

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

“UNIDAD LAGUNA”



DIAGNOSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN OVINOS POR MEDIO DE LA PRUEBA ANOCAUDAL CON TUBERCULINA

NIDIA GUADALUPE RAMIREZ SANCHEZ

TESIS

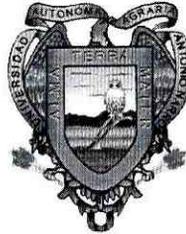
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, octubre del 2005

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA



DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**DIAGNOSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* EN
OVINOS POR MEDIO DE LA PRUEBA ANOCAUDAL
CON TUBERCULINA**

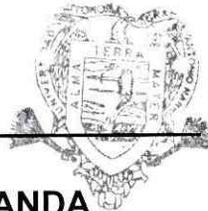
POR

NIDIA GUADALUPE RAMIREZ SANCHEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

M. C. ERNESTO MARTINEZ ARANDA

Torreón, Coahuila, México.



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

UAAAN - UL

Octubre de 2005.

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

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**TESIS QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ ASESOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADO POR:

**DR. MARCO A. HERNANDEZ VERA
DIRECTOR**

**M.C. JORGE ITURBIDE RAMIREZ
ASESOR PRINCIPAL**

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

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

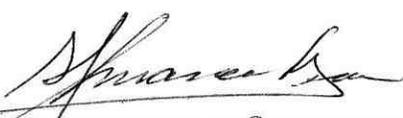


**TESIS QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR PARA OBTENER EL TITULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

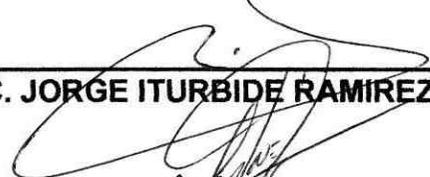
APROBADO POR:

PRESIDENTE DEL JURADO:



DR. MARCO A. HERNANDEZ VERA

VOCAL:



M.C. JORGE ITURBIDE RAMIREZ

VOCAL:



M.C. ERNESTO MARTINEZ ARANDA

SUPLENTE:



M.C. SERGIO I. BARRAZA ARAIZA

TORREÓN, COAHUILA, MEX.

OCTUBRE DEL 2005

DEDICATORIAS

A DIOS: Por se mi guía, mi luz, mi esperanza de vida, por darme la fuerza y el valor de seguir mi camino.

A MIS PADRES: Ing. Enrique Castro Calvillo
Ruth Virginia Sánchez Chaparro

Por todo su cariño, apoyo, comprensión, cuidados y paciencia que me han dado durante toda mi vida se que sin ello no hubiese podido culminar con mis estudios.

A MI ESPOSO: Jaime Antonio Cisneros Toscano

Con amor por toda su paciencia amor y cuidados, por haberme enseñado lo que realmente tiene valor en esta vida.

A MIS ABUELOS: Josefina Chaparro Sánchez
Eduardo Olivares Sifuentes

Por haberme guiado con amor y enseñarme el camino de la vida. A ustedes que sin sus consejos mi vida no seria lo que es ahora.

A MI HIJA: Katia Berenice Cisneros Ramirez

Que a pesar de ser muy pequeña me dio la fuerza para seguir adelante con este proyecto tan importante de mi vida.

**A MIS HEMANOS: ING. Víctor Andrés Ramírez Sánchez
Jesús Alfredo Ramírez Sánchez
Julieta Anaid Ramírez Sánchez**

Con quienes he estado en los buenos y malos momentos de mi vida y siempre me han apoyado para seguir adelante.

**A MIS ASESORES: DR. Marco A. Hernández Vera.
MC. Jorge Iturbide Ramírez.**

Por su tiempo y entrega para la elaboración de este proyecto brindando tiempo y dedicación.

A MI AMIGA: Elizabeth Martínez

Por todo su apoyo y consejos estando con migo en las buenas y en las malas siempre.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS: Por haberme dado la dicha de terminar mi carrera, por guiarme con su luz por esta vida.

A MI ALMA TERRA MATER:

Por cobijarme, por ser mi segunda casa en donde nada me faltó, por instruirme en mi formación profesional.

A MI ASESOR DE TESIS:

Por su paciencia y tiempo dedicados a este trabajo tan importante en mi vida
Gracias Dr. Hernández por todo.

INDICE GENERAL

DEDICATORIAS	I-II
AGRADECIMIENTOS	III
INDICE GENERAL	IV
INDICE DE CUADROS	V
INDICE DE GRAFICAS	VI
RESUMEN.....	VII - VIII
I.- INTRODUCCION	1-2
II. - JUSTIFICACION	3
III. - OBJETIVOS	3
IV. - META	3
V. - REVISION DE LITERATURA	4
1. -CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS MYCOBACTERIAS	6
1.1. - CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES	7
2. - TIPOS DE CRECIMIENTO DE LAS MYCOBACTERIAS	8
3. - DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA	8-9
4. - METODOS DE IDENTIFICACIÓN DE <i>M. BOVIS</i>	9-11
5. - INMUNOLOGIA DE LA REACCION DE LA TUBERCULINA	11
6. - REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA	12
6.1. - BASES CELULARES DE LA RHR	13
6.2. - ETAPA DE SENSIBILIZACIÓN	14
6.3.- ETAPAS DE DESENCADENAMIENTO	14
6.3.1. – Reconocimiento	14
6.3.2. - Activación linfocitaria	14
6.3.3. - Fase efectora	15
7.- PRUEBA DE TUBERCULINA DESCRITA POR GONZALEZ (1999)	16
VII. MATERIALES Y METODOS	17
VII.I. PROCEDIMIENTO DE SELECCIÓN	17
VII.II. TECNICA UTILIZADA EN LA PRUEBA ANOCAULDAL CON TUBERCULINA	18
VIII. DISCUSION Y RESULTADOS	19
VIII . CONCLUSIONES	28
IX. LITERATURA CITADA	29

INDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1 .- porcentaje y tipo de reacción a la prueba de tuberculina	20

INDICE DE GRAFICAS

1.- Grafico 1 animales que se consideran positivos a Tb	21
2.- Grafico 2 animales que mostraron una reacción inconstante durante el tiempo de la prueba.....	22
3.- Continuación de la grafica 2 en donde se muestran los datos de los animales que tuvieron una reacción inconstante	23
4. – Grafico 3 Animales que no mostraron reaccionaron a la prueba anocaudal	24
5. – Grafico 3.1 nos muestra la continuación de los resultados de los animales que no reaccionaron al ppd bovino	25
6. – Grafico 4 ovejas que tuvieron una ligera reacción a la prueba	26
7. – Grafico 5 prueba cervical comparativa realizada a los animales que dieron positivo a la prueba anocaudal	27

RESUMEN

La Tb es una de las principales enfermedades en medicina veterinaria, aunque se han demostrado prevalencia baja en ovinos se ha encontrado que el genotipo *M. bovis* es idéntico al de las cabras y que los ovinos no se excluye como una posible fuente de infección.

El objetivo del presente estudio fue identificar ovejas que reaccionaran al ppd bovino, llevándolo a cabo en ovejas de la raza pelibuey y black belly . Se realizó la prueba anocaudal con tuberculina bovina en animales que tenían antecedentes de ser alimentados con sobrantes de dietas de ganado lechero. Los animales seleccionados para este estudio se escogieron al azar en dos establos de la Comarca Lagunera.

A los ovinos seleccionados se les midió el lado izquierdo del pliegue anocaudal con un vernier, y posteriormente se les aplico 0.1 ml de ppd bovino intradérmico, según la técnica descrita por González y colaboradores (1999). Posteriormente se realizaron las mediciones del pliegue a las 24, 48 y 72 horas posteriores teniendo la precaución de medir en el punto en donde se hizo la inoculación. Las ovejas que presentaron una inflamación en el pliegue anocaudal de mas de 5 mm se les realizo una segunda prueba comparativa utilizando ppd aviar, en este caso la prueba se realizo en la tabla del cuello, y se tomo la lectura a las 72 horas después de la inoculación.

Los resultados de este estudio mostraron un 14% de reactores positivos a la prueba anocaudal, y al realizarles la prueba cervical comparativa la lectura del pliegue indico negativo a Tb. El 30% mostraron una reacción inconstante, otro 28% no presentó ninguna reacción y el 28% restante tuvieron una ligera reacción.

Estos resultados nos hacen suponer que existe la posibilidad de que las ovejas se pueden contagiar de tuberculosis por medio de la alimentación con sobrantes de las dietas de bovinos infectados, ya que se presento una reacción en la a la prueba de tuberculina. Es probable que se requiera otras pruebas para el diagnóstico, utilizando diferentes métodos con mayor especificidad y sensibilidad que ayuden a obtener resultados a cerca de la infección de Tuberculosis en las ovejas.

I. INTRODUCCION

La tuberculosis (Tb) bovina causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es una de las principales enfermedades en medicina veterinaria.

La *M. Tuberculosis* y *M. bovis* infecta al ganado y otros animales, los alimentos contaminados o el contacto directo con animales es considerada la forma primaria de las causas de infección con *M. Bovis* en humanos. Los humanos son un reservorio del organismo, pero la infección de humano a humano es rara. La importancia de *M. bovis* para la enfermedad de Tb humana ha disminuido drásticamente después de la introducción de medidas de control eficaz alrededor de la mitad del último siglo en muchos países desarrollados.

Aunque se han demostrado proporciones bajas de Tb en oveja, se ha encontrado que el genotipo *M. bovis* es idéntico al de las cabras y que la oveja no se excluye como una posible fuente de infección.

La enfermedad de tuberculosis en animales normalmente es progresivamente lenta en la cual los signos clínicos no son aparentes hasta más tarde, en el proceso de la enfermedad.

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* consiste en un grupo altamente relacionado de bacilos aerobios ácido-alcohol-resistente (BAAR).

Estos micro-organismos pueden ser diferenciados por medio de características fenotípicas, pero, con taxonomía numérica diferente.

La capa externa de la pared esta formada por una matriz de fosfolípidos y proteínas entre las que están algunas purinas. Una característica del organismo es que su crecimiento es muy lento.

Se caracterizan por una pared original y muy rica en lípidos y esta constitución explica, por lo menos parcialmente, las propiedades tintóreas, la patogenicidad y la resistencia a diversos antibióticos.

De acuerdo a su velocidad de crecimiento, las especies del género *Mycobacterium* están divididas en 2 grupos:

Las mycobacterias de crecimiento lento, y las de crecimiento rápido. La supervivencia de las Mycobacterias es mejor bajo condiciones frescas. Las Mycobacterias no producen toxinas. El tiempo de incubación de estas mycobacterias comprende entre 2 días y 10 semanas, incluso más.

En la infección de animales de granja la Tb es normalmente diagnosticada por la prueba anocaudal con tuberculina intradérmica o mediante un examen postmortem.

La tuberculina usada para la prueba de piel es un derivado proteico purificado (ppd) preparado de la filtración de una cepa de *M. bovis* en laboratorio. Esta prueba se basa en la medición de la respuesta celular inmune, puede ser conducida por inoculación dentro de cualquier pliegue cercano a la base de la cola o en la tabla del cuello ambos como una sola (inoculación con tuberculina bovina) o una comparativa (inoculación con tuberculina bovina y aviar en la tabla del cuello en distinta posición o en el pliegue caudal).

La vacunación exitosa contra la tuberculosis en animales domésticos o de fauna podría contribuir a la erradicación de la tuberculosis.

II. JUSTIFICACIÓN

Aunque la explotación de ovinos en nuestro país no es tan común como en otros países, toma un lugar muy importante en la producción de lana y carne para el consumo humano.

Este trabajo realizado es justificable desde el punto de vista económico, de producción, y de salud tanto de los animales como de los humanos, ya que esta enfermedad si se diagnostica y controla a tiempo se pueden evitar pérdidas económicas para las personas que se dedican a la explotación de estos animales.

En general la información acerca de la tuberculosis ovina es bastante escasa, pero se sabe y se tiene la conciencia de que estos animales también pueden ser portadores de la tuberculosis y que pueden representar un problema para la salud humana.

Es por esto que este trabajo se justifica ya que por un lado nos proporciona información acerca de la tuberculosis en ovinos, y por otro lado nos ayuda a comprobar si la prueba que se utilizo para el diagnostico es la adecuada.

III. OBJETIVOS

- 1.- Identificar ovejas que reaccionen al ppd bovino con el propósito de comprobar si existen reactoras a *Mycobacterium bovis*.
- 2.- Establecer si la fuente de infección de *Mycobacterium bovis* en los ovinos proviene de bovinos infectados.

IV. META

Establecer la prueba para el diagnostico de la Tuberculosis en ovejas.

V. REVISION DE LITERATURA

La tuberculosis (Tb) bovina causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es una de las principales enfermedades veterinarias ya que esta también afecta a los humanos, *M. bovis* es culpable de cerca de 7,000 casos de Tb humana cada año en Latino América (Milián F. y col. 2000).

La mayoría de las infecciones de tuberculosis en animales es causada por *Mycobacterium bovis*. Esta es un problema significativo en muchos países del mundo (Prodinge W. y col., 2002; Griffin J., 2000). Esta infección en el ganado y otros animales de granja en largas áreas del mundo, frecuentemente causa significantes pérdidas económicas (Llamazares G. y col., 1999).

En ciudades en desarrollo la Tb bovina representa potencialmente una significativa zoonosis las medidas tomadas en estas ciudades para erradicar la enfermedad del ganado no ha sido muy exitosa (Skuce R. y col. 1996).

M. bovis es reconocida mundialmente como el mayor agente responsable de la tuberculosis (Tb) en el ganado (Gutiérrez M. y col., 1995). La Tb bovina continúa presentando un serio problema en algunos países de la Unión Europea con índices de prevalencia en los rebaños de hasta 8.2 %, y *M. bovis* juega un papel importante para la Tb humana (Kubica T. y col., 2003).

La tuberculosis es una de las principales causas de enfermedad en todo el mundo. En 1995 la Tb fue la principal causa de muerte de personas de las cuales el 6% fueron menores de 15 años (Milián F. Y col. 2000).

La *M. Tuberculosis* y *M. bovis* infecta al ganado y otros animales, además los alimentos contaminados con *M. bovis* o el contacto directo con animales infectados es considerada la forma primaria de las causas de infección con esta mycobacteria en humanos (Kubica T. y col., 2003).

La importancia de *M. bovis* para la enfermedad de Tb humana ha disminuido drásticamente después de la introducción de medidas de control eficaz alrededor de la mitad del último siglo en muchos países desarrollados (*Kubica T. y col., 2003*).

El aislamiento del tipo de cepas bovinas en poblaciones humanas indican que el ganado infectado constituye el riesgo principal de la transmisión de *M. bovis* a los humanos. Esto puede ser porque la Tb bovina está más extendido o porque las cepas de bovino son más adaptables en los humanos (*Gutiérrez M. y col., 1995*). Sin embargo, esos resultados demuestran claramente que las cabras también son una fuente de infección para los humanos y que implica que un riesgo de zoonosis existe (*Gutiérrez M. y col., 1995*).

En estudios realizados en cabras y que se han encontrado infectadas de Tuberculosis se piensa que la posible causa de transmisión a estos animales puede ser la ingestión de sobrantes de alimentos de ganado bovino contaminados con *M. bovis* o por la dispersión de aerosoles que ocurre durante el contacto directo entre las especies (*Serraino A. y col., 1999, Phillips C. y col. 2003*). Los animales pueden también excretar el patógeno en heces, orina, leche, saliva y descargas nasales y bucales (*Richard S. y col., 2001*).

Aunque se han demostrado proporciones bajas de Tb en oveja, se ha encontrado que el genotipo *M. bovis* es idéntico al de las cabras y que la oveja no se excluye como una posible fuente de infección tanto para los humanos como para los mismos animales (*Gutiérrez M. y col., 1995*).

La infección de *Mycobacterium bovis* en animales normalmente es una enfermedad progresivamente lenta en la cual los signos clínicos no son aparentes hasta más tarde, conforme se da el proceso de la enfermedad (*Costello E. y col., 1999*).

La frecuencia de Tb ha disminuido hasta hace poco, sin embargo de 1985 a 1993 en los Estados Unidos la mortalidad por Tb aumentó hasta un 14%. Los factores más importantes reportados que superan a la Tb fueron: infecciones con el virus del VIH (Milián F. y col. 2000).

1. - CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LAS MYCOBACTERIAS

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) consiste en un grupo altamente relacionado de bacilos aerobios ácido-alcohol-resistente (BAAR) los cuales son patógenos humanos y animales, estos se dividen en tres grupos: los patógenos frecuentes que son: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae*, los patógenos ocasionales y los no patógenos según su capacidad de infectar y desarrollar enfermedad en el hombre, en los animales y su frecuencia (Aranaz A. y col., 1999; Euzeby J., 2002).

Estos micro-organismos pueden ser diferenciados por medio de características fenotípicas, pero, con taxonomía numérica diferente (Aranaz A. y col., 1999).

Las mycobacterias son unos bacilos derechos o ligeramente cóncavos, de 0.2 a 0.6 μm de diámetro sobre 1.0 – 10.0 μm de longitud, presentando a veces ramificaciones (Euzeby J., 2002).

La Identificación del complejo *M. tuberculosis* ha sido tradicionalmente basada en características de crecimiento como son producción de pigmento, morfología de la colonia, índice de crecimiento y por medio de pruebas bioquímicas (Aranaz A. y col., 1999). Otras pruebas comúnmente usadas para la especificación dentro del complejo son la acumulación de niacina, la actividad de la nitrataasa, la susceptibilidad a la pirazinamida y su susceptibilidad a ácidos hidroxí-carboxílicos (Espinosa de los M. y col., 1998; Niemann S. y col., 2000).

1.1. - CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

La capa externa de la pared de las mycobacterias esta formada por una matriz de fosfolípidos (fosfolípidos simples esterificados y fosfolípidos con manosa), y proteínas entre las que están algunas purinas y mycosidos (*Euzeby J., 2002*). Una característica de este microorganismo es que su crecimiento es muy lento (*Ministry of Health by ESR Ltd, 2001*).

La pared de las *Mycobacterias* posee una estructura más compleja que la pared de las bacterias Gram positiva y, sobre un frotis coloreado por la técnica de Gram, las mycobacterias aparecen a menudo como coloreadas, bajo la forma de "fantasmas" lo que las hace calificar a veces de "Gram Neutro" (*Euzeby J., 2002*).

Su pared se caracteriza por una pared original y muy rica en lípidos (60 % de los constituyentes) y esta constitución explica, por lo menos parcialmente, las propiedades tintóreas, la patogenicidad y la resistencia a diversos antibióticos (*Goldsmid J., 1994*).

La pared está constituida por 3 capas, la más interna, calificada de esqueleto parietal, esta formada por un peptidoglicano sobre el cual es fijado un polímero de arabino-galactano formado por la alternación de moléculas de arabinosa y de galactosa que se atan por enlaces esterés a unos ácidos micólicos situados en la capa intermedia (apareciendo como un espacio claro a la microscopia electrónica) (*Euzeby J., 2002*).

La capa externa de la pared de las mycobacterias esta formada por una matriz de fosfolípidos (fosfolípidos simples esterificados y fosfolípidos con manosa), y proteínas entre las que están algunas purinas y micosidos (*Euzeby J., 2002*). Una característica de este microorganismo es que su crecimiento es muy lento (*Ministry of Health by ESR Ltd, 2001*).

2. - TIPOS DE CRECIMIENTO DE LAS MYCOBACTERIAS

De acuerdo a su velocidad de crecimiento, las especies del género *Mycobacterium* están divididas en 2 grupos:

Las mycobacterias de crecimiento lento, forman colonias sólo después de 7 días de cultivo y son incapaces de crecer en medios bacteriológicos estándares. Las mycobacterias de crecimiento rápido, forman colonias en menos de 7 días y son aptas para desarrollarse sobre gelosa nutritiva o peptona (Euzeby J., 2002; Kimura T. 2003).

3. - DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

En la infección de animales de granja la tuberculosis (Tb) es normalmente diagnosticada por la prueba anocaudal con tuberculina intradérmica o mediante un examen postmortem. (Gutiérrez M. y col., 1995).

La tuberculina usada para la prueba de piel es un derivado proteico purificado (ppd) preparado de la filtración de una cepa de *M. bovis* en un laboratorio. Esta prueba se basa en la medición de la respuesta celular inmune, puede ser conducida por inoculación dentro de cualquier pliegue cercano a la base de la cola o en la tabla del cuello ambos como una sola (inoculación con tuberculina bovina) o una comparativa (inoculación con tuberculina bovina y aviar en la tabla del cuello en distinta posición o en el pliegue caudal) (Llamazares G. y col. 1999).

La prueba consiste en medir el sitio de aplicación e inocular intradérmicamente 0.1 ml de ppd bovino. Cuando se realiza la prueba comparativa, en el mismo animal, se inoculan 0.1 ml de ppd aviar a 2 cm de distancia del sitio de inoculación del ppd bovino. El sitio de inoculación se examina aproximadamente 72 ± 6 horas después, y la principal evidencia de una infección es el edema o una reacción de endurecimiento en el sitio de inoculación, se considera positivo a *M. bovis* cuando el ⁸

incremento rebasa los 4 mm más a la medida que se tomo antes de la inoculación y cuando solo hay un incremento entre 2-4 mm se considera como reacción sospechosa.. En el otro sitio una reacción aviar es considerada positivo sí la medida de la piel a las 72 hrs posteriores a la inoculación rebasa los 3 mm (*Llamazares G. y col. 1999*).

En años recientes, hay una variedad de estudios enfocados en la relación molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*; sin embargo, estudios epidemiológicos de *M. bovis* en humanos asociados con Tb aun es rara (*Kubica T. y col., 2003*).

4. - METODOS DE IDENTIFICACIÓN DE *M. BOVIS*

Mycobacterium bovis subsp. caprae es un miembro del complejo tuberculosis, el cual también incluye *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, y *M. canettii*. Es de interés general este patógeno, el cual fue aislado de lesiones tuberculosas en humanos, ganado, cabras y ovejas, ha ido aumentando constantemente desde la primera descripción. Así, la prevalencia de *M. bovis subsp. caprae* ha sido ampliamente estudiada en España y Francia (*Erler W. y col., 2004*).

El uso del método PCR y métodos de RFLP (polimorfismo en la longitud de fragmento de restricción) basado en la secuencia IS6110 esta secuencia se indica que puede ser útil para estudios epidemiológicos de la tuberculosis caprina (*Gutiérrez M. y col. 1997*).

La ventaja de PCR sobre RFLP es que es simple y rápida y requiere sólo una cantidad pequeña de ADN (*Gutiérrez M. y col., 1997*). Los resultados son consistentes con diferentes cepas de *M. bovis* que son implicadas en la tuberculosis bovina y caprina (*Gutiérrez M. y col., 1997*). Las cepas pueden ser aisladas de los nódulos linfáticos y pulmones de animales tuberculosos (*Aranaz A. y col. 1999*). 9

El método de PCR permite el mismo nivel de discriminación entre las cepas caprinas como lo hace RFLP con hibridación de IS6110 (*Gutiérrez M. y col., 1997*).

Algunas nuevas técnicas moleculares han sido desarrolladas en años recientes para ayudar a la diferenciación de aislados pertenecientes al complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye *M. bovis*. Entre estas técnicas, las más comúnmente usadas son spoligotyping, RFLP con diferentes pruebas (IS6110, repetición directa [DR]) (*Haddad N. y col., 2001; Cousins D. y col. 1998*).

El método de Spoligotyping (tipificación de espacios de oligonucleotidos), RFLP, IS6110 es considerado un importante indicador de identificación de cepas y es lo suficientemente estable para ser usado en estudios epidemiológicos de aislamientos e identificación de *M. bovis* (*Njanpop-Lafourcade B. y col. 2001; Skuce R. y col. 1996*).

La Spoligotyping es un método basado en PCR designado para detectar la presencia o la ausencia del único espacio dentro del genoma de *M. bovis*. El análisis de Spoligotyping ha sido desarrollado recientemente con cepas de *M. bovis* obtenidas de diferentes animales para demostrar la interacción entre especies (*Skuce R. y col. 1996*). Esta técnica es basada en la amplificación in vitro del DNA del gen presente en el cromosoma complejo de *M. tuberculosis* (*Skuce R. y col. 1996*).

La combinación de la spoligotyping y RFLP IS6100 puede ser esperado para mejorar las posibilidades de la relación epidemiológica por los diferentes potenciales de discriminación de ambos métodos (*Erler W. y col., 2004*).

En contraste, la spoligotyping es una técnica rápida, simple, y reproducible la cual puede ser desarrolladas en lisados celulares y aun en especímenes clínicos. Esto es basado en el polimorfismo de una región llamada DR. La región DR es única

para la bacteria perteneciente al complejo *M. tuberculosis* y esta constantemente presente en este grupo de mycobacteria (Haddad N. y col., 2001).

La vacunación exitosa contra la tuberculosis en animales domésticos o de fauna podría contribuir a la erradicación de la tuberculosis (Griffin J., 2000). El refinamiento de los modelos animales existentes es esencial para el avance en la investigación de la vacuna para la tuberculosis de relevancia para los humanos y animales (Griffin J., 2000).

5. - INMUNOLOGIA DE LA REACCION DE LA TUBERCULINA

El paso mas importante para la patogénesis de la enfermedad es la multiplicación de *Mycobacterium* dentro la célula. En el huésped, la primera interacción entre *M. tuberculosis* y los macrófagos alveolares es la llegada del *Mycobacterium* a la superficie celular seguida por su internalización, a nivel molecular, esta interacción es mediada por moléculas las cuales son expuestas a la superficie de ambos, del desarrollo Mycobacterial y de la membrana celular del huésped. (Vercellone A. y col., 1998).

La fagocitosis de los patógenos por los macrófagos inicia la respuesta inmune innata, la cual continúa con la respuesta adaptativa. En orden para la discriminación entre agentes infecciosos e internos los macrófagos desprenden un número limitado de receptores fagocíticos como el receptor manosa, que reconoce la estructura en los patógenos. Los patógenos son también fagocitados por receptores de complemento después de la opsonización no específica con receptores Fc y receptores de complemento después de la opsonización específica con los anticuerpos. Estos receptores inducen modificación en la actina del citoesqueleto que conduce a la en la internalización de la partícula. Esto incluye diferencias en los elementos del citoesqueleto que regulan la ingestión, las diferencias en la maduración de la vacuola y la diferencia en la respuesta inflamatoria. Los ¹¹

macrófagos también juegan un papel muy importante en el reconocimiento de células apoptocicas; una notable característica de este proceso es la ausencia de una respuesta inflamatoria (*Aderem A. y col., 1999*).

La prueba anocaudal con tuberculina se basa en la medida de la respuesta celular inmune, puede ser realizada por la inoculación de ppd bovino en el pliegue caudal de la base de la cola o una prueba comparativa en el cuello con ppd bovino y ppd aviar (*Llamazares G. y col. 1999*).

Estos sitios utilizados para esta prueba son elegidos debido a que estos se encuentran poblados principalmente de macrófagos que son los que reaccionan a la tuberculina. La respuesta celular inmune en esta prueba se presenta debido a que al aplicar la tuberculina intradérmica los macrófagos reaccionan a esta mostrando un cierto grado de inflamación si no hay anticuerpos presentes en el sistema inmune del huésped, por otro lado si no hay receptores para este la mejor indicación es la ausencia de inflamación (*Aderem A. y col., 1999*).

6. - REACCION DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

Existe una reacción de hipersensibilidad cuando se desarrolla una respuesta inmune dirigida contra elementos que no debieran ser considerados como extraños, o hacia elementos patógenos, pero de una forma inadecuada.

La reacción de hipersensibilidad retardada juega un papel importante contra agentes patógenos intracelulares, sin embargo, también tiene aspectos nocivos y a veces las lesiones tisulares causadas por la hipersensibilidad retardada son tan extensas que comprometen gravemente al organismo.

Aunque las reacciones de hipersensibilidad retardada (RHR) se descubrieron hace más de 100 años, sus mecanismos han sido objeto de debate durante este

tiempo. Esta reacción fue descubierta por Robert Koch, en 1882 pero no fue hasta los años 40 cuando Lansteiner y Chase demostraron que era mediada por células y no por los mecanismos humorales del sistema inmune (*Abbas Abal k. 2002*).

Las reacciones de hipersensibilidad retardada, son las reacciones tardías mediadas por células. Las reacciones de hipersensibilidad retardada son características de otro tipo de bacterias, tales como las mycobacterias.

Se denominan reacciones de hipersensibilidad retardada (HSR) porque se manifiestan por una respuesta inmune característica a las 24-48 hs. después del contacto con el antígeno en organismos previamente sensibilizados. Estas reacciones son desencadenadas por linfocitos T CD4+ y en ocasiones linfocitos T CD8+. Ambos tipos celulares secretan citoquinas que activan a los macrófagos, células efectoras finales de la reacción de HSR. La injuria tisular es consecuencia de los productos de los macrófagos activados, entre los que se destacan enzimas hidrolíticas, intermediarios reactivos del oxígeno, óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias (*Abbas Abal k. 2002*).

6.1. - BASES CELULARES DE LA RHR

La reacción de HSR, como toda reacción de hipersensibilidad, implica dos etapas: una primera etapa de *sensibilización* en la que el sistema inmune reacciona por primera vez frente a un antígeno (Ag), y etapas de *desencadenamiento* tras la reexposición al Ag.

La etapa de desencadenamiento de la HSR ocurre cuando el mismo Ag se presenta a una población expandida de linfocitos T memoria y se desarrolla en tres fases sucesivas: reconocimiento, activación y fase efectora (*Abbas A. y col., 2004*).

6.2 - ETAPA DE SENSIBILIZACIÓN

En la etapa de sensibilización, las células presentadoras de antígeno (APC) residentes especializadas llamadas células dendríticas, como las células de Langerhans de la epidermis, son las encargadas de procesar y transportar el Ag desde la puerta de entrada (p. ej.: la piel) hasta los ganglios linfáticos de drenaje o el bazo, donde se produce la presentación a las células T vírgenes específicas para ese Ag (*Abbas A. y col., 2004*).

6.3.- ETAPAS DE DESENCADENAMIENTO

6.3.1. - Reconocimiento

En organismos sensibilizados la persistencia del estímulo antigénico o una nueva exposición al mismo antígeno conduce a la etapa de desencadenamiento de la HSR. En esta etapa el antígeno se presenta a una población expandida de linfocitos T memoria presentes en la circulación sanguínea, a diferencia de la etapa de sensibilización que ocurre a nivel de los ganglios linfáticos locales.

La presencia del antígeno en el tejido desencadena, inicialmente, una respuesta inflamatoria de carácter innato con secreción de citoquinas por parte de los macrófagos y células endoteliales que conduce al reclutamiento de leucocitos en el sitio de exposición antigénica. La migración de los linfocitos hacia el lugar de ingreso del antígeno es controlada principalmente por las moléculas de adhesión (selectinas, integrinas). Esto resulta en el reclutamiento de linfocitos T circulantes en la zona de inflamación, independientemente de la especificidad antigénica (*Abbas A. y col., 2004.*)

6.3.2. - Activación linfocitaria

Una vez que los linfocitos T efectores migran al sitio de provocación antigénica y reconocen al antígeno para el cual son específicos, se activan para cumplir sus funciones efectoras. En la inmunidad celular, la principal función efectora de los linfocitos T CD4+ consiste en estimular la actividad microbicida de los macrófagos.

6.3.3. - Fase efectora

Los monocitos reclutados en el sitio de la reacción de HSR se extravasan en el tejido y se diferencian a macrófagos, últimas células efectoras de la hipersensibilidad retardada.

Durante el proceso de fagocitosis y activación de macrófagos las sustancias bactericidas pueden ser liberadas al espacio extracelular donde actúan como importantes mediadores de lesión tisular. Cuando los macrófagos activados son incapaces de erradicar el antígeno, continúan produciendo citoquinas y factores de crecimiento que modifican en forma marcada el ambiente tisular configurando una respuesta de HSR.

Las respuestas a la RHR han sido bien definidas. La reacción es antígeno específica y causa eritema e induración en la zona donde se ha inyectado el antígeno en personas y animales inmunizados. La inyección sistémica de antígeno provoca fiebre, síntesis de proteínas de fase aguda y en algunos casos la muerte. La naturaleza de este antígeno puede variar. Las micobacterias, proteínas, haptenos e incluso los tejidos injertados pueden inducir RHR. La histología de estas reacciones puede variar entre especies, pero las características generales son la aparición de células inmunes en la zona de la inyección, macrófagos y basófilos en los humanos y ratones o neutrófilos en los conejillos de Indias, y la induración que aparece en 24-72 horas. Aunque representa un porcentaje pequeño (10-20%) de las células inflamatorias a las 48, las células T (CD4 o CD8 dependiendo del antígeno) son imprescindibles para el comienzo de la reacción (*Aderem A. y col., 1999, Abbas A. y col. 2004*).

7. - PRUEBA DE TUBERCULINA DESCRITA POR GONZALEZ (1999)

La tuberculina usada para la prueba intradérmica es un derivado proteico purificado (PPD) preparado de un cultivo de cepas de *M. bovis* en un laboratorio.

Esta prueba, basada en una herramienta de respuesta celular inmune, puede ser utilizada para inoculación en el pliegue anocaudal o en la tabla del cuello con una jeringa insulínica (inoculación solamente con tuberculina bovina) o también se puede utilizar para una prueba comparativa (inoculación con tuberculina bovina y tuberculina aviar) en la tabla del cuello o en el pliegue anocaudal. Recientemente, mas pruebas serologicas y celulares han sido desarrolladas

La prueba consiste en medir el pliegue anocaudal e inocular 0.1 ml de ppd bovino. Cuando se realiza la prueba comparativa, se inoculan 0.1 ml de ppd aviar a 2 cm de distancia del sitio de inoculación del ppd bovino. El sitio de inoculación se examina aproximadamente 72 ± 6 horas después, y la evidencia principal de una reacción es el edema o un endurecimiento en el sitio de inoculación, se considera positivo a *M. bovis* cuando el incremento pasa 4 mm más a la medida que se tomo antes de la inoculación y cuando solo hay un incremento entre 2-4 mm se considera como reacción sospechosa. En el otro sitio una reacción aviar es considerada positiva sí la medida de la piel a las 72 hrs post-inoculación rebasa los 3 mm.

VII. MATERIALES Y METODOS

Para lograr este objetivo realizó la prueba anocaudal con tuberculina en animales que tenían antecedentes de ser alimentados con sobrantes de dietas bovinas.

Los animales seleccionados para este estudio se escogieron al azar en dos establos de la Comarca Lagunera.

MATERIAL

El material utilizado en este estudio para el diagnostico fueron 50 ovejas hembras, ppd (derivado proteico purificado) bovino, jeringas insulnicas para la aplicación del ppd, un vernier para hacer la medición del pliegue anocaudal y marcadores de ganado para una mejor identificación.

VI.I. PROCEDIMIENTO DE SELECCION

Para tener un control de los animales seleccionados se utilizó el número de arete con que contaban para el control y manejo en el establo.

El trabajo lo dividimos en dos partes, en la primera se seleccionaron solo 10 ovinos de un rebaño tomando en cuenta que a estos se les alimentaba con sobrantes de dietas de bovino.

En esta primera parte el propósito fue entender y probar el manejo de la tuberculina lo cual nos ayudaría para que el manejo de las ovejas restantes fuera mejor y no tuviéramos error alguno.

En la segunda parte se seleccionaron a los 40 ovinos restantes de la misma manera que a los primeros 10. Su selección fue al azar tomando en cuenta el estado de salud y condición corporal. En este rebaño se tienen antecedentes de alimentación con sobrantes de raciones de bovinos lecheros infectados de tuberculosis.

VII.II. TECNICA UTILIZADA EN LA PRUEBA ANOCAUDAL CON TUBERCULINA

A los ovinos seleccionados se les midió el lado izquierdo del pliegue anocaudal con un vernier, y posteriormente se les aplicó 0.1 ml de ppd bovino intradérmico, según la técnica descrita por González y colaboradores (1999). Posteriormente se realizaron las mediciones del pliegue a las 24, 48 y 72 horas posteriores teniendo la precaución de medir en el punto en donde se hizo la inoculación .

Tomando como base la interpretación de la prueba anocaudal descrita en bovinos por González y colaboradores (1999). Se realizaron las mediciones a cada una de las ovejas seleccionadas tomando en cuenta que si el grosor de la piel tenía más de 5 mm se consideran rectoras positivas a tuberculosis y aquellas que tuvieran menos de 5 mm se consideran negativas.

A las ovejas que presentaron una inflamación en el pliegue anocaudal de más de 5 mm se les realizó una segunda prueba comparativa utilizando ppd bovino además de utilizar ppd aviar, en este caso la prueba se realizó en la tabla del cuello, se rasuró la piel y se midió con el vernier antes de inocular el ppd bovino, se anotó cuánto midió la piel, y por último se tomó la lectura a las 72 horas después de la inoculación.

VIII. DISCUSION Y RESULTADOS

En el presente estudio se evaluaron 50 animales hembras ovejas de la raza pelybuey con cruza de black belly, los resultados no demuestran que exista una infección con *M. bovis* en estos animales.

Los datos obtenidos de este estudio dio que el 14% de las ovejas resulto positivo a la prueba anocaudal, y al realizarles la prueba cervical comparativa resultaron negativas, otro 30% de las ovejas tuvieron una reacción inconstante, otro 28% no presentó ninguna reacción y por ultimo el 28% restante tuvieron una ligera reacción.

Los resultados obtenidos demuestran que en estos animales muestreados no hay presencia de *M. bovis* o que existe una posible infección pero la prueba que fue utilizada en este estudio podría no ser la adecuada en esta especie, y necesitaría realizarse una prueba mas especifica para esta especie como por ejemplo una prueba de ADN u otra técnica que sea más sensible, ya que los resultados obtenidos no aseguran una infección.

Estos resultados hacen suponer que existe la posibilidad de que las ovejas si se infecten con tuberculosis por medio de la alimentación con sobrantes de las dietas de bovinos infectados, ya que si observamos en la grafica 1 los resultados obtenidos en la primera prueba demuestran que hay una infección con *M. bovis* debido a que se presento una reacción considerable al ppd bovino pero si observamos la grafica de la segunda prueba comparativa de estos mismos animales los resultados nos demuestran que no hay infección ya que no se presentó ninguna reacción.

Cuadro 1. Porcentaje y tipo de reacción a la tuberculina

REACCION OBTENIDA	Reacción considerable	Reacción inconstante	Ligera reacción	Sin reacción
PORCENTAJE	14 %	30%	28 %	28%

Descripción de las graficas:

I. -En la grafica número 1 nos muestra como el 14 % de las ovejas son reactoras positivas, teniendo una medida del pliegue antes de la inoculación de entre 2 y 2.5 promedio entre las 7 que resultaron reactoras.

II. – En la grafica 2 nos ilustra como el 30% de los animales a los que se le realizo la prueba mostraron una reacción inconstante durante las 24, 48 y 72 horas, posteriores a la aplicación de la tuberculina mostrándonos que la mayoría de ellas a las 48 horas presentaba una inflamación considerable en el pliegue pero a las 72 horas la inflamación había cedido considerablemente.

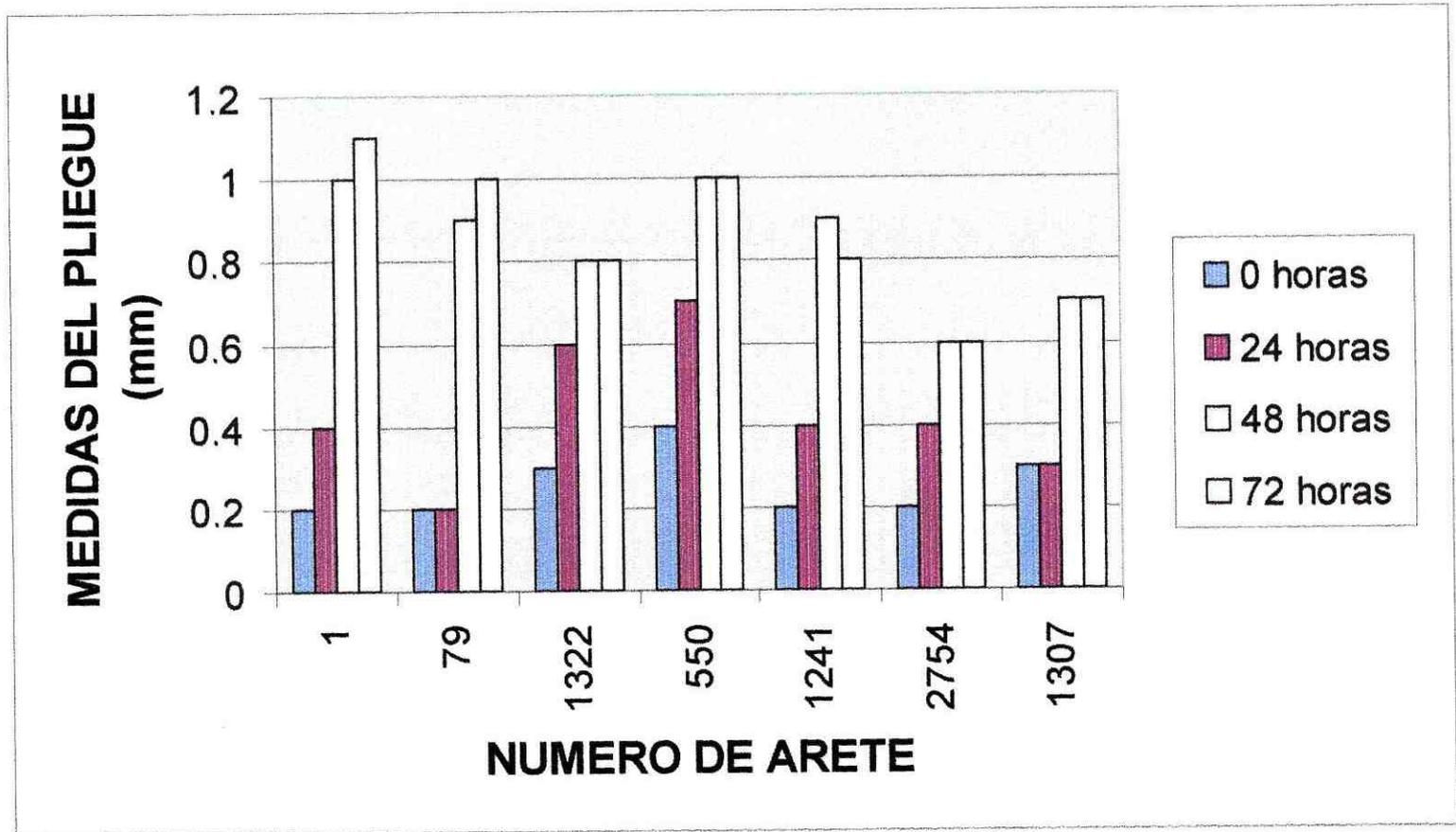
III. – En la grafica 2.1 nos muestra de igual manera las mediciones inconstantes de algunas de las ovejas sujetas al estudio.

IV.- La grafica 3 muestra a los animales que no tuvieron reacción alguna al PPD.

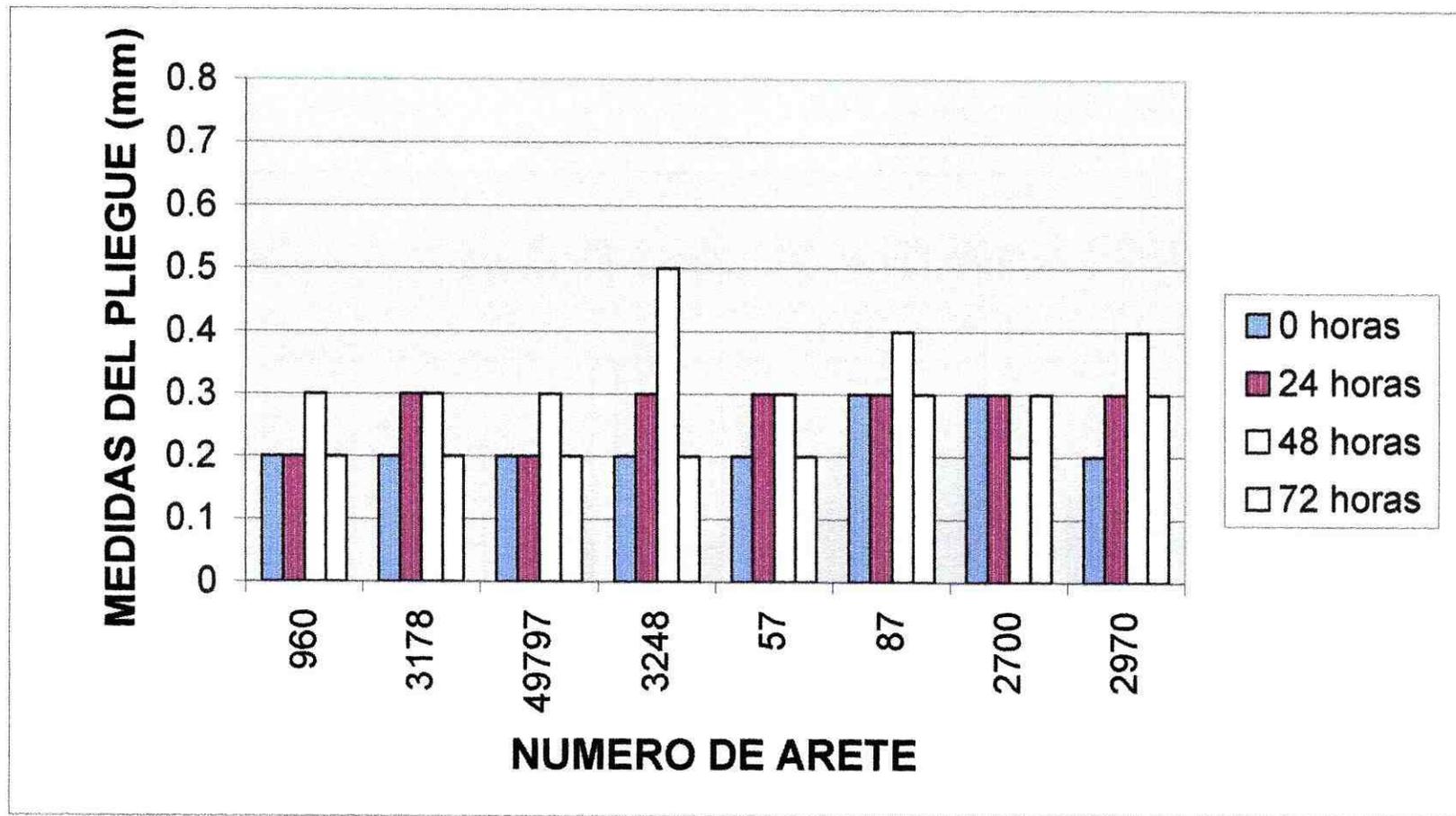
V. – En la grafica 3.1 de igual manera que la tres nos muestra el número de ovejas que no tuvieron reacción.

VI. – En la grafica 4 se muestra el número de animales que tuvieron reacción al PPD bovino.

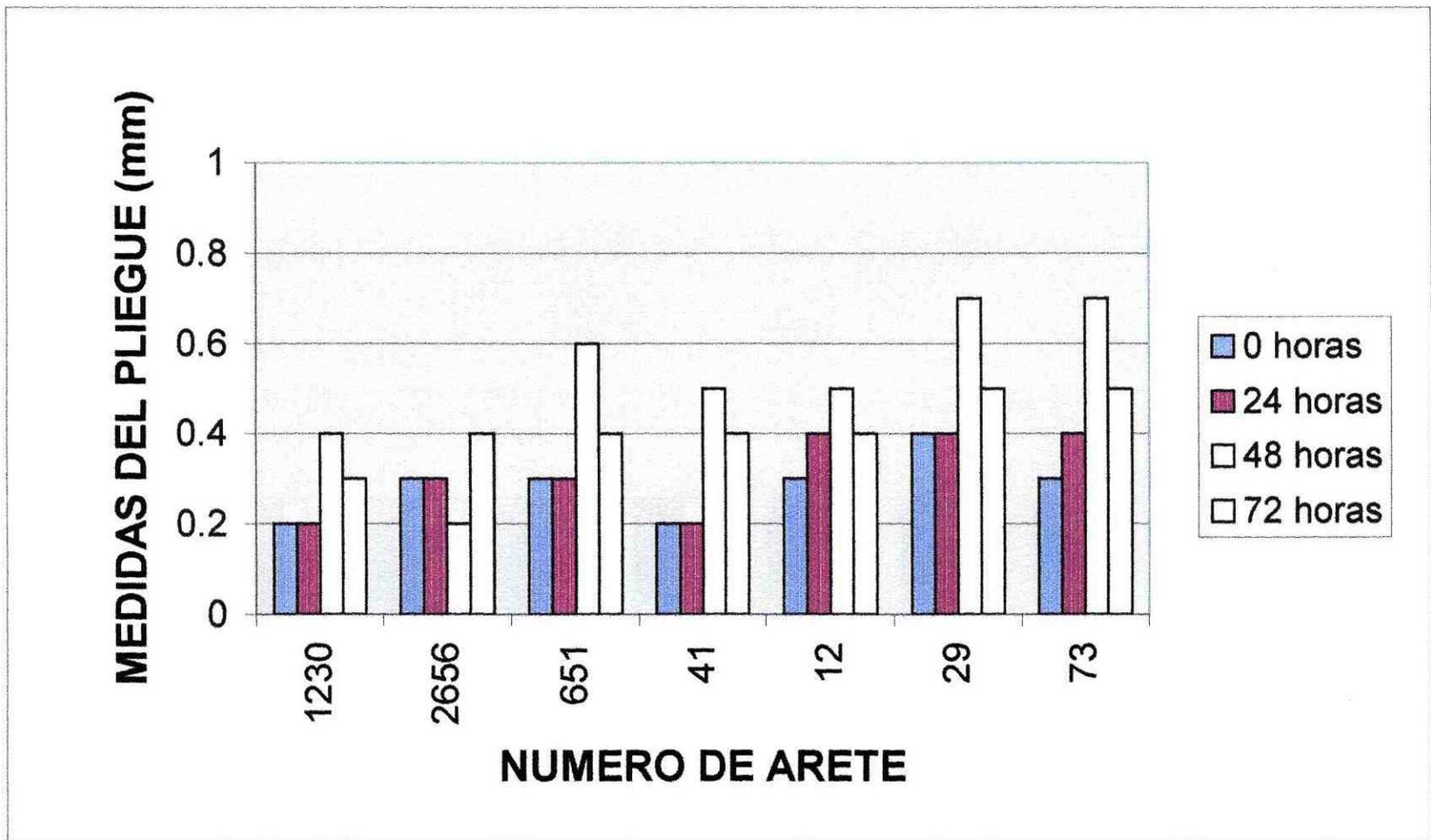
VII. – Por ultimo en la grafica 5 muestra los resultados obtenidos de la prueba comparativa realizada a los animales que dieron positivo a la prueba ano-caudal.



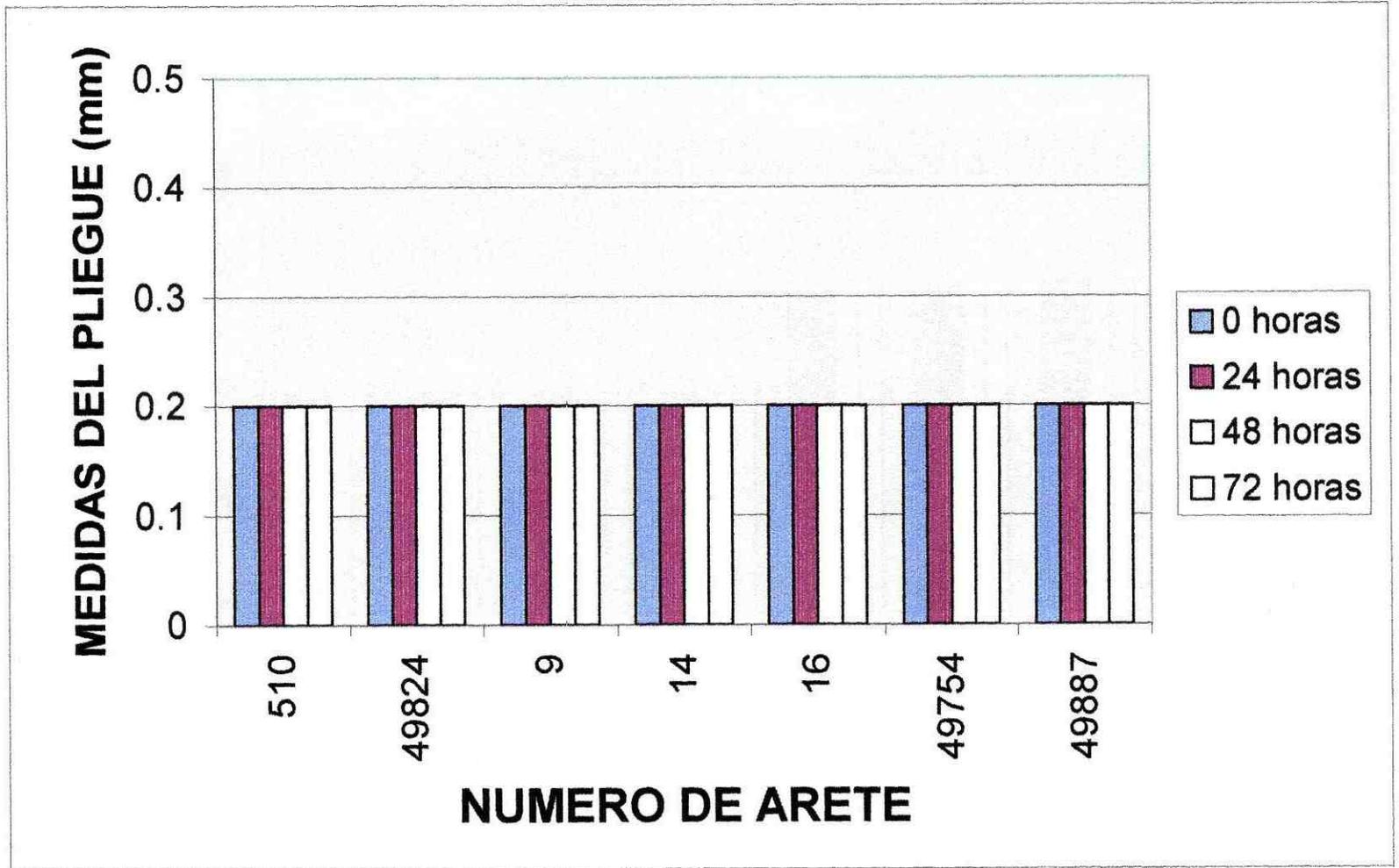
GRAFICA 1. – En esta grafica se muestra la cantidad de animales que se consideran reactores positivos a Tuberculosis en la primera prueba.



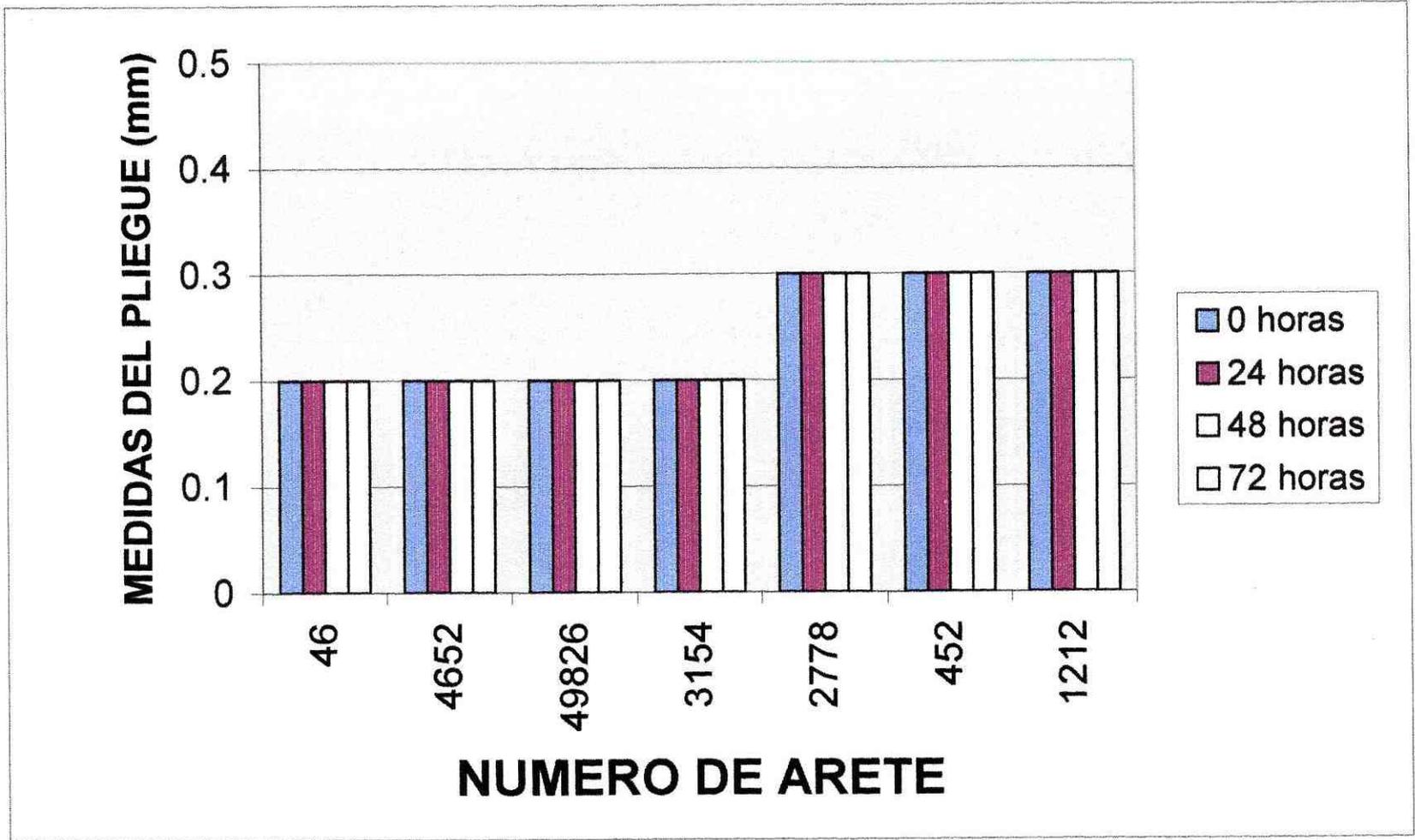
GRAFICA 2. – Grafico de animales que mostraron una reacción inconstante a la prueba anocaudal



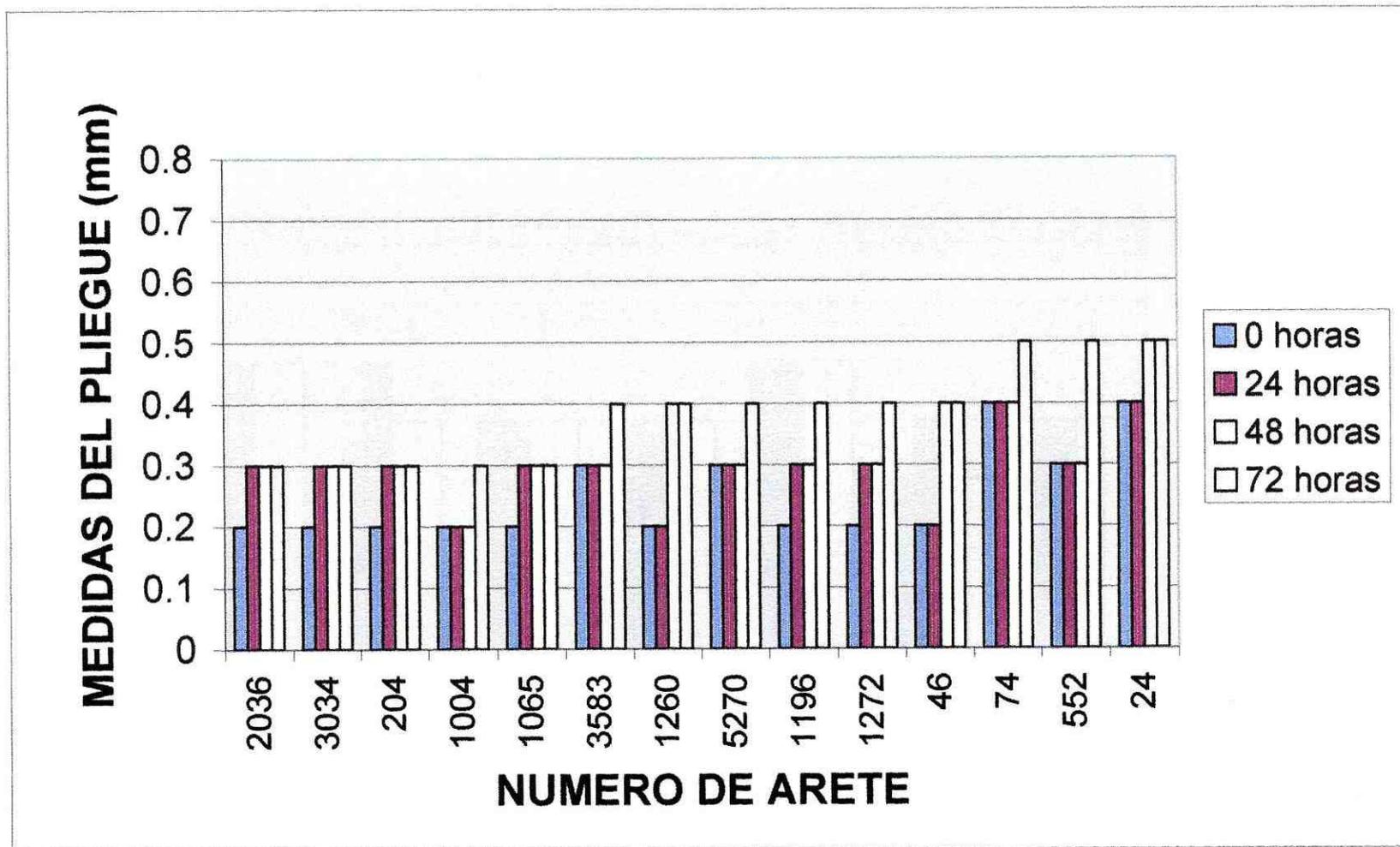
GRAFICA 2.1 continuación del grafico 2 en donde se muestran los datos de los animales que tuvieron una reacción inconstante



GRAFICA 3. – Animales que no reaccionaron a la prueba anocaudal.

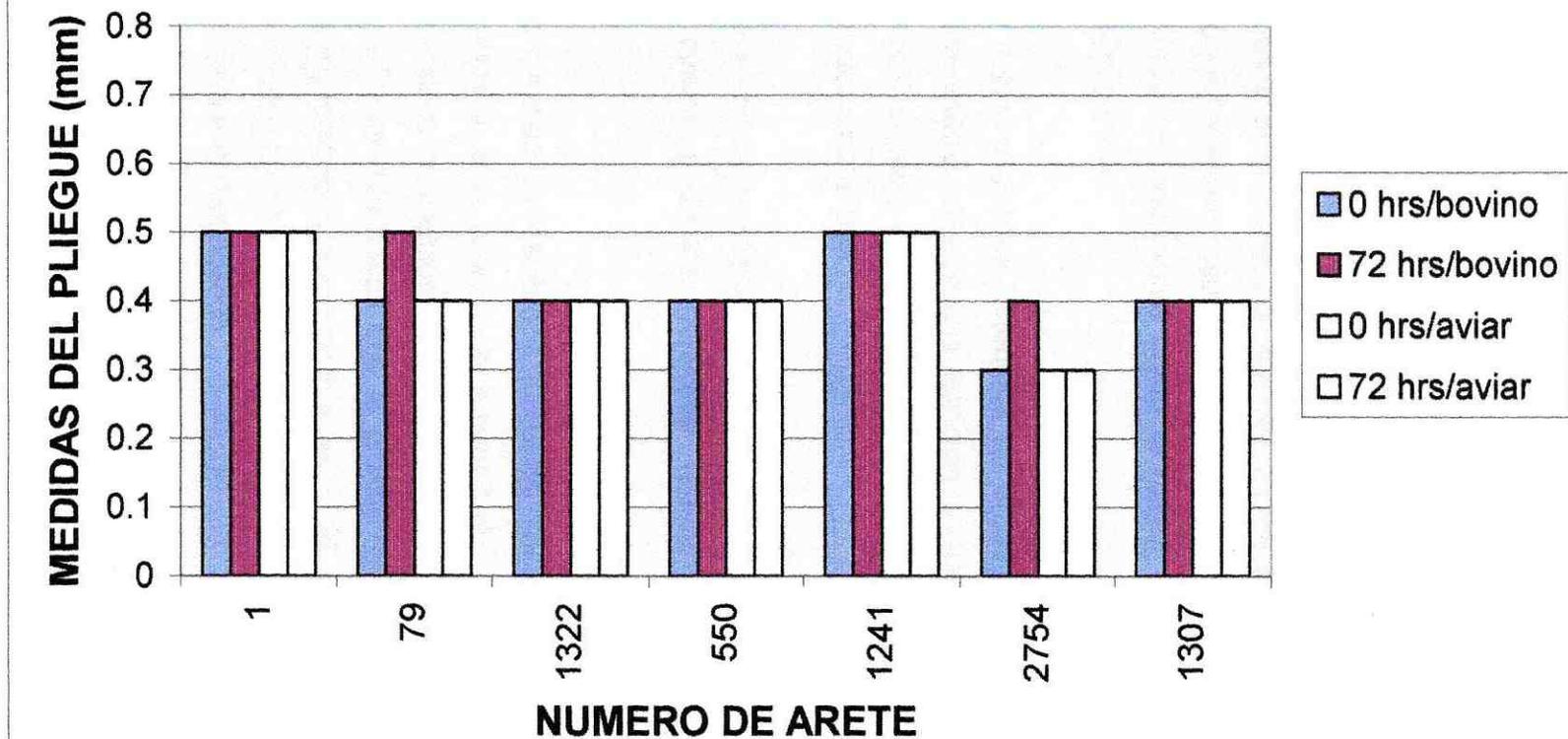


GRAFICA 3.1. – Animales que no reaccionaron a PPD bovino



GRAFICA 4. - Ovejas que tuvieron una ligera reacción a la prueba

PRUEBA DOBLE COMPARATIVA



GRAFICA 5. – Prueba cervical comparativa realizada a los animales que dieran positivo a la prueba ano-caudal.

VIII. CONCLUSIONES

La tuberculosis (Tb) causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) es una de las principales enfermedades en medicina veterinaria y que afecta a los humanos. *M. bovis* es reconocida mundialmente como el mayor agente responsable de la tuberculosis (Tb) en el ganado.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que los animales muestreados en este estudio tuvieron una reacción la cual no se puede tomar como positiva a Tuberculosis causada por *M. bovis* ya que al realizarles la prueba cervical comparativa no reaccionaron al ppd.

Sin embargo, estos datos nos pueden servir como base para seguir realizando pruebas en las cuales podamos confirmar realmente animales positivos a Tuberculosis.

Por otro lado también los resultados obtenidos nos indican que algunas cabras presentaron una reacción a la prueba de tuberculina, sin embargo, al realizar la prueba doble comparativa, la reacción no fue específica. Este hecho podría ser dado por mycobacterias atípicas que hacen que la prueba de reacción se manifieste, o bien a otro tipo de mycobacteria como podría ser el *M. paratuberculosis*. Situación que en el presente trabajo no se tiene el alcance debido a que se requieren otro tipo de estudios para confirmar el diagnóstico.

IX. LITERATURA CITADA

- 1.- Abbas Abal K. 2002. Inmunología Celular y Molecular. 4e. Editora Mc Graw-Hill Interamericana. Pág. 419-460.
- 2.- Aderem Alan y Underhill David M. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17:593–623
- 3.- Aranaz A., Cousins D. Mateos A. y Domínguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol.* 53;1785–1789.
- 4.- Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Domínguez L., D. Vidal, Domingo M., González, Rodríguez-Ferri E., Bunschoten A., A. van Embden J., and Cousins D. 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:2734–2740.
- 5.- Aranaz A., y Liébana E., Gómez-Mampaso E., Galán Juan, Cousins D., Ortega A., Blázquez J., Baquero F., Mateos A., Suárez G. and Domínguez L. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1263–1273.
6. - Costello E., O'Grady D., Flynn O., O'Brien R., Rogers M., Quigley F., Egan J., and Griffin J. 1999. Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *J. Clin. Microbiol.* 37:3217–3222.

7.- Cousins Debby, Williams Suzette, Liebana Ernesto, Aranaz Alicia, Bunschoten Annelies, Van Embden Jan, and Ellis Trevor. 1998. Evaluation of Four DNA Typing Techniques in Epidemiological Investigations of Bovine Tuberculosis. *J. Clin. Microbiology*, 36:168–178.

8.- Eler Wilfried, Martin Gerald, Sachse Konrad, Naumann Ludmila, Kahlau Dagmar, Beer Jorg, Bartos Milan, Nagy Gyorgy, Cvetnic Zeljko, Zolnir-Dovc Manca, and Pavlik Ivo. 2004. Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium bovis subsp. caprae* Isolates from Central Europe. *J. Clin. Microbiology*, 2234–2238.

9.- Espinosa de los Monteros L. E., Galán J.C., Gutiérrez M., Samper S., Marín J., Martín C., Domínguez L., L. de Rafael, Baquero F., Mampaso E., and Blázquez J. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 36:239–242.

10- Euzeby J. P. 2002. *Mycobacterium bovis subsp. caprae*. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire. 1-12.

11.- Gutiérrez M., Samper S., Gavigan J., García Marín J., and Martín C. 1995. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J. Clin. Microbiol.* 33:2953–2956.

12.- Gutiérrez M., Samper S., Jiménez M. S., D. van Embden J., Marín J., and Martín C. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:3328–3330.

13.- Goldsmid John. 1994. *Mycobacteria Pathological Basis of Disease*. 1-5.

14.- Griffin J. Frank. 2000. *Veterinary Tuberculosis Vaccine Development*. *Clinical Infectious Diseases*. 30:223–228.

- 15.- Gwozdz, J., M. Reichel, A. Murria, W. Manktelow, D. West, K. Thompson. 1997. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis in ovine tissues and blood by the polymerase chain reaction, 51; 233-244.
- 16.- Haddad N., Ostyn A., Karoui C., Masselot M., Inwald J., Hewinson R. and Durand B. 2001. Spoligotype Diversity of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in France from 1979 to 2000. *J. Clin. Microbiology*, 3623–3632.
- 17.- Huard R., De Olivera L., Ray Butler W., Van Soolingen D. and L. Ho John. 2003. PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions *Clin. Microbiology*, 41;1637–1650.
- 18.- Kubica T., Rusch-Gerdes Sabine, and Niemann Stefan. 2003. *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Caused One-Third of Human *M. bovis*-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiology*, 41;3070–3077.
- 19.- Llamazares G. O., Gutiérrez C., Álvarez D., V. de la Puente Redondo, Domínguez L. and Rodríguez E. 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon- γ assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain, 70; 55-66.
- 20.- Mondragón-Barreto M., Vázquez C., Barrón C., Acosta P. and Jost K. 2000. Comparison among three methods for *Mycobacteria* identification. *Salud Publica Méx.* 42;484-489.
- 21.- Milián F., Sánchez Luisa M., Toledo P., Ramírez C. and Santillán M. 2000. Descriptive Study of Human and Bovine Tuberculosis in Querétaro, México, 42:13-19.

- 22.- Niemann S., Richter E. and Rusch-Gerdes Sabine. 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. Microbiology*, 152–157.
- 23.- Niemann S., Harmsem D., Rusch-Gerdes Sabine and Richeter E. 2000. Differentiation of Clinical *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolates by *gyrB* DNA Sequence Polymorphism Analysis. *J. Clin. Microbiology*, 3231–3234.
- 24.- Njanpop-Lafourcade Berthe M., Inwald Jacqueline, Ostyn Annick, Durand Benoit, Hughes Steven, Thorel Marie-Francoise, Hewinson Glyn, and Haddad Nadia. 2001. Molecular Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates from Cameroon. *J. Clin. Microbiology*, 39 ;222–227.
- 25.- Prodingler Wolfgang M., Eigentler A., Allerberger F., Schönbauer M. and Glawischnig W. 2002. Infection of Red Deer, Cattle, and Humans with *Mycobacterium bovis subsp. caprae* in Western Austria. *J Clin. Microbiology*, 40; 2270–2272.
- 26.- Phillips C.J.C., Foster C.R.W., Morris P.A. and Teverson R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science* 74;1–15.
- 27.- Richard S., Clifton-Hadley, Carola M., Sauter-Louis., Ian W. L., Ronald Jackson, Peter A. Durr, and John W. Wilesmith. 2001. *Mycobacterial Diseases*. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 340-361.
- 28.- Serraino A., Marchetti G., Sanguinetti V., Rossi María. C., Zanoni R., Catozzi L., Bandera A., Dini W., Mignone W., Franzetti F. y Gori A. 1999. Monitoring of Transmission of Tuberculosis between Wild Boars and Cattle: Genotypical Analysis of Strains by Molecular Epidemiology Techniques. *J. Clin. Microbiology*, 2766–2771.

29.- Skuce R. A., Brittain D., Hughes M. S. and Neill S. D. 1996. Differentiation of *Mycobacterium bovis* Isolates from Animals by DNA Typing. *J. Clin. Microbiology*, 34;2469–2474.

30.- Vercellone Alain, Nigou Jerome, Puzo Germain. 1998. Relationships between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis patogénesis. *Front Biosci*, 3;e149-63.