USDA a estas regiones:

- ✚ Acreditado Modificado Avanzado, prevalencia menor al 0.01%: Norte de Sonora.

- ✚ Acreditado Modificado, prevalencia menor al 0.1%: Sur de Sonora, las regiones clasificadas en la categoría “A” de los estados de Baja California, Coahuila, Chihuahua, Jalisco-Zacatecas, Nayarit, Nuevo León, Puebla y Veracruz. Adicionalmente todo el territorio de los estados de Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas y Yucatán.

- ✚ Acreditado Preparatorio, prevalencia menor al 0.5%:

- ✚ Las regiones clasificadas en la categoría “A” de los estados de Aguascalientes, Campeche, Chiapas, Durango, Guanajuato, Guerrero, Michoacán y Tabasco. Adicionalmente todo el territorio del estado de Colima.

- ✚ No Acreditado, prevalencia mayor al 0.5% o desconocida: Resto del país.

En prácticamente 16 años de Campaña se ha avanzado considerablemente, ya que la prevalencia de la enfermedad era desconocida y actualmente existen 25 regiones o estados considerados de baja prevalencia en el país.

Erradicación	Control
Aguascalientes (A)	Aguascalientes (B)
Baja California (A)	Baja California (B)
Baja California Sur	Campeche (B)
Campeche (A)	Chiapas (B)
Chiapas (A) (A2)	Durango (B)
Durango (A)	Guanajuato (B)
Guanajuato (A)	Jalisco (B)
Guerrero	Michoacán (B)
Jalisco (A1) (A2) (A3) (A4)	Nayarit (B)
Michoacán (A) (A2) (A5)	Oaxaca
Nayarit (A)	Puebla (B)
Puebla (A1) (A2) (A3) (A4)	Zacatecas (B)
Tabasco	Distrito Federal
Zacatecas (A) (A1)	Morelos
Coahuila (excepto La Laguna)	San Luis Potosí (B)
Colima	Querétaro
Chihuahua	Hidalgo (B)
Hidalgo (A) (A1) (A2)	México (B)
Nuevo León	Tlaxcala
San Luis Potosí (A1) (A2)	
Quintana Roo	
Sinaloa	
Sonora	
Tamaulipas	
Veracruz	
Yucatán	
Tierra Caliente (México, Guerrero y Michoacán)	

3.11. Situación internacional

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) ha reconocido 25 regiones de baja prevalencia de tuberculosis bovina, de las cuales 14 regiones pueden exportar con una sola prueba de tuberculina del lote, diez regiones con prueba de lote y prueba de hato de origen, y una región no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos.



Imagen 4. Clasificación de los estados de baja prevalencia de tuberculosis bovina.

<u>Estados o Regiones de origen</u>		<u>Clasificación de USDA</u>	<u>Requisitos de movilización para exportación a los EUA de bovinos castrados</u>
Norte de Sonora		Acreditado Modificado Avanzado	No requiere pruebas de tuberculina
Sur de Sonora	Puebla (A1, A2)	Acreditado Modificado	Requiere prueba de tuberculina al lote a movilizar

Baja California (A)	Quintana Roo		
Chihuahua (A)	Sinaloa		
Jalisco (A1)-Zacatecas (A)	Tamaulipas		
Nayarit (A)	Yucatán		
Nuevo León (A)	Veracruz (A)		
Coahuila (A)	Michoacán (A)	Acreditado Preparatorio	Requiere prueba de tuberculina al hato de origen y al lote a movilizar
Colima	Tabasco (A)		
Chiapas (A)	Guanajuato (A)		
Durango (A)	Aguascalientes (A)		
Guerrero (A)	Campeche (A)		
Aguascalientes (B)	Jalisco (A2, A3 y B)	No acreditado	Movilización para exportación solo a sacrificio inmediato
Baja California (B)	Nayarit (B)		
Baja California Sur	Nuevo León (B)		
Campeche (B)	México		
Chiapas (B)	Michoacán (B)		
Chihuahua (B1, B2,B3)	Morelos		
Coahuila (B1 y B2)	Oaxaca		
Coahuila (La Laguna)	Puebla (B)		
Distrito Federal	Querétaro		
Durango (La Laguna)	San Luis Potosí		
Guanajuato (B)	Tabasco (B)		
Guerrero (B)	Tlaxcala		
Hidalgo (B)	Veracruz (B)		
	Zacatecas (B)		
			25 de noviembre de 2010

3.11.1. Plan estratégico 2008-2012

Visión 2012

Al menos el 82% del territorio nacional tiene una prevalencia menor de 0.5% de Tuberculosis bovina, con el beneficio de mejorar la producción, favorecer la salud pública y continuar las exportaciones de bovinos a los Estados Unidos y a otros países.

3.11.2. Objetivos

- ✓ Ampliar en un 17% la superficie del país con una prevalencia de 0.5 % o menor.

- ✓ Se mantiene la exportación de ganado en cifras de al menos 1 millón de animales al año.

- ✓ Las zonas del país en las que no es factible de alcanzar el 0.5% de prevalencia y las zonas lecheras, se mantienen confinadas y bajo un programa de eliminación de la TB.

3.12. Estrategias

1. Financiamiento

Mediante el Programa Soporte 2008, se asignaron 433.1 millones de pesos para la campaña, despoblación de hatos infectados y movilización de ganado. Estas inversiones corresponden a las aportaciones de la Federación y los Gobiernos Estatales. Adicionalmente existen inversiones de los Productores. Se estima que estas inversiones se continuarán durante los próximos cinco años.

Tuberculosis Bovina 2008-2012

2. Regulación

Objetivos	Acciones Programadas	Avances
Actualizar la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina.	Publicación de las modificaciones a la Norma Oficial de la Campaña en agosto de 2008.	Se ha logrado un 70% de avance en la revisión de la NOM.

3. Organización

Reestructuración de la Dirección de Campañas Zoonosanitarias a nivel regional y estatal, que incluye el incremento de personal técnico, durante 2008

Creación a nivel nacional de un Comité Técnico de Planeación y Seguimiento de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina.

4. Capacitación

Objetivo	Acciones programadas	Avances
Establecer un sistema permanente de capacitación especializada.	Integración durante el año 2008 de un equipo de trabajo especializado en la planeación y gestión de la capacitación y entrenamiento de personal técnico y administrativo.	Se están preparando materiales para la capacitación en los siguientes temas: -Revisores Estatales. -Epidemiología -Inspección en rastros -Pruebas de tuberculina -Diagnóstico

5. Comunicación y Concertación

Objetivos	Acciones Programadas	Avances
Obtener mayor participación de todos los sectores involucrados con la Campaña.	Implementación de una campaña de comunicación sistemática y de alta cobertura. Concertación con las organizaciones de ganaderos a fin de obtener el apoyo en el avance de la Campaña, principalmente con los productores de leche y de ganado de registro.	Se está elaborando el programa de comunicación y difusión.

6. Investigación y Tecnología

Objetivos	Acciones Programadas	Avances
Contar con los elementos científicos y tecnológicos necesarios para mejorar las actividades de la Campaña	Realización de proyectos de estudios epidemiológicos regionales.	Se cuenta con un proyecto para el desarrollo de vacunas, integrado por investigadores de Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE), Instituto nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Programa Lechero (SAGARPA, 1995).

Objetivos	Acciones Programadas	Avances
Eliminación gradual de la Tuberculosis bovina y reducción de riesgos de difusión de zonas lecheras hacia las zonas con mayores avances en la Campaña.	Implementar a nivel nacional un Programa Especial para la Erradicación de la Tuberculosis bovina en ganado lechero	Ideas básicas: -Recursos especiales. -Confinamiento (compartimentación) -Infraestructura de puntos para el control de movilización, rastros, áreas de segregación y centros de recría. -Desarrollo de vacunas. -Fondos para despoblamiento y reposición

3.13. Tratamiento

Rara vez se trata a los animales infectados, porque además del peligro de contagio, resulta muy caro y prolongado y porque el gran objetivo último es erradicar la enfermedad. Los animales infectados se sacrifican.

Se recomienda tratar la infección por *M. bovis* con cuatro antituberculosos: Isoniacida, rifampicina, estreptomycin y etambutol, excluyendo la pirazinamida si se sospecha esta etiología. Es aconsejable la realización de estudios de sensibilidad con el objetivo de identificar la cepa, así como para excluir resistencias (Prat *et al.*, 2004).

La tuberculosis necesita un tratamiento con 3-4 diferentes drogas por un periodo de 6 meses lo cual lleva un costo considerable para un bovino con un peso de 400-500 kg. Todavía no hay una vacuna eficiente para prevenir la

tuberculosis bovina. Vacunación con el Bacilo Calmette Guérin (BCG) no mostró una protección importante. Además, la vacuna interfiere con la prueba de tuberculina induciendo reactividad causando así falsos positivos a esta prueba.

La estrategia básica para el control y la eliminación de la tuberculosis bovina es la tuberculización del rebaño y el sacrificio de los reactores positivos. Aquellos animales con reacciones positivas se identifican con un hierro en forma de T en la región mesentérica izquierda y se envían posteriormente bajo vigilancia al matadero en un periodo no mayor de 15 días. La vigilancia en el matadero y el seguimiento al rebaño de origen de animales tuberculosos, puede ser una estrategia alternativa en áreas donde un programa de tuberculización y sacrificio no está activo. Las medidas para prevenir la transmisión involucran también un control efectivo de movimiento de los animales.

Cuando se introducen animales nuevos en la finca, estos deben siempre tener una prueba de tuberculina reciente para descartar que no estén infectados.

Adicionalmente se deben aplicar medidas complementarias de desinfección y mejoramiento de las instalaciones, especialmente en las explotaciones bovinas con animales reaccionantes positivos en varias pruebas consecutivas (Suazo F. M *et al.*, 2003).

3.13. Péptidos antimicrobianos en la tuberculosis

Los péptidos antimicrobianos (PAM) en la tuberculosis son considerados como los antibióticos naturales y representan la estrategia más antigua, del sistema inmune innato; la mayoría son polipéptidos de alrededor de 100 aminoácidos, catiónicos, en el que su carga positiva al unirse con fuerza a los componentes aniónicos de la membrana lipídica de los microorganismos, causando un daño en su estructura ya sea mediante la formación de poros o la destrucción de la membrana celular. Los péptidos producidos por células eucarióticas pueden presentar actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiviral o antitumoral.

Los péptidos producidos por los mamíferos pueden estar presentes dentro de los gránulos de los neutrófilos, en las secreciones de las células epiteliales de la piel o mucosas o como productos de degradación de proteínas. En los neutrófilos se encuentran gran cantidad de proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana, como lisozima, lactoferrina, bacterenecinas, defensinas, indolicidinas, (Téllez *et al.*, 2010).

Dentro de los péptidos antimicrobianos destacan las defensinas que se subclasifican en α defensinas y las β defensinas.

Forman parte de las β defensinas las catelicidinas en humanos e indolicidina en vacas y se localizan en células epiteliales.

La indolicidina es un péptido de 13 aminoácidos que está presente en los gránulos citoplasmáticos de los neutrófilos bovinos. El mecanismo de acción de la indolicidina se observa al unirse en la superficie del lipopolisacárido con alta afinidad, resultando en un paso a través de la membrana externa autopromovido y una posterior formación de canales en la membrana citoplásmica que lleva a la muerte celular. La esterificación de la indolicidina en el terminal C aumenta la actividad antimicrobiana debido, a un aumento en la unión al lipopolisacárido y al aumento de la permeabilización de la membrana externa (Gutiérrez, 2010).

Los péptidos antimicrobianos se han identificado principalmente en zonas de los organismos que están expuestos al contacto de los patógenos. En los vertebrados se producen principalmente en la piel y el epitelio del tracto respiratorio, gastrointestinal y genitourinario, algunos son almacenados en vesículas y células fagocíticas móviles que pueden ser liberados en los sitios de infección.

Debido a que la mayoría posee actividad antimicrobiana de amplio espectro como la indolicidina de neutrófilos de bovino, la cual puede matar bacterias gram positivas como gran negativas, (Loeza, 2010).

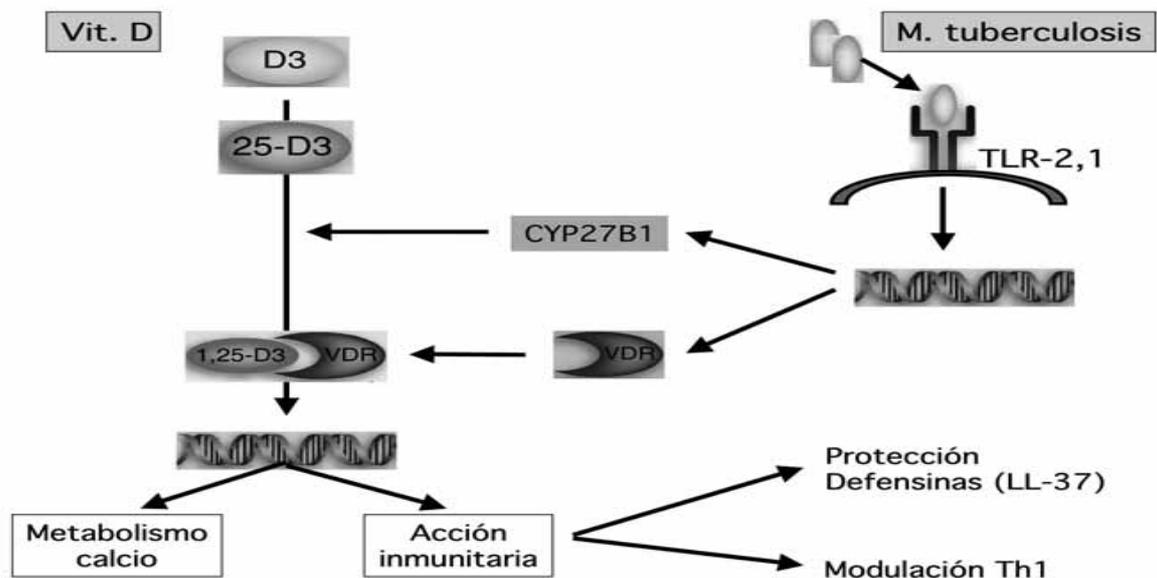


Imagen 5. La infección por *M. tuberculosis* a través de los receptores TLR 2-1.

La infección por *M. tuberculosis* a través de los receptores TLR 2-1 ocasiona la síntesis de la enzima (CYP27B1) que activa la Vit. D hidroxilando la molécula en el carbono. Además estimula la síntesis de receptor de Vit. D (VDR). El complejo formado por 1,25 D3 y su receptor se comporta como un factor nuclear que además de promover la síntesis de moléculas que participan en el metabolismo del calcio, también promueve la síntesis de múltiples moléculas que participan en el sistema inmune, como una defensina (LL-37) que facilita la destrucción intracelular de los *M. tuberculosis* fagocitados. Paralelamente se

ejerce una función moduladora de la respuesta Th1. Estas acciones se ha observadas en macrófagos.

El gen de la LL-37 tiene sitios de unión específicos para RVD apoyando la intervención de la Vit. D en su activación. Tras una infección tuberculosa y estimulación del TLR2/1, los monocitos sintetizan simultáneamente VDR, y CYP27B1, la enzima que hidroxila la D3-25OH convirtiéndola en su forma activa (D3-1,25OH). El VDR forma un complejo con la CYP27B1 que activa el promotor del gen del LL-37, un PAM que destruye *M.tuberculosis* situándose alrededor de las vacuolas celulares que los contienen (Quirós *et al.*, 2009).

3.14. Control

El futuro de la producción lechera y cárnica está condicionada a la calidad de los productos que puedan colocarse en el mercado interno o externo, para lo cual debe producirse leche y carne de calidad higiénica y sanitaria, por eso se destaca la importancia del control tuberculínico del ganado de abasto y de vacas lecheras con eliminación de los que resulten positivas a dicha prueba. La condición óptima es que sean enviados directamente al sacrificio inmediato los animales reactivos, de manera de impedir la diseminación de la infección hacia otras áreas (Rébak *et al*, 2005).

La prevalencia de tuberculosis en los sistemas de producción de pastoreo bajo condiciones extensivas, se ven afectados por contacto directo diariamente de comederos y corrales. La bacteria ingresa por vía digestiva, por el consumo de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, materia fecal y orina que contienen el agente causal (Rébak *et al*, 2005).

La tuberculosis bovina se puede controlar mediante métodos de prueba y sacrificio (Cousins, 2001).

La introducción de animales es el principal factor de riesgo para la presencia de Tuberculosis bovina. El bovino infectado es el principal reservorio y fuente de contagio y su traslado puede introducir la enfermedad en poblaciones libres de la misma. Es muy importante el control del estado sanitario con respecto a tuberculosis, de los bovinos ingresados para reposición de vacas. Asimismo, se concluye que realizar la recría de vaquillonas fuera de la unidad productiva aumenta el riesgo de presentar la enfermedad (Marangon *et al*, 1998).

La TB puede ser combatida eficientemente a través de programas de control y erradicación. Estos se basan en la aplicación de la prueba de tuberculina a todo el hato en forma repetida (cada 60 - 90 días), en la eliminación de los reactivos y en una adecuada vigilancia epidemiológica (VE). Los animales reactivos a la tuberculina deberán ser eliminados del hato destinándose a sacrificio en forma inmediata para evitar la diseminación a otros bovinos. La segregación de reactivos dentro del establecimiento o en hatos sanitarios por un período intermedio hasta su eliminación es una alternativa que permite paliar el efecto económico negativo que implica su descarte (Abdala, 1998).

La prevención de la infección por *M. bovis* en el hombre siempre estará sujeta a una eficiente inspección en frigoríficos, a la pasteurización de la leche y a la vacunación con BCG (Bacilo de Calmette Guérin). Esta vacuna no es utilizada en bovinos, debido a que no previene completamente la infección y el ganado reaccionaría a la prueba de tuberculina, no pudiéndose entonces distinguir entre infectados y vacunados.

La inspección veterinaria en mataderos y frigoríficos es una herramienta importante para la VE de esta enfermedad. La detección diaria de lesiones en la faena permite determinar prevalencias actualizadas de cuencas lecheras y áreas de crías bovinas. El conocimiento de la identidad de los bovinos con lesiones permite localizar sus rodeos de origen y de esta manera iniciar medidas de control en ellos (Abdala, 1998).

3.14.1. Control en explotaciones lecheras

Las región que se caracterizan por tener un mayor número de explotaciones lecheras con alta concentración animal, se presume que la prevalencia es más alta que en otras regiones.

Las plantas lecheras se les debe introducir una bonificación en el precio a aquellos predios que certifiquen estar libres de tuberculosis y brucelosis. Este hecho conlleva una inmediata reacción de muchos productores para iniciar un programa de control y saneamiento de la enfermedad en sus predios.

Las estrategias a utilizar son las siguientes:

- ✓ Educación del Propietario y sus Trabajadores.
Es fundamental que tanto el propietario y los trabajadores conozcan nociones básicas de la enfermedad y sus vías de contagio. De esta forma, pueden internalizar la situación y tener un mejor criterio para adoptar, por parte de todos los actores, mejores medidas profilácticas. El comprender el “por qué” ocurren las cosas facilita el “cómo” solucionarlas y evita errores. Es procedente la elaboración de un Manual de Control de Puntos Críticos, por parte del médico veterinario asesor.
- ✓ Adecuación de Infraestructura.
Es necesario invertir en construcciones de nuevos establos o salas de ordeña; en otras oportunidades será necesario adecuar las instalaciones existentes con simples separaciones o divisiones de las construcciones o habilitar otras no utilizadas que permitan separar o segregar el ganado positivo del negativo.

- ✓ **Determinación del Sistema Diagnóstico.**
Existen diversas pruebas que permiten diagnosticar la tuberculosis bovina. Están aquellas pruebas masivas de rebaño y aquellas confirmatorias al nivel de matadero y laboratorio.
- ✓ Como procedimiento diagnóstico de campo está la tuberculinización, la cual puede consistir en la Prueba Cervical Simple (PCS) y la Prueba del Pliegue Caudal (PPC). Cualquier respuesta a la prueba caudal se considera como reactor.
- ✓ La prueba confirmatoria al nivel de matadero consiste en la observación en la canal de nódulos linfáticos con presencia de granulomas.
Otros sistemas diagnósticos confirmatorios al nivel de laboratorio son: Histopatología que consiste en detectar el *Mycobacterium* por tinción; Cultivo del *M. bovis*, y PCR (reacción en cadena de la polimerasa).
- ✓ **Detección y Remoción de Animales Infeccionados.**
Antes de iniciar los exámenes diagnósticos, poseer un eficiente sistema de identificación de cada uno de los animales del predio, incluido los machos.
- ✓ La PCS es más sensible pero menos específica, es decir, podemos detectar más falsos positivos, es decir, animales no enfermos que reaccionan positivamente debido a la existencia de inmunidad cruzada por similitudes antigénicas con *Mycobacterium saprofitos*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium avium*. En base a las últimas experiencias, se ha demostrado que la PPC es un procedimiento diagnóstico que, a nivel de masa, es bastante eficiente, si bien en predios de alta prevalencia tiende a perder sensibilidad, es decir, da más falsos negativos por anergia.

Prevención de la Diseminación de la Infección.

Teniendo decidido el método de diagnóstico y ya conocida la situación de prevalencia del rebaño, se deben tomar medidas que prevengan la diseminación de la infección. Se pueden señalar las siguientes:

- ✓ Aislamiento y rápida remoción de animales viejos.
- ✓ Aislamiento o venta de animales jóvenes positivos.
- ✓ Protección de terneras, vaquillas y novillos de la exposición a animales viejos y/o reactores.
- ✓ Estudiar manejo separado de vacas jóvenes y negativas de aquellas viejas y reaccionantes, mientras transcurra el plazo para la eliminación.
- ✓ Eliminación de toros y bueyes infectados que pueden ser muy eficientes en la diseminación de la enfermedad.

- ✓ Al efectuar la separación de los rebaños se debe considerar la dirección de los vientos predominantes, la distancia de los rebaños, pues este hecho puede ser un factor importante de contagio.
- ✓ Lavado de los comederos de la sala de ordeña.
- ✓ No dar calostro ni leche de vacas positivas o de vacas viejas negativas a terneros salvo pasteurización y suministrar sustitutos lácteos a los terneros bajo crianza

En predios de alta prevalencia, ante el mayor riesgo de vacas anérgicas, es recomendable el uso de sustituto lácteo.

- ✓ Diagnóstico frecuente, cada 60 días, a la masa negativa. Sirve para chequear si las medidas de control aplicadas están dando los resultados esperados.
- ✓ Vigilancia Activa en Mataderos: este es un factor fundamental. Es muy probable que dentro de un rebaño positivo existan uno más vacas enfermas anérgicas. Normalmente, aunque no siempre, son las vacas más viejas las mejores diseminadoras de la infección. Es por esto que se transforma en un imperativo, cuando haya eliminación natural en el predio, enviar vacas negativas a matadero; en esta circunstancia, el médico veterinario asesor debe efectuar el seguimiento de este animal contactándose con el veterinario inspector del matadero para realizar un análisis exhaustivo de la canal y, ante la presencia de cualquier sospecha de lesión tuberculosa, debe confirmarse con exámenes de laboratorio (histopatología, cultivo, PCR).
- ✓ Todos los efluentes de la lechería deben ir por conductos cerrados a cámaras. En ningún caso deben ser vaciados a potrero.

Evitar la Introducción de la Enfermedad.

En un predio negativo, ya sea históricamente o porque lo ha sido hace poco, es fundamental tomar las siguientes precauciones para evitar introducir o reintroducir la tuberculosis:

- ✓ Manejar las vaquillas de reemplazo como grupos de edad separadas del rebaño adulto.
- ✓ En caso de efectuar compras de reemplazo hacerlo de rebaños negativos de por lo menos un año antes.
- ✓ Procurar, en caso que el rebaño del vendedor sea un negativo reciente, que el último examen no tenga más de 60 días.
- ✓ Mantener la Vigilancia Activa en Mataderos de animales viejos.
- ✓ Mantener control de la enfermedad en humanos. Las personas infectadas con *M. bovis* pueden diseminar la enfermedad al ganado;

- aquellas personas con *M. tuberculosis* pueden provocar reacciones positivas en el rebaño. El ganado joven está especialmente en riesgo.
- ✓ En rebaños infectados, todas las personas que trabajan con el ganado o que están expuestas a él, deben realizarse pruebas diagnósticas. Los niños que beben leche cruda procedente de vacas tuberculosas están en riesgo de desarrollar enfermedad severa.
 - ✓ Animales de otras especies como los perros y especialmente los gatos pueden contraer la infección por *M. bovis*. Prevenir que no tengan acceso a las instalaciones de alojamiento del ganado. Los cerdos contraen fácilmente *M. bovis*.
 - ✓ Analizar la situación en predios vecinos. Si los hay infectados buscar la forma que los animales no se contacten a través de los cercos limítrofes; esto significa, posiblemente, dejar los potreros colindantes con los del vecino sólo para cultivos o empastadas para forrajes de guarda.
 - ✓ Uno de los aspectos que aún no se ha estudiado es el efecto de los Purines como reservorio y fuente de contagio dentro de los predios, en cuanto darían, en principio, todas las condiciones para la supervivencia del *M bovis* (ambiente ácido y húmedo y baja temperatura especialmente en invierno) (Vigneaux *et al.*, 2003).

3.15. Limpieza, desinfección y esterilización. Antisépticos y desinfectantes

Un aspecto importante del control de las infecciones son los principios que rigen la limpieza, desinfección y esterilización. Evitan la transmisión de microorganismos potencialmente patógenos, ya sea entre enfermos, del personal sanitario a aquéllos o a la inversa, debe considerarse como una prioridad en todos los centros sanitarios.

Algunas medidas precautorias para adoptar en establecimientos afectados son el uso de desinfectantes fenolados en la limpieza de tambos, corrales y otras instalaciones ya que *Mycobacterium* es sensible a los desinfectantes a base de fenoles y resistentes a los desinfectantes solubles en el agua y al medio ambiente.

Formaldehído (formalina o formol)

Se utiliza como desinfectante de alto nivel en estado líquido y gaseoso. Principalmente se utiliza en solución acuosa (formaldehído al 37%); en estas condiciones posee actividad bactericida, fungicida, viricida, tuberculicida y esporicida. su actividad aumenta con la temperatura y la humedad relativa (combinación de formaldehído gas con vapor a 70-75°C). Su acción es lenta y en solución acuosa al 8% requiere un tiempo de exposición de 24 h, mientras que en solución alcohólica a esta misma concentración la actividad aumenta y el tiempo requerido es de 3 h. Es corrosivo y potencialmente carcinógeno. Debe ser manipulado con guantes y mascarilla. Nunca ha de ser utilizado para

la

desinfección

ambiental.

Compuestos clorados

El más utilizado es el hipoclorito de sodio. Útil en la limpieza de suelos así como sillas de transporte. Se requiere a una concentración del 5%, por lo que debe ser diluida a una proporción de 1:10 con agua para limpiar una superficie manchada por sangre o secreciones y de 1:25 para la limpieza rutinaria. Tiene efecto bactericida sobre *Mycobacterium tuberculosis*.

Oxidantes

Ácido peracético (ácido peroxiacético). El ácido peracético a concentraciones de 0,01-0,2% tiene una acción rápida frente a todos los organismos, incluyendo las micobacterias y las esporas bacterianas. Permanece activo en presencia de materia orgánica. Es un desinfectante corrosivo.

Tuberculicida: mata *Mycobacterium tuberculosis*, que es generalmente mucho más difícil de matarla que la mayoría de bacterias. Derechos de etiqueta para actividad tuberculicida requiere protocolos de pruebas específicas en la Agencia de Protección Ambiental (EPA) (Webste, 2002).

3.15.1. Diagnóstico

El diagnóstico se puede realizar por métodos directos e indirectos. Los primeros se basan en la determinación de la presencia del agente o en las lesiones típicas que produce en los tejidos afectados y comprenden: aislamiento bacteriológico, histopatología, baciloscopia (visualización del *M. Bovis* a través de la coloración de Ziehl-Nielsen) y la detección de ADN a través de la técnica de reacción de cadena de polimerasa (PCR).

El aislamiento bacteriológico es lento y dificultoso, la histopatología se realiza sobre tejidos de animales muertos, mientras que la PCR es de alta confiabilidad pero de elevado costo. La baciloscopia y el aislamiento no siempre logran detectar el *M. bovis* y en el caso de esta última, el cultivo demanda un mínimo de 60 días (Abdala, 1998).

Métodos indirectos son: la tuberculinización, detección de gamma interferón y detección de Ig G por enzima. - inmunoensayo (ELISA). Todos ellos evalúan la respuesta inmunitaria que produce el agente infeccioso en el huésped. Los dos primeros evalúan la respuesta de base celular (linfocitos T y macrófagos), mientras que el ELISA mide la inmunidad de tipo humoral (anticuerpos). Estas técnicas son más prácticas y se adecuan al diagnóstico en rodeos. No obstante, tienen un margen de error que no les permite detectar el 100 % de

los animales enfermos ni el 100 % de los animales sanos, pudiéndose observar un porcentaje variable de reacciones falso negativas y falso positivas respectivamente. La tuberculina tiene el inconveniente de tener que revisar al animal a las 72 hs. De la inoculación, mientras que las otras se basan en un muestreo sanguíneo, pero requieren de laboratorios especializados.

El diagnóstico también se puede establecer en base a la clínica, epidemiología, observación directa de bacilos ácido alcohol resistentes en muestras del lugar de infección y aislamiento de la Mycobacteria en cultivo. Las pruebas bioquímicas, muy laboriosas, no se realizan en la mayoría de laboratorios. La distinción es importante al tener en cuenta que *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida, usada frecuentemente en los regímenes terapéuticos (SENASA, 2000).

3.15.2. Prueba intradérmica de la Tuberculina (PPD)

El diagnóstico de la tuberculosis bovina se basa en la prueba intradérmica de la tuberculina (PPD). Esta prueba ha sido la base de todos los esquemas de erradicación de la tuberculosis que incluyen la detección y el ulterior sacrificio de los animales infectados (Tizard, 2002).

La campaña utiliza la prueba intradérmica con derivado proteínico purificado (PPD) o tuberculina. Cuando se requiere mayor sensibilidad, como en casos de alta prevalencia, se aplica en el pliegue caudal y para el caso de requerir mayor especificidad (baja prevalencia), se utiliza la doble comparativa en el cuello.

La simple caudal tiene sensibilidad de 72% al 91% y especificidad del 78% al 96%. Esta prueba, es el principal método que se utiliza en México para identificar la exposición a *M. tuberculosis*. Los diagnósticos falsos positivos generan problemas económicos y sociales, ya que conforme a la Norma Oficial Mexicana, los animales reactores positivos a la prueba se deben sacrificar (Estrada *et al.*, 2004).

El Plan Nacional de Control y Erradicación de Tuberculosis Bovina (PNCETB) reconoce como única técnica oficial para el diagnóstico a la tuberculina realizada con (PPD). La técnica consiste en la inyección intradérmica de 0,1 ml de PPD bovina (1,0 mg/ml de concentración) en el tercio medio del pliegue ano caudal del bovino. La lectura se efectúa a las 72 hs después de la inyección, observando el engrosamiento de la piel. Si este es de 5 mm o superior la prueba es positiva. Se considera sospechoso cuando es de 3 a 4 mm y negativa cuando es menor a 3 mm.

Otra variante de la tuberculosis es la prueba cervical simple que tiene una sensibilidad superior a la del pliegue ano-caudal. Se utiliza con el fin de obtener

una mayor seguridad en la eliminación de bovinos infectados, cuando estos pertenecen a rodeos en los que ya se ha comprobado la enfermedad. El lugar de aplicación es en el tercio medio del cuello, previa depilación de una superficie de 5 o 6 cm², se mide el grosor de la piel en esa zona con un calibre, se desinfecta y se inocula intradérmicamente una dosis de 0,1 ml de tuberculina PPD bovina (1,0 mg/ml de concentración) y se lee a las 72 hs midiendo con calibre nuevamente el grosor de la piel. En este caso todo aumento de 3 mm de espesor es positivo, no existiendo la categoría de sospechoso.

Estas pruebas de tuberculinas no se pueden realizar antes de los 60 días entre una y otra, debido a que el animal se desensibiliza a la PPD. Situaciones semejantes pueden ocurrir con vacas posparto (hasta seis semanas posteriores), animales viejos, infecciones recientes y casos de infección muy avanzados (Abdala, 1998).

La prueba no permite diferenciar entre infección, enfermedad y sensibilización con micobacterias no tuberculosas debido a que el PPD es una mezcla cruda de antígenos, muchos de los cuales son conservados y forman parte de la estructura antigénica de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, BCG, no obstante en muchas regiones del mundo es el único método disponible para el diagnóstico de TBL (Huebner *et al.*, 1993).

Finalmente es necesario recordar que los animales reactores positivos a la prueba de tuberculina pueden haber sido falsos positivos por una reacción inespecífica a infecciones anteriores por *M. bovis*, *M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. paratuberculosis* o *Nocardia farcinicus* (Blaha, 1995; Radostits *et al.*, 2002). Los reactores positivos pueden haber sido infectados también por sus propietarios con *M. tuberculosis* o por los otros agentes mencionados anteriormente que se encuentran en el medio ambiente (Blaha, 1995).

3.15.3. ELISA

El ELISA puede utilizarse en forma complementaria a la tuberculina, pudiendo detectar los animales con lesiones tuberculosas extensas, que se comportan como anérgicos ante esta última prueba.

Una prueba de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA) examina los anticuerpos para definir los antígenos de *M. bovis* antes y después de la prueba dérmica puede ser muy útil para detectar animales con reacción positiva inespecífica (Radostits *et al.*, 2002).

3.15.4. Los ensayos de liberación de interferón gamma

Estas pruebas de diagnóstico tienen mayor especificidad, especialmente en población vacunada con BCG. Diversos estudios han demostrado que el QuantiFERON-TB no presenta interferencia por la vacunación con BCG y puede diferenciar la infección con *M. tuberculosis* de la sensibilización (Balanza, P. A. 2004).

3.15.5. Identificación Bioquímica

Se utilizan diversas pruebas bioquímicas para distinguir *M. bovis*. Las pruebas de producción de niacina y de reducción de nitratos son negativas en *M. bovis*, pero el resto de características bioquímicas son indistinguibles: produce catalasa termosensible (positiva a temperatura ambiente e inactivada a 68°C) y la tolerancia a la sal es negativa. El crecimiento en medio Löwenstein-Jensen es pobre en presencia de glicerol, y mejor en presencia de piruvato. El medio BACTEC (Becton Dickinson) no contiene glicerol, por lo que favorece el crecimiento de *M. bovis*. El crecimiento de *M. bovis* es inhibido por la TCH (hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico) a una concentración de 5 µg/ml. *Mycobacterium bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida, como fármaco antituberculoso de primera línea, y una actividad pirazinamidásica defectiva y también, se han descrito cepas de *M. bovis* sensibles a la pirazinamida.

Se puede diferenciar de *M. africanum* por la resistencia a la pirazinamida. La cepa BCG de *M. bovis* presenta, además, resistencia a la cicloserina, fármaco antituberculoso de segunda línea, así como una fuerte actividad ureásica.

Los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales son a menudo ambiguos, difíciles de reproducir y, en cualquier caso, el tiempo requerido para su realización es largo, dado que se requiere un crecimiento abundante (Niemann, *et al.*, 2000).

3.15.6. Inspección *post mortem* (IP)

Para confirmar la infección se realiza una inspección *post mortem* (IP) y se buscan lesiones sugestivas de TB. Las lesiones tuberculosas encontradas en la IP se presentan principalmente en nódulos linfáticos (NL) asociados al tracto respiratorio. La IP se considera un método práctico, si se utiliza conjuntamente con la histopatología, para identificar lesiones compatibles con presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes a la tinción de Ziehl-Neelsen. Para el diagnóstico definitivo se envían muestras de estas lesiones al laboratorio de bacteriología. Sin embargo, el diagnóstico de TB mediante el cultivo de *M. bovis* representa una verdadera barrera de tiempo, dinero y esfuerzo. Debido a

los problemas asociados al aislamiento de esta *Mycobacteria* (Estrada *et al.*, 2004).

3.15.7. Inspección post mortem, histopatología y bacteriología

Los animales se someten a una Inspección post mortem, se examinan los nódulos linfáticos (NL): traqueobronquiales, mediastínicos, retrofaríngeos, submandibulares, mesentéricos, hepáticos, preescapulares, prefemorales, iliacos y supramamarios, así como pulmones, hígado y bazo. Cada uno de los órganos es revisado y sometido a un examen macroscópico exhaustivo, realizando cortes para tratar de evidenciar lesiones. Se colectan muestras para histopatología y bacteriología, independientemente de la presencia o no de lesiones se procesan conforme a lo establecido. Las muestras para histopatología se fijan en solución de formaldehído al 10% en PBS y se incluyen en parafina. Los cortes histológicos se tiñen con hematoxilina-eosina (HE) y Ziehl-Neelsen (ZN). Las preparaciones se examinan para detectar lesiones sugestivas de TB y la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, para identificar lesiones compatibles con TB. Las muestras maceradas de manera independiente, en morteros con 5 ml de PBS, con rojo de phenol como indicador de pH, digeridas y descontaminadas con 0.5 N de NaOH, neutralizadas con 6 N de HCL y centrifugadas a $3\ 500 \times g$ por 20 min. El sedimento de todas las muestras de tejidos procesados se cultivan a 37°C en medios para primoaislamiento: Stonebrink's suplementado con piruvato, Middlebrooks 7H11, y Herrold's con yema de huevo o Lowenstein Jensen. Posteriormente las colonias obtenidas se resembran en medio Proskauer- Beck con 5% de suero equino para realizar pruebas bioquímicas e identificar género y especie. Los cultivos sin crecimiento después de tres meses se consideraron negativos (Estrada *et al.*, 2004).

3.15.8. PCR

Existen hoy en día técnicas basadas en la biología molecular que han demostrado su eficacia en la caracterización molecular de cepas, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis*. La PCR es la técnica de amplificación de ácido nucleico micobacterianos. Con ella se puede conseguir amplificaciones de secuencias específicas de ADN, a partir de los oligonucleótidos deseados, los iniciadores, a los que se van uniendo nucleótidos merced a la enzima polimerasa, hasta conseguir cadenas de longitud detectable (Balanza, 2004).

La identificación de la expresión genética y de secuencias específicas de ADN o ARN es un factor crucial cuando se trabaja con técnicas de biología molecular. Siendo la PCR una de las más usadas (Vinueza, 2009). Su instrumentación es altamente sensible y específica para confirmar el diagnóstico de TB, permite obtener resultados en pocas horas, en comparación con el cultivo que requiere usualmente meses (Estrada, *et al.*, 2004).

Debido a los problemas asociados al aislamiento de esta *Mycobacteria*, se ha considerado confirmar el diagnóstico de TB mediante la reacción en cadena de

la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de ADN en el genoma de bacterias del complejo *M. tuberculosis*. La PCR para el gen que codifica la proteína MPB70 ha mostrado buena sensibilidad y excelente especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y bovinos. Se ha demostrado presencia de una sola copia de este gen en cepas de *M. bovis* y bacterias del complejo *M. tuberculosis*, así como su ausencia en 24 especies diferentes de micobacterias y en otros géneros bacterianos (Estrada *et al.*, 2004).

Por sus siglas en ingles de *Polymerase Chain Reaction* o Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR). La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas, ya que proviene de la bacteria *Thermus aquaticus* que vive a altas temperaturas (79oC a 85oC), de ahí su nombre comercial más conocido: *taq* polimerasa. Al hacer una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN y en el tubo se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el ADN del organismo que se quiere estudiar –donde se encuentra el fragmento se quiere sintetizar, los oligonucleotidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, oligos. necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleotidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa) (Eguiarte *et al.*, 2007).

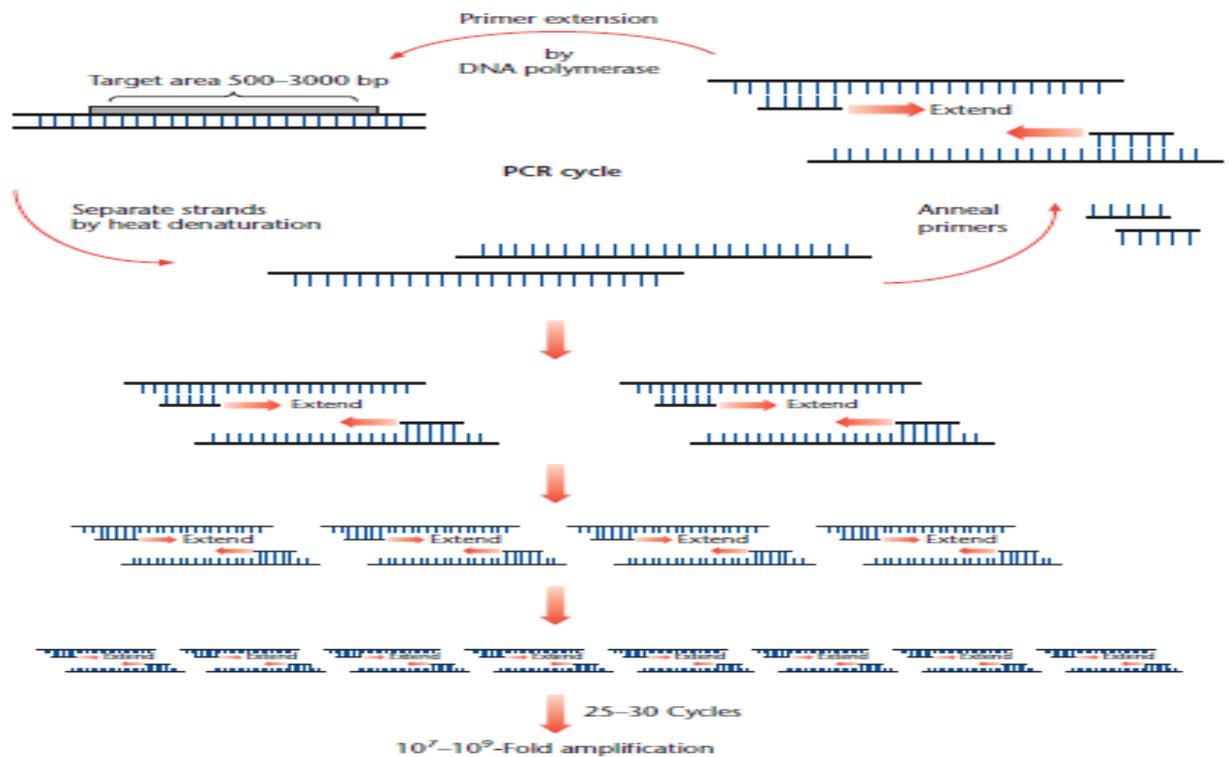


Fig.6. Ciclo de amplificación de PCR (Metzker y Caskey, 2009).

Esta técnica tiene muchísimas aplicaciones distintas y se ha convertido en una herramienta muy importante en la biología molecular; sus aplicaciones van desde la genética de poblaciones, evolución molecular y genómica hasta la medicina forense (Eguiarte *et al.*, 2007).

3.15.9. Electroforesis

Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, fue empleado por primera vez por Tiselius en el año 1937 (García, 2000).

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleico) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos.

Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas (Nelson).

La velocidad de migración (v) de la partícula es directamente proporcional al producto de su carga efectiva (q) y el gradiente de potencial eléctrico (E) e inversamente proporcional al coeficiente de fricción (f) relativo a la talla y forma de la molécula, o sea, a la resistencia que le ofrece el medio.

$$V = q E / f$$

Existen muchos tipos de electroforesis, que se engloban en dos categorías fundamentales:

- ✚ Electroforesis de frente móvil.

- ✚ Electroforesis de zona.

Electroforesis de zona

Métodos electroforéticos zonales son útiles para lograr la separación de componentes de mezclas complejas. Se aplican pequeñas cantidades de la disolución de proteínas a un soporte sólido, que se impregna con una solución de tampón. Los soportes son en general polímeros y forman un gel poroso que restringe el movimiento de las moléculas a través del medio durante la electroforesis y disminuyen los flujos de convección del solvente. Como soportes han sido utilizados papel (celulosa), almidón, poliacrilamida, agarosa, acetato de celulosa, etcétera. Este método tiene gran poder resolutivo porque

se aplica una cantidad pequeña de proteína a una zona estrecha, mientras que la longitud del trayecto es mucho mayor que la zona de aplicación. El equipamiento requerido es simple (fuente de poder y cubeta vertical u horizontal donde se coloca el soporte y 2 electrodos) (Stryer, 2003).

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular (Valls *et al.*, 2001).

Temperatura durante la polimerización y la corrida del gel

La movilidad de las proteínas varía entre otras causas porque la viscosidad del agua aumenta a bajas temperaturas (la distancia recorrida es aproximadamente 20 % mayor en la región central que es más caliente). Este efecto puede atenuarse con el empleo de un tampón más diluido o manteniendo temperaturas bajas durante el desarrollo de la electroforesis.

Tiempo de corrida

La determinación del tiempo adecuado de corrida es muy importante, pues corridas muy cortas impiden que las muestras avancen el espacio necesario para su correcta separación, pero también se ha probado que tiempos de corrida cortos minimizan la dispersión de la muestra y el ensanchamiento de la banda.

Tinción

Una rápida tinción, destinción y fijación son esenciales en el caso de las proteínas pequeñas para evitar su elusión; la omisión del metanol de la solución de tinción es beneficiosa ya que se reduce el tiempo de tinción y disminuye el hinchamiento de los geles (García, 2000).

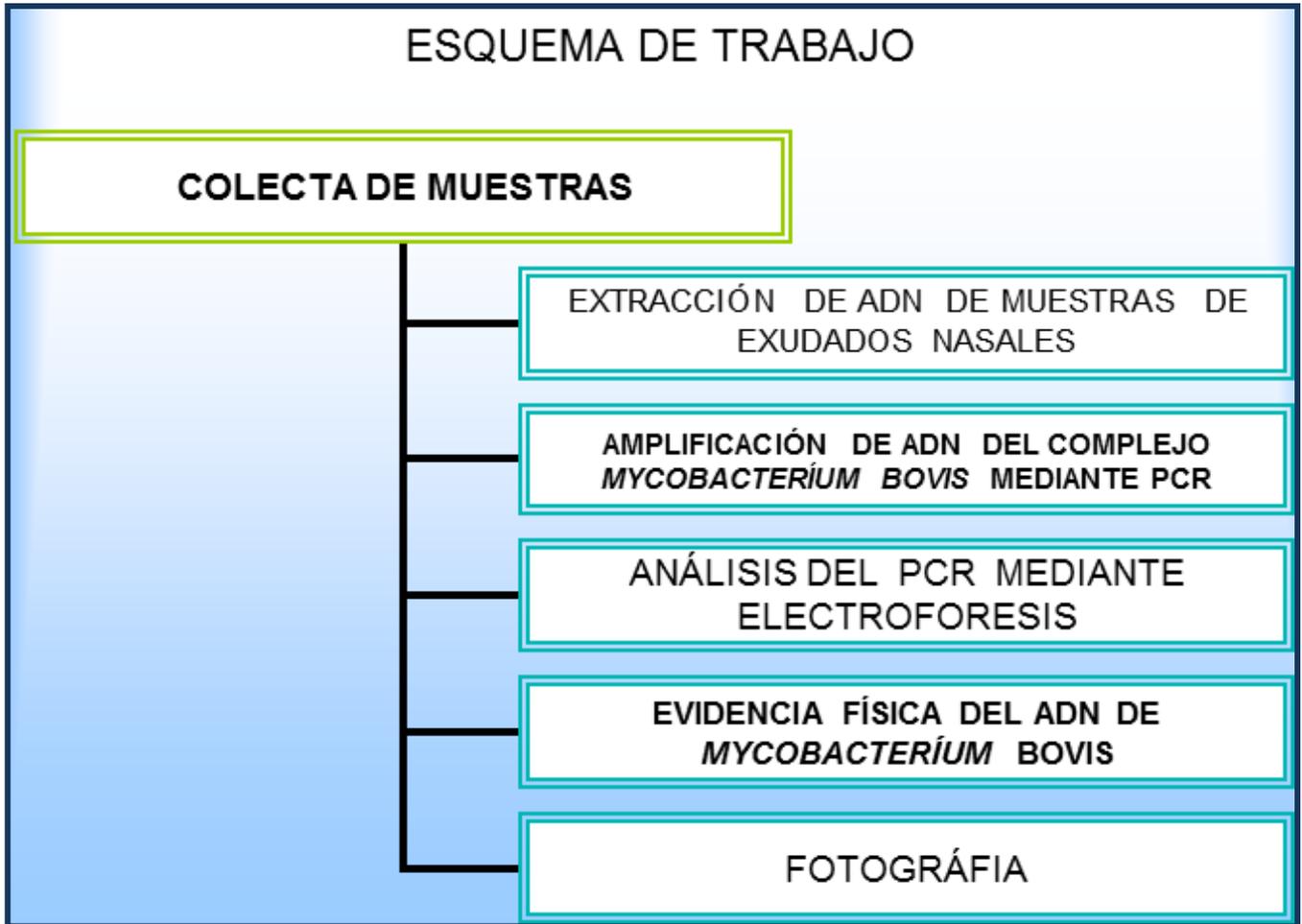


Fig. 7. Esquema de trabajo.

La investigación se realizó en las instalaciones de la Dr. Clara Inés Espitia Pinzón, del departamento de Inmunología del Instituto Biomédicas de la Universidad Autónoma de México.

4. Localización geográfica de la Comarca Lagunera

El presente estudio se realizó en la Comarca Lagunera ($101^{\circ} 40'$ y $104^{\circ}45'$ de longitud Oeste y los paralelos $25^{\circ} 05'$ y $26^{\circ} 54'$ de latitud Norte), que está situada en la parte suroeste del Estado de Coahuila y al noreste del estado de Durango. La altitud varía de 1100 a 1400 metros sobre el nivel del mar.

Cuenta con una superficie de 64, 785.7 Km². El clima es muy seco, la temperatura anual promedio es de 21°C , con temperatura extrema de 40°C a la sombra en verano y de -3°C a la intemperie en invierno. Los vientos dominantes proceden del Este, la precipitación anual promedio es de 235 mm y las lluvias se presentan durante los meses de julio a octubre; la evaporación anual promedio de 2366.1 mm (Schmidt, 1989).

El muestreo está dirigido a unas de las unidades productivas de la Comarca Lagunera en Torreón Coahuila, con antecedentes de ganado Holstein positivo a tuberculosis. Para ello, se recolectaron muestras de exudado nasal (Aguirre, 1981).

Reactivos para la extracción del DNA genómico *Micobacteriano*.

REACTIVO:	COMPONENTES/PREPARACIÓN:	ALMACENADO:
<p>TE (Tris-EDTA) <u>10:1</u></p>	<p>Tris=10mM/1000=0.01 FD X 100ml = <u>1ml</u> de Tris</p> <p>Pesar 12.114 g de Tris, disolverlo en una porción de 80ml de agua desionizada, ajustar el pH con HCl, una vez conseguido el pH, aforar a 100ml.</p> <p>EDTA=1mM/500m M=0.002 FD x 100ml = <u>0.2ml</u> de EDTA</p> <p>Pesar 18.61g de EDTA, una vez ya ajustado el pH de 8.0 en 80ml de agua, añadir los 18.61g EDTA y mezclar hasta aforar los 100ml.</p> <p>Para la solución de TE (Tris-EDTA) 10:1, añadir en una probeta 80ml de agua, agregar 1ml de Tris-HCl pH 8.0 con 1M más 0.2ml de EDTA pH 8.0 con 0.5M, después adicionar agua para aforar a 100ml de TE.</p>	<p>Temperatura ambiente (23°C - 25°C)</p>
<p>Lisozima</p>	<p>Pesar 100mg de lisozima + agua hasta obtener 10ml.</p>	<p>Hacer alícuotas y almacenar a -20°C</p>
<p>SDS</p>	<p>Pesar 10g de SDS y agregar en una probeta 80ml de agua, después añadir el resto del agua para aforar hasta 100ml.</p>	<p>(23°C - 25°C)</p>

Proteinasa k	Pesar 10mg de proteína K y añadir en una probeta 5ml de agua, ya integrada la proteína aforar a 10ml.	Hacer alícuotas y almacenar a -20°C
NaCl	Pesar 29.2g de NaCl y añadir en una probeta 80ml de agua, una vez integrada esta, se afora a 100ml de agua.	(23°C - 25°C)
CTAB/ NaCl	En una probeta con 80ml de agua, añadir 10g de CTAB + 4g de NaCl después aforar a 100ml.	(23°C - 25°C)
Cloroformo: Alcohol Isoamílico; 24:1	Para prepara 25ml de cloroformo: Alcohol Isoamílico; 24:1 se necesita 24ml de Alcohol y 1ml Isoamílico y para preparar 100ml se necesita 96ml de Alcohol + 4ml Isoamílico.	(23°C - 25°C)
Isopropanol	_____	(23°C - 25°C)
Etanol 70%	Tomar 73ml de etanol al 96% en una probeta y aforar con agua a 100ml.	(23°C - 25°C)

Fig.8 Reactivos para la extracción del DNA.

4.1. Extracción del DNA genómico *Micobacteriano* a partir de muestras de exudados nasales

- ✚ Una vez entrampada la vaca, introducir un hisopo estéril en el ollar del animal, después transferir el hisopo con el exudado en un tubo de ensayo que debe contener 2ml de PBS. Las muestras se deben mantener en hielo durante el transporte al laboratorio para su análisis.
- ✚ Se extraen los hisopos de los tubos con muestras, después se transfieren los tubos para centrifugar a 12, 000 xg durante 10 minutos. Una vez ya centrifugadas las muestras se elimina la fase líquida. El botón formado se homogeniza en 400 µl de buffer TE (de esta forma se puede almacenar a -20°C hasta su procesamiento).

- ✚ Adicionarle 50 μ l de lisozima a una concentración de 10 mg/ml; luego homogenizar y se Incuba al menos 2 horas a 37 °C (Preferible toda la noche).
- ✚ Posteriormente se le añade 75 μ l de SDS al 10% + 50 μ l de proteinasa k (1mg/ml) se agita ligeramente para luego Incubar a 65°C durante 20min.
- ✚ (Antes de añadir el SDS se puede iniciar el precalentamiento de solución CTAB a 65°C para que se disuelva fácilmente y a la vez dejar listo el termomixer para la incubación con la proteinasa k).
- ✚ Añadir a cada muestra, 100 μ l de NaCl 5M y mezclar suavemente.
- ✚ Posteriormente añadir 100 μ l de la solución CTAB/ NaCl, precalentada, vortexear hasta quedar blanca la solución. Después Incubar a 65°C por 10 min.
- ✚ Posteriormente añadir 750 μ l de cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1), mezclar por inversión después centrifugar los tubos durante 5 min a 12, 000 xg a temperatura ambiente.
- ✚ Transferir la fase acuosa (superior) del tubo ya centrifugado a un tubo nuevo. Repetir la extracción del ADN con 1ml de cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1).
- ✚ Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo y añadir 0.7 volúmenes de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos. Mezclar suavemente por inversión. Colocarlos en una incubadora durante 30 minutos a -20°C (o toda la noche).
- ✚ Centrifugar los tubos a 10, 000 xg por 15min a temperatura ambiente. Desechar el sobrenadante, después agregar 1ml de etanol al 70% frío, mezclarlo manualmente por inversión para lavar el ADN.
- ✚ Centrifugar 5min a 10, 000 xg a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante secando bien el tubo.
- ✚ Dejar secar la pastilla al aire 10min a temperatura ambiente sin que se sobre seque.
- ✚ Finalmente para hidratar disolver la pastilla de DNA en 50 μ l de agua grado biología molecular y almacenar hasta su uso.

5. PCR SIMPLE

Se realiza la amplificación del producto 372 pb del gen mpb70 del *Mycobacterium* con los siguientes iniciadores:

mpb70 F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3')
mpb70 R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3').

REACTIVOS	Concentración final	Volumen (µl) para una reacción de PCR
Agua		
Buffer	1X	2.5 µl
MgCl ₂	2.5 mM	1.25 µl
dNTP's	200µM	0.5 µl
Primer F	0.4µM	0.5 µl
Primer R	0.4µM	0.5 µl
DNA		2 µl
Enzima	1U 25 µl	0.2 µl

Fig. 9. Reacciones de PCR.

Mezcla de reacciones para PCR simple.

- Una vez, hidratado el botón de ADN de la muestra de exudados nasales, agitar y centrifugar los tubos,
- Colocar 2 µl de ADN de los primeros tubos a tubos de PCR 0.2 µl.
- Posteriormente en un nuevo tubo mezclar todos los reactivos para 10 reacciones: agua, Buffer, MgCl₂, dNTP's, iniciador externo 1 y 2, DNA polimerasa.
- Colocar 23 µl de la mezcla preparada en cada uno de los tubos de PCR con DNA.
- En los mismos tubos de PCR, colocar 5 µl de buffer de carga y centrifugar.



Fig.10. Centrífuga para PCR.

Como controles de la reacción de PCR se utiliza DNA de cepa de referencia *M. bovis* del patógeno a detectar en este caso *M. bovis* y agua como control negativo.

El siguiente paso es colocar los tubos en un termociclador, que sirve para calentarlos o enfriarlos a temperaturas muy precisas.



Fig. 11. Termociclador

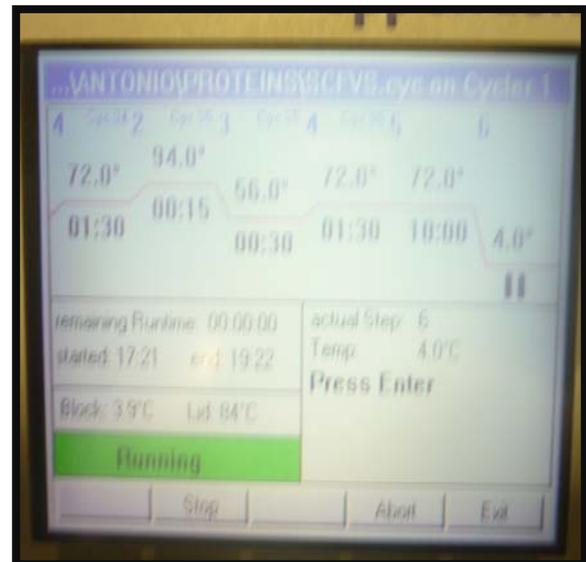


Fig. 12. Temperaturas del Termociclador.

El termociclador calienta o enfría los tubos a tres temperaturas distintas, que se repiten una y otra vez (lo que se llama los ciclos de reacción), la primera es a 94°C (y a este paso se le llama desnaturalización) durante la cual las dobles cadenas del ADN se abren o desnaturalizan, quedando en forma de cadenas sencillas; después el termociclador ajusta la temperatura en un intervalo entre 94 y 60°C (llamada de alineamiento), a esta temperatura se forman y se rompen constantemente los puentes de hidrogeno entre los oligonucleotidos y el ADN, y aquellas uniones más estables (las que son complementarias)

duraran mayor tiempo, quedando los oligonucleotidos alineados formando una pequeña región de doble cadena. La polimerasa se une a este pequeño pedazo de ADN de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrogeno que se forman entre las bases estabilizan más la unión y el oligonucleótido permanece en este sitio para el siguiente paso. Después la temperatura sube a 72oC (paso que se conoce como extensión), ya que 72oC es la temperatura en la cual la polimerasa alcanza su máxima actividad, y continua la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleotidos que ya se habían alineado. En el primer ciclo, con estas tres temperaturas, se sintetizaran los primeros fragmentos a partir del ADN geonómico. Estos primeros fragmentos no tendrán el tamaño esperado, serán un poco más grandes ya que la *taq* copiara hasta donde le sea posible, pero como, se obtendrán en cantidades tan pequeñas que al final no podremos detectarlos. Después se repiten una vez más las tres temperaturas, pero en este segundo ciclo, los oligonucleotidos, además de unirse al ADN que pusimos al inicio, también se unirán a los fragmentos recién sintetizados del primer ciclo.

Por lo tanto en este segundo paso la polimerasa sintetizara 2 fragmentos largos copiados directamente del ADN y 2 fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño que hay entre los dos oligonucleotidos que hemos usado. De esta forma con cada ciclo aumentara el número de fragmentos del tamaño que queremos. Cabe mencionar que antes y después de estos ciclos se programan dos pasos, uno de 95oC durante varios minutos para iniciar con desnaturalización, y al final de los ciclos, un paso ultimo de extensión a 72oC para permitir que la *taq* termine de sintetizar todos los fragmentos que pueden haber quedado incompletos (Eguiarte *et al.*, 2007)

➤ Plantilla de ADN

➤ $2^0 = 2$ copias

➤ $2^2 = 4$ copias

➤ 8 copias

➤ 16 copias

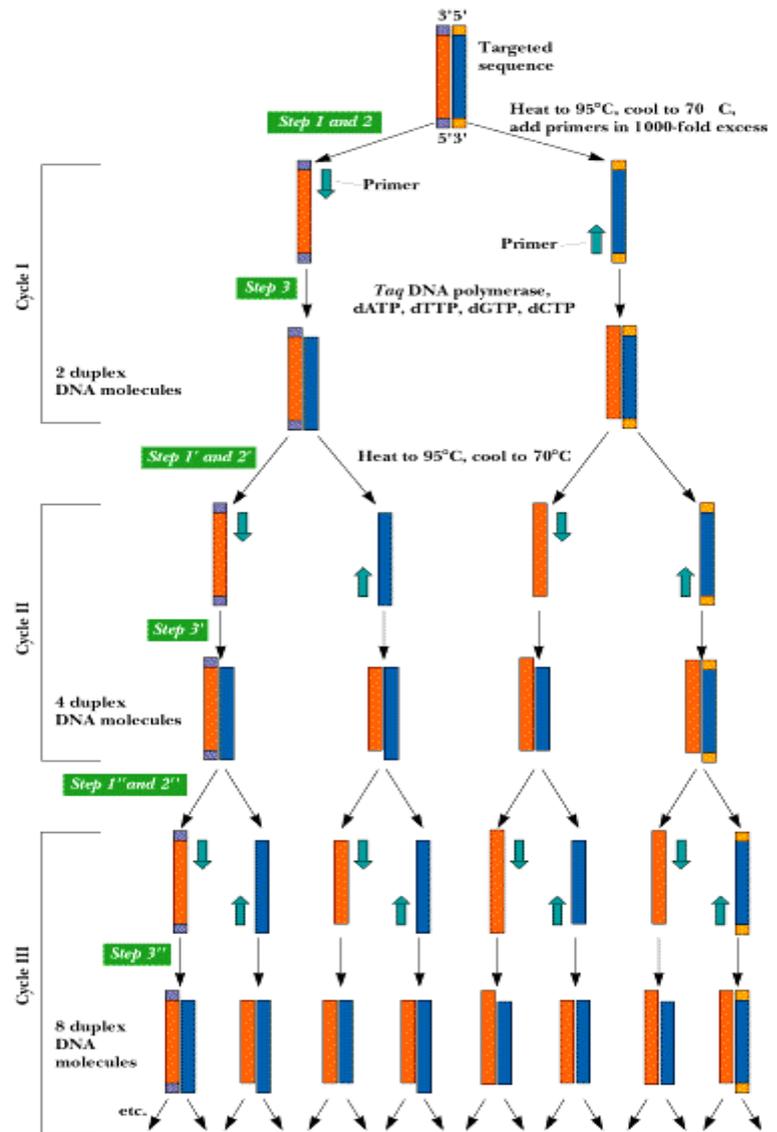


Fig. 13. Ampliación exponencial

5.1. Electroforesis en gel de agarosa

En la preparación de la electroforesis pesar 0.24 g de agarosa si es al 0.8% y adicionar 30ml de buffer más 1 μ l de bromuro de etidio 10ml/ml.
Por ultimo realizar la electroforesis con 10 μ l de DNA preparado y 4 μ l del peso molecular, colocarlo en el gel ya solidificado.

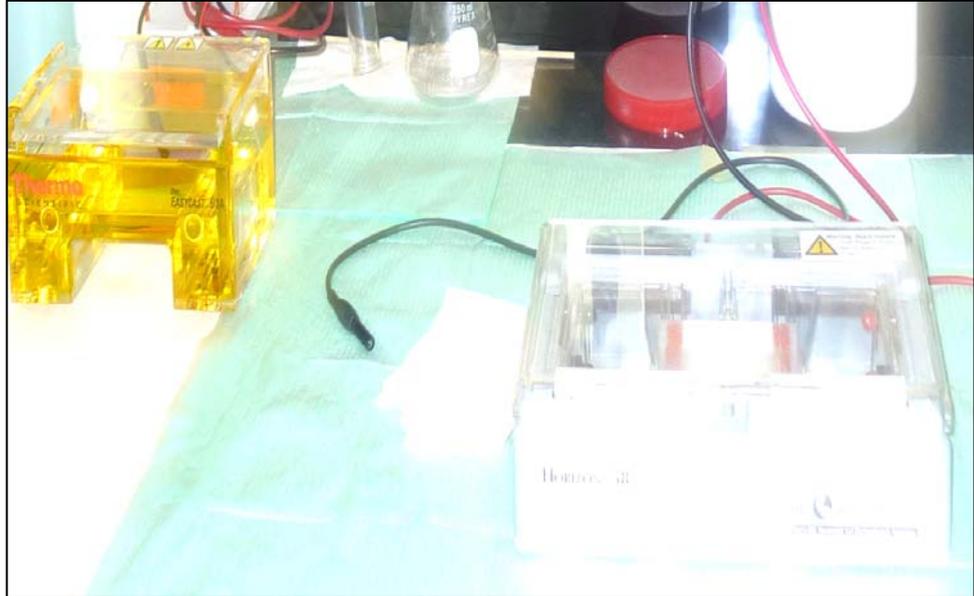


Fig. 14. Preparación de electroforesis.

6. JUSTIFICACIÓN

Algunos animales no reactivos que se encuentran en fase terminal de la enfermedad, con lesiones abiertas permanecen dentro del hato y constituyen un foco potencial de infección para la población susceptible.

El problema del resurgimiento de la tuberculosis en bovinos se debe entre otros, a la constante movilización de animales infectados, el bajo manejo de programas de prevención, la resistencia antimicrobiana de *Mycobacterium bovis* al tratamiento tradicional, entre otros factores.

La detección temprana es importante porque cualquier demora en la determinación de *Mycobacterium bovis* conducirá, a un retraso en la iniciación de un buen manejo para no aumentar la probabilidad de una diseminación de casos de tuberculosis. Además de seguir el animal positivo al Rastro para confirmar bacteriológicamente la tuberculosis.

7. RESULTADOS

Número de Animales muestreados	# de Arete del Animal	Prueba de la tuberculina	Resultados de PCR
1	9796	+	-
2	4477	+	-
4	6128	+	+
6	6305	+	-
7	6599	+	+
8	5697	+	-
9	5224	+	+
10	4638	+	+
11	8021	+	-
12	5903	+	-
13	7955	+	-
14	7948	+	-
15	5160	+	+
16	9613	+	+
17	7459	+	-
18	3101	+	+
19	2807	+	-
20	1269	+	-
21	9985	+	-
22	2546	+	-

En 22 animales reactivos a PPDB, se observaron dentro de estas, 7 amplificaciones de *Mycobacterium bovis* mediante PCR.

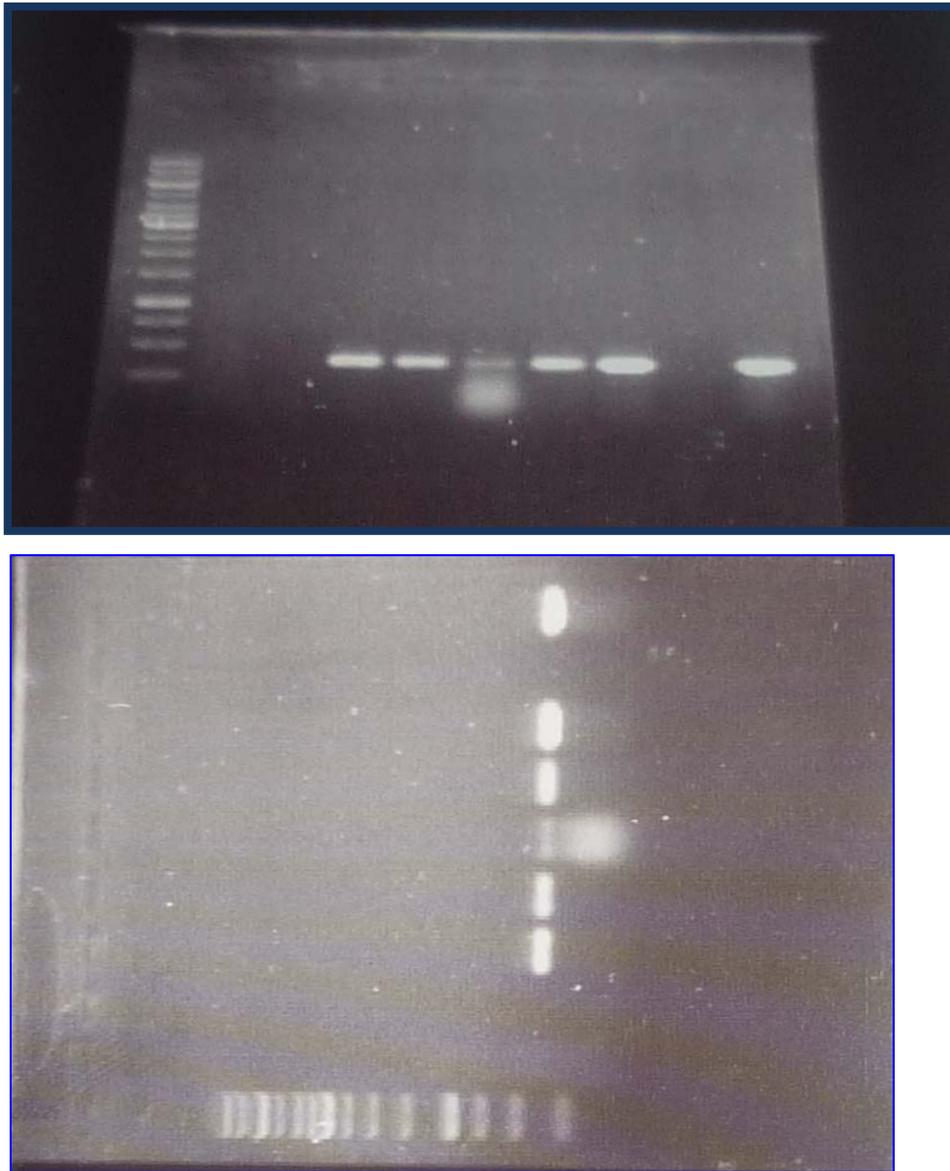


Fig. 15. Amplificación de PCR.

Para PCR simple se amplificó un segmento de 372 pb del gen MPB70 del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, empleando los oligonucleótidos TB F y TB R. la primera banda es el peso molecular Gene Ruler 1Kb DNA Ladder, las 2 siguientes bandas son negativas, las siguientes 5 son positivas, el control negativo (agua) se observó sin contaminantes y el BCG resulta positivo.

Se sugiere que para tener un buen diagnóstico se necesita correr tres tipos de muestras en PCR, el gen de un bovino para verificar que exista DNA y el gen de la *Mycobacteria* y un control, al amplificar gen de *Mycobacteria* y gen de bovino y un control sin contaminantes el resultado es la de un animal enfermo de tuberculosis. Si existe variación en la amplificación con alguno de los genes, la interpretación será diferente porque puede deberse a una contaminación o a la falta de DNA, de esta manera se detectara la presencia la ausencia de la *Mycobacteria* y la contaminación.

8. DISCUSIÓN

Vallecillo en el 2011 mencionó que en la mayoría de los diagnósticos se realizan pruebas para detectar la presencia y no para detectar la ausencia del agente, los animales que salieron negativos, no significa que no tengan *Mycobacterium bovis* ya que pudo deberse a que no estuvieran secretando DNA o por que no se extrajo este.

Vitale y colaboradores en 1998 dice que la cantidad y calidad de ADN obtenido en todas las muestras no es la misma ya que posiblemente no todos los animales enfermos de tuberculosis eliminan micobacterias o lo hacen de manera intermitente. La explicación a lo anterior, es que cuando hay lesiones en los nódulos linfáticos del sistema respiratorio, los animales enfermos son considerados excretores, pero cuando las lesiones no están presentes, este animal aunque sea considerado enfermo, no elimina micobacterias, por lo que se considera no excretor. Se ha reportado que el porcentaje de animales reactivos que presentan lesiones en el tracto respiratorio es de 90%. Por lo tanto, en este estudio se considera que existe la posibilidad que en el 90% de los casos cuando se detecta a la *Mycobacteria*, podría tratarse de un animal con lesiones en nódulos linfáticos.

También este autor menciona que cuando la infección se localiza en otros órganos según el modo de transmisión de la enfermedad, la bacteria es eliminada en otras secreciones corporales como la orina. De tal manera que, cuando la infección es adquirida por vía digestiva, la eliminación de las micobacterias no sería por exudado nasal, por lo que no sería detectado por PCR a partir de estas secreciones. Por lo tanto, la prueba de PCR tiene utilidad en las infecciones adquiridas por vía aerógena.

Ramírez en 2011 dijo que la prueba de tuberculina puede deberse a fallas en animales anérgicos lo cual está ampliamente reportado. La anergia se cree que es debido a una supresión de la respuesta inmune por los linfocitos T supresores en los casos de tuberculosis en etapa final o muy avanzada. En los casos de infección por micobacterias en etapa inicial puede explicarse la anergia debido a que la prueba de tuberculina está basada en una reacción de hipersensibilidad retardada mediada por células y por lo tanto, en los primeros estadíos de la infección, este tipo de inmunidad todavía no está desarrollada y al no desarrollar inmunidad no responde a la prueba de tuberculina son negativas pero PCR si detecta las *micobacterias*. Otra desventaja de esta prueba es al tratar al animal o que se recupere por sí solo, entonces cuando ya no exista la enfermedad esta prueba la detectara ya que activara las células de memoria, ocasionando que el animal sea sacrificado sin estar enfermo.

9. CONCLUSIÓN

No existe una prueba ideal para diagnosticar tuberculosis bovina. La especificidad de una prueba es un parámetro especialmente importante para Programas de Erradicación de Tuberculosis bovina. Una prueba de diagnóstico nunca puede ser 100% segura, lo cual trae como consecuencia que un porcentaje de los animales será sacrificado sin tener la enfermedad. Este parámetro tiene mayor importancia en las etapas finales de la campaña de erradicación cuando la prevalencia de la tuberculosis bovina es baja. En este momento es recomendable el introducir pruebas confirmatorias para los animales de alto valor productivo y sospechosos.

La prueba de PCR en secreciones nasales puede utilizarse como apoyo a la prueba de tuberculina y realizarse únicamente a los animales negativos, en esta prueba, lo que optimizaría los mecanismos de diagnóstico y control de la enfermedad para mejorar la salud animal y como consecuencia la salud humana.

La PCR como parte de diagnóstico complementario, si es específica, ya que los resultados de este trabajo muestran la utilidad para la identificación de *Mycobacterium bovis*, al observar la amplificación de la banda 372 pb del gen MPB70. La especificidad de la pruebas de PCR se encuentra en concordancia con otros estudios realizados. Además que sigue identificando a la *Mycobacteria* en muestras clínicas de ganado que se encuentran en fases tempranas de la infección o incluso que hubieran iniciado la terapia antibiótica.

Con la prueba intradérmica es difícil detectar animales en etapas finales de la enfermedad. Por tanto, la prueba complementaria utilizada representa una alternativa viable para realizar diagnóstico. Lo que posiciona a la PCR como de elección para estudios posteriores que busquen validar su uso potencial para el diagnóstico de otras enfermedades.

Se recomienda el mecanismo de acción de la indolicidina ya que se observa al unirse en la superficie del lipopolisacárido con alta afinidad, resultando en un paso a través de la membrana externa autopromovido y una posterior formación de canales en la membrana citoplásmica que lleva a la muerte celular, este sería una forma para combatir la tuberculosis bovina, administrando VD3 y exponiendo a los animales al sol para que se active la indolicidina.

Realizar estudios en un lote de bovinos más grande para ver las variaciones, de la prueba de PCR.

10. LITERATURA

1. Abdala A. 1998. Tuberculosis Bovina. Sancor, El Sitio de la Producción Animal. 56(604):26-30.
2. Acha P. N. y Szyfres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y animales. Vol. I. 3a ed. p 266-280. Organización Panamericana de la Salud. Washington DC.
3. Aguirre S. O. 1981. Guia Climática de la Comarca Lagunera. CIAN-CAELALA-ANIA-SARH. and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. Ann N Y Acad Sci. 1081:6173.
4. Aranaz A., Llebana E. y Mateos A. 1996. Spoligotyping of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. Clin Microbiol. 34:2734-2740.
5. Balanza P. A. 2004. Aspectos zoonóticos de la epidemiología de la tuberculosis en España. Consejería de sanidad. Región de Murcia. 42p.
6. Balanza P. A. 2004. Aspectos zoonóticos de la epidemiología de la tuberculosis en España. Consejería de sanidad. Región de Murcia. 42p.
7. Barrios J. A., Castañón M., Flores M. y Hernández R. 2010. Aspectos biológicos, clínicos y epidemiológicos de la tuberculosis latente. Salud Pública México. 52 (1):70-78.
8. Biberstein, A. 1987. Supervivencia de *Mycobacterium bovis* en agua. Rvta. Cub. Cienc. Vet. 15: 243.
9. Blaha T. 1995. Epidemiología especial veterinaria. Ed. Acribia. p. 164-172 España.
10. Cardona P. y Ruiz J. 2004. On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*-latent bacilli. Eur Respir. 24:1044-1051.
11. Chávez E. C. y Díaz F. 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Julio-Septiembre.
12. Cosma C. L. 2003. The secret lives of the pathogenic *Mycobacteria*. Rev. Microbiol 57:641-76.

13. Cousins D. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev Sci Tech.* ; 20:71–85.
14. Doménech P. 2003. Tendencias Evolutivas de la Brucelosis y Tuberculosis Animales en el Periodo 1990-2000. Tesis Dr. V. Univ. Barcelona, Fac. Veterinaria. 263 p.
15. Eguiarte L. E., Souza V. y Aguirre X. 2007. Ecología molecular; Guía práctica sobre la técnica de PCR. México, D.F. ISBN. 490 P.
16. Estrada C., Díaz F. Arriaga C., Villegas N., Pérez R. y González D. 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *M.V.Z. UNAM.* 35 (3):1-13.
17. Etter E., Donado P., Jori F., Caron A., Goutard F. y Roger F. 2006 Risk analysis Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Volumen 3 5.
18. Fanning E. A. 1998. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. En: Davies PDO. *Clinical tuberculosis.* London: Chapman and Hall Medical. pp 535-550.
19. García H. M. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, Actualidad e importancia. *Univ. diag.* (2):31-41.
20. García V. y Valdespino J. L. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* en pulmones sin lesiones tuberculosas, ¿santuario inmunológico? Instituto Nacional de Salud, pública, México. Pp. 460-461.
21. Guerrero R., Garzón D., Mejía G., Monroy W., Patarroyo M. y Murillo L. 2008. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Can J Vet. Res.* 63: 101-106.
22. Günter S. H. 1997. *Microbiología General. Micobacterias.* Barcelona. Omega, S.A. 625.
23. Gutiérrez J. A. 2010. *Inmunológica Veterinaria.* México: Manual Moderno. 360 p. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993; 17:968-975.

24. Huebner R., Jeyanathan M., Mengistu G., Aguilar D., Orozco H. y Harboe M. 1993. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. 356: 2133-38.
25. Leyten E. M. Palacios M. M., Ponce L. A., Jimenez M.E. Jimenez C. A. y Balandrano C. S. 2006. The role of core groups in transmitting tuberculosis in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tub Lung Dis.* 4: 12-17.
26. Llop, A., Valdés M., Vivanco D. y Zuazo S. 2001. Microbiología y Parasitología médica. Micobacterias. La Habana. Ciencias Médicas.
27. Loeza H. 2010. Efecto de los pépticos antimicrobianos tionina de *Capsicum Chinense* y Thi2.1 de *Arabidopsis thaliana* producidos por células endoteliales bovina sobre patógenos intracelulares: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Tesis Biol. Loeza. Univ. Michoacán de San Nicolas de Hidalgo, Fac. M.V.Z. 75 p.
28. Madiga M. T. y Martinko J. M, Biología de los Microorganismos. 10 ed. Pearson.
29. Mantilla G., Ortiz M., Acosta A. y Sousa S. 2007. Diagnóstico de Tuberculosis Bovina por Aislamiento Bacteriológico o Histopatológico de Vacunos Reactores a la Prueba de Tuberculina. SENASA, Lima.
30. Marangon S., Martini M., Pozza M. y Neto J. A .1998. Case-control study on bovine tuberculosis in the Veneto Region (Italy). *Prev. Vet. Med.* 34. 87-95.
31. Martín A. P. y León L. 1998. La tuberculosis: introducción a la Enfermedad. Fac. de Veterinaria. 10 (2),
32. Metzker M. L. y Caskey C T. 2009. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Encyclopedia of life sciences.* 2009, John Wiley, Ltd. www.els.net.
33. Morales A., Martínez C T., Carlos A. G., Álvarez M. y Álvarez J. 2005. Comparación de Histopatología, Cultivo y PCR en el Diagnóstico de tuberculosis bovina. 2:103-108.
34. Morales A., Peñuelas K., Álvarez G. Martínez I., Maldonado J., Mendoza G. y Milián F. 2008. Correlación entre PCR en Exudado Nasal y la Reacción de Tuberculina para la detección de organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en bovinos. *INIFAP.* 18 (1) 0798-2259.

35. Murray P. R. y Rosenthal K. S. 2007. Microbiología médica. *Mycobacterium*, 5 ed. España. GEA. p 927.
36. Nelson D. L. y Cox M.M. 2000. Principios de Bioquímica, 3ª ed. Editorial Omega (Barcelona, España), pp 1119-1128.
37. Niemann S., Richter E. y Rusch-Gerdes S. 2000. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis complex* by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M. bovis*. J Clin Microbiol. 38:152-157.
38. Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C, Romero-Torres C, Escartín-Chávez M. 2008. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. Salud Pública Mex. 50:286-291.
39. Prat C., Domínguez J. y Vicenç A. 2004. *Mycobacterium bovis*. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona. Pp. 7.
40. Quirós A. B., Arranz E. y Garrote J.A. 2009. Luz solar, vitamina D y tuberculosis. *BOL PEDIATR* 2009; 49: 220-226.
41. Radostits O., Blood O. Gay C. 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.
42. Ramírez C. 2011. Diagnóstico de la prueba de tuberculina y PCR. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (comunicación personal).
43. Rébak G., Brenn G. Sánchez S., Molina K. y Cedros J. 2005. Manifestación de tuberculosis. Cátedra Tecnología de la Carne y Derivados. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNNE. bovina post mortem. (Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-048.pdf>. Consultado el: 08/06/2011).
44. SAGARPA. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Diario Oficial de la Federación, México D. F.
45. Schmidt R. H. 1989. The arid zone in México. Climatic extreme and conceptualización of the Sonora desert. J Arid. Euv. 16:241-256.

46. SENASA. 2007. Tuberculosis bovina. Pruebas Tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación) Preguntas y Respuestas. Buenos Aires, República Argentina.
47. Stryer L., Berg J. M. y Tymoczko J. L. 2003. "Bioquímica", 5ª ed. Editorial Reverté (Barcelona, España), pp 152-154.
48. Suazo FM., Escalera A. M. y Torres R. M. 2003. A review of M. bovis BCG protection against TB in cattle and other animals species. *Prev Vet Med.* 58(1-2):1-13.
49. Tizard I. 2002. *Inmunología Veterinaria*. 6ª ed. p 371-379. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. España.
50. Vallecillo A. J. 2011. Diagnóstico de PCR. México. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (comunicación personal).
51. Valls P., Castillo O. y García B. 2002. Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencia de la Salud. Tipos de Electroforesis. Mexicana BIO-RAD. 2001. Protocolo que acompaña al Quantum Prep Miniprep Kit.
52. Vigneaux P., Urrutia D., Oportus L., Contreras H. y Herrera R. 2003. Tuberculosis, aspectos claves en el manejo de rebaños infectados. VI Jornadas Chilenas de Buiatría. Pucón – Chile. Pág 33.
53. Vinueza B. C. 2009. PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular.
54. Vitale F., Capra G., Maxia L., Reale S., Vesco G. y Caracappa S. 1998. Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates and Nasal Swabs. *J of Clin Microbiol.* 36(4): 1050-1054.
55. Webste H. 2002. Bioseguridad. Tipos de Desinfectantes de Superficie. Animal Health Branch Animal Health and Food Safety Services.