

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

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA POR  
TÉCNICAS TRADICIONALES EN EXUDADO NASAL DE  
BOVINOS LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

**P O R**

**RODOLFO MENDOZA APOLONIO**

**T E S I S**

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAH., MÉXICO.**

**NOVIEMBRE DE 2005.**

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

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA POR  
TÉCNICAS TRADICIONALES EN EXUDADO NASAL DE  
BOVINOS LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA**

**T E S I S**

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA**

**RODOLFO MENDOZA APOLONIO**

**ASESOR**



---

**DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO**

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

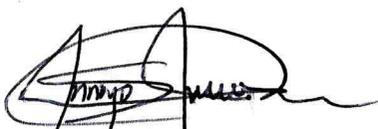
**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**TESIS**

**DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA POR  
TÉCNICAS TRADICIONALES EN EXUDADO NASAL DE  
BOVINOS LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA.**

**APROBADA POR EL COMITE PARTICULAR DE  
REVISIÓN**

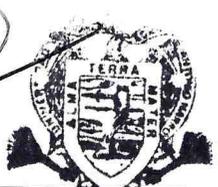
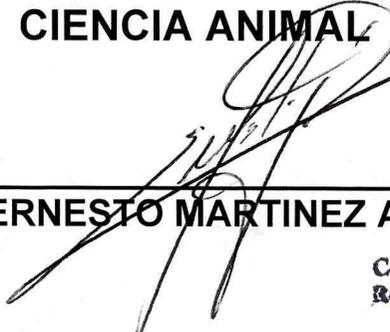
**PRESIDENTE DEL JURADO**



---

**DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO**

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



---

**M.S.P. ERNESTO MARTINEZ ARANDA**

**Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL**

**TORREÓN, COAH., MÉXICO.**

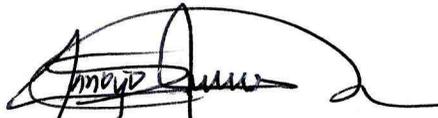
**NOVIEMBRE DE 2005.**

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

**DETECCIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA POR TÉCNICAS  
TRADICIONALES EN EXUDADO NASAL DE BOVINOS  
LECHEROS DE LA COMARCA LAGUNERA.**

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

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**



---

**DR. JESÚS VÁSQUEZ ARROYO  
PRESIDENTE**



---

**MVZ E.P. MA. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE  
VOCAL**



---

**MVZ. JOSÉ LUIS GÜEMEZ JIMÉNEZ  
VOCAL**



---

**MVZ. SILVESTRE MORENO ÁVALOS  
VOCAL SUPLENTE**

**TORREÓN, COAH., MÉXICO.**

**NOVIEMBRE DE 2005.**

## AGRADECIMIENTOS

**Al Consejo Estatal De Ciencia y Tecnología por brindarme una beca económica para la realización de esta tesis.**

**A mis padres por que no pudieron haberme dado mejor regalo que la vida y mejor herencia que mi carrera ya que siempre me apoyaron en todo sin pedirme nada a cambio.**

**A mis hermanos por darme cariño, consejos y apoyo siempre haciendo a veces cosas que nunca olvidare.**

**A mis cuñadas por alegrarme en muchos momentos de tristeza.**

**A mi novia por que siempre me apoya y ayuda en momentos difíciles y de desesperación, circunstancias difíciles que jamás olvido.**

**A mi sobrina por su alegría inigualable.**

**Al doctor Jesús Vásquez Arroyo por su paciencia en las aulas cuando me dio clases y su gran apoyo incondicional como mi asesor en la elaboración de esta tesis.**

**A los Médicos Veterinarios Ma. Hortensia Cepeda E., José Luis Güemez J. y Silvestre Moreno A. Por ayudarme en la revisión de esta tesis.**

**A la Q.B.P. Sara Elisa Alonzo R. Por apoyarme en el laboratorio al momento de correr mis muestras así como también a la Q.F.B. Marisela del Roció Gonzáles M.**

**A mis maestros que sin conocerme y sin ofrecerles nada a cambio siempre me transmitieron sus conocimientos y experiencias profesionales.**

**A mi amigo J. Jesús Espino por su inigualable amistad y compañía.**

**A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna por que siempre me brindo facilidades y beneficios durante mi estancia dentro de sus instalaciones.**

## DEDICATORIAS

### **A mis padres.**

Por que siempre me apoyaron sin medida y me dieron consejos por haber terminado mis estudios ya que siempre estuvieron pendientes de mi y sobretodo en los momentos más difíciles de mi carrera.

### **A mis hermanos y cuñadas.**

**Lucino y Octaviano.**

**Obsvelia y Jaquelin.**

Por que siempre me dieron comprensión, cariño y sobre todo ánimos de seguir adelante sin importar las situaciones que se presentan en casa.

### **A mi novia.**

**Roxana Rico.**

Que siempre me acompañó en situaciones difíciles dentro de la escuela y se preocupó por mí cuando andaba mal ya que cada vez que la necesitaba siempre estaba para apoyarme y ayudarme a tomar decisiones.

### **A mi sobrina.**

**Lis Karen.**

Por compartir su infancia en vacaciones y darme mucha alegría en apenas sus 2 años de vida.

### **A mis amigos.**

A mis amigos de salón y de la escuela así como de fuera por darme su amistad sin esperar nada a cambio y que muchas veces se quedaron a mi lado en situaciones de tristeza en especial a J. Jesús Espino ya que fue el mejor de todos, por que siempre se preocupó por mí como un hermano.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|   | Págs. |
|---|-------|
| DEDICATORIAS.....   | I     |
| AGRADECIMIENTOS.....  | II    |
| RESUMEN.....  | 1     |
| ABSTRACT.....   | 2     |
| I. INTRODUCCIÓN.....  | 3     |
| OBJETIVOS.....  | 5     |
| HIPÓTESIS.....  | 6     |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA.....                                   | 7     |
| 2.1 DESARROLLO HISTÓRICO.....                                     | 7     |
| 2.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MICOBACTERIAS.....                     | 8     |
| 2.3 CLASIFICACIÓN Y TAXONOMÍA DE MICOBACTERIAS.....               | 10    |
| 2.3.1 Taxonomía del <i>Mycobacterium bovis</i> .....              | 11    |
| 2.3.2 Micobacterias productoras de tuberculosis.....              | 11    |
| 2.3.3 Micobacterias productoras de lesiones granulomatosas.....   | 12    |
| 2.3.4 Micobacterias productoras de lesiones nódulo ulcerosas..... | 12    |
| 2.3.5 Micobacterias productoras de lepra.....                     | 12    |
| 2.3.6 Micobacterias que afectan las mucosas.....                  | 12    |
| 2.4 SALUD PÚBLICA.....  | 14    |
| 2.4.1 Pérdidas económicas por tuberculosis bovina.....            | 14    |
| 2.5 ETIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....                      | 15    |
| 2.6 EPIDEMIOLOGÍA.....  | 16    |
| 2.7 INCIDENCIA.....   | 17    |
| 2.7.1 Incidencia Mundial.....                                     | 17    |
| 2.7.2 Incidencia Nacional.....                                    | 17    |
| 2.7.3 Incidencia Regional.....                                    | 18    |
| 2.8 TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....                    | 18    |
| 2.8.1 Reservorios y Periodo de Incubación.....                    | 19    |
| 2.9 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....                      | 20    |
| 2.9.1 Periodo de Diseminación.....                                | 24    |
| 2.10 SIGNOS CLÍNICOS DE LA TUBERCULOSIS EN LOS BOVINOS.....       | 26    |
| 2.11 LESIONES DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....                      | 26    |
| 2.11.1 Formas de la Tuberculosis.....                             | 27    |
| 2.12 DIAGNÓSTICO.....   | 29    |
| 2.12.1 Prueba de la Tuberculina.....                              | 29    |
| 2.12.2 Tuberculización.....                                       | 30    |
| 2.12.3 Análisis Histopatológico.....                              | 33    |
| 2.12.4 Baciloscopía.....  | 33    |
| 2.12.5 Análisis Microbiológico.....                               | 39    |
| 2.12.6 Cultivo Microbiano.....                                    | 39    |
| 2.12.7 El medio de Cultivo Middlebrook 7H10.....                  | 40    |
| 2.12.8 Sistema BACTEC.....  | 41    |
| 2.12.9 Pruebas Serológicas.....                                   | 42    |
| 2.12.10 Diagnóstico Molecular por PCR.....                        | 42    |
| 2.13 CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS.....               | 44    |

|   |    |
|---|----|
| 2.13.1 Vacunación en humanos.....                       | 45 |
| 2.13.2 Tratamiento.....                                 | 46 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS.....                            | 48 |
| 3.1 Localización Geográfica de la Comarca Lagunera..... | 48 |
| 3.2 Sitio de Muestreo.....                              | 48 |
| 3.3 Obtención y Procesamiento de muestras.....          | 49 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                         | 51 |
| CONCLUSIONES.....                                       | 57 |
| LITERATURA CITADA.....                                  | 58 |

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### Figuras

1. Factores atribuidos a la pared celular del *Mycobacterium tuberculosis* que le permite escapar de las defensas del organismo..... 23
2. Consecuencias duales de la activación de los macrófagos..... 25
3. Lectura en sentido de las manecillas del reloj para baciloscopia..... 36
4. Observación de los campos útiles para la lectura de la baciloscopia..... 36
5. Cuadrícula para registrar los hallazgos de bacilos en la lectura..... 37
6. Baciloscopia directa de exudado nasal por la técnica de Ziehl-Neelsen. *M. bovis* se ve como pequeños bastones rojo oscuro sobre fondo azulado..... 38

### Cuadros

1. Clasificación realizada por Timpe y Runyon de las Micobacterias de acuerdo a su velocidad de crecimiento y fotoluminosidad..... 13
2. Interpretación de medidas de la prueba de tuberculina doble comparativa..... 33
3. Resultados de las pruebas del experimento y datos de las vacas..... 54

## RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso crónico progresivo que afecta una gran cantidad de especies animales incluyendo al hombre, es causada por *Mycobacterium bovis*; es considerada la principal causa de muerte debido a un solo agente infeccioso, además provoca grandes pérdidas económicas en el sector ganadero tanto de carne como de leche. Se analizaron 85 bovinos lecheros provenientes de tres establos, 70 determinados positivos por la Campaña Nacional contra la tuberculosis y 15 animales negativos a esta prueba utilizados como control. El objetivo fue determinar la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en exudado nasal mediante la tinción de Ziehl-Neelsen y cultivo en Middlebrook 7H10. Las muestras se tomaron de exudado nasal con hisopos estériles de 15 cm transferidos a tubos con solución salina 0.85 % éstas se descontaminaron por el método de Pertroff, se prepararon frotis y siembra en tubos de cultivo. Del total de muestras analizadas 7 cultivos fueron presuntivamente positivos (15 semanas de incubación) al cultivo y 9 positivos por Ziehl Neelsen con una sensibilidad de 88.9% y especificidad de 18.4% y para cultivo 71.4% de sensibilidad con 16.7 de especificidad. Se concluye que el medio de Middlebrook 7H10 es inadecuado para el crecimiento de *Mycobacterium bovis*.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Ziehl Neelsen, BAAR (Bacilos Acido Alcohol Resistentes), Middlebrook 7H10.

## ABSTRACT

The bovine tuberculosis is an infect-contagious illness of progressive chronic course, that affects a great quantity of animal species including the man, this disease is caused by *Mycobacterium bovis*; the main cause of death is considered due to a single infectious agent. In addition causes economic lost in the dary cattle sector so much of meat as of milk. Eigthy five bovine milkmen coming from three stables were analyzed, 70 certain positive for the National Campaign against the tuberculosis and 15 negative animals to this test used as control. The objective was to determine the presence of the complex of *Mycobacterium tuberculosis* in having perspired nasal by means of the stain of Ziehl-Neelsen and cultivation in Middlebrook 7H10. The samples were took nasal with sterile hyssops of 15 cm transferred to tubes with solution saline 0.85% these were decontaminated by the method of Pertroff and they prepared smear and put in cultivation tubes. Out or 8 samples analyzed by cultivation were positive presutly (15 weeks of incubation) at the cultivation and out of 9 positive for Ziehl Neelsen with a 88.9% sensibility, 18.4% specificity for cultivation and 71.4% sensibility with 16.7% of specificity. It is assumed concludes that the means of Middlebrook 7H10 are inadequate for the growth of *Mycobacterium bovis*.

**Key Words:** *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, Ziehl Neelsen, BAAR (Resistant Bacillus Acid Alcohol), Middlebrook 7H10.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de leche de bovino, es una rama de la ganadería de mayor relevancia a nivel nacional ya que no solo se le confiere un alto valor por el tipo de alimento que aporta, si no que juega un papel fundamental dentro de la economía del sector primario e industrial, además de presentar el mayor potencial de expansión a fin de sustituir el importante componente de abasto procedente del exterior (Gallardo-Nieto *et al.*, 2004).

El ganado lechero en México se desarrolla en condiciones muy heterogéneas, tanto desde el punto de vista tecnológico y socioeconómico, como por la localización de las explotaciones. Además dada la variabilidad de condiciones climatológicas, las explotaciones adquieren características propias de la región, influyendo adicionalmente la idiosincrasia, tradición, costumbres y enfermedades como es el caso de la tuberculosis bovina (Gallardo-Nieto *et al.*, 2004).

La tuberculosis es una enfermedad que ha acompañado al hombre a lo largo de su historia y que todavía no se encuentra erradicada. Por el contrario, la tuberculosis produce actualmente el mayor número de muertes teniendo su origen en un solo agente infeccioso. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, de entre los cuales un 5- 10% del total de infectados desarrollaran la enfermedad. Según la Organización Mundial de la Salud (Soto-Ospina, 2002).

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica, que se desarrolla en un determinado contexto de riesgo ambiental, social, sanitario e individual. Es prevenible, curable y su prevalencia tiende a disminuir naturalmente; sin embargo, en las últimas décadas hubo un aumento, tanto en incidencia como en su severidad (Broglia *et al.*, 2002).

La tuberculosis bovina constituye un grave problema de salud animal y un riesgo en la salud pública. El agente causal, es el *Mycobacterium bovis*, y esta ampliamente distribuido en México. En la actualidad la Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina considera los estados fronterizos

del norte, Quintana Roo y Yucatán, en etapa de erradicación con excepción de Baja California Norte y al resto del territorio nacional en control (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

El diagnóstico de la tuberculosis se ha basado fundamentalmente en la identificación del bacilo tuberculoso, la aplicación de la tuberculina y con menor frecuencia el examen histológico; sin olvidar la baciloscopia mediante la tinción Ziehl-Neelsen siendo una de las herramientas más importantes para la detección del bacilo tuberculoso con el inconveniente que requiere 10 000 bacterias y no es específico para el complejo *Mycobacterium*. A pesar de ello, la demostración del bacilo en cultivo el cual tiene gran sensibilidad, son los métodos más usados para el diagnóstico (Soto-Ospina, 2002).

La identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se ha hecho mediante técnicas como PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), cultivo líquido (Sistema BACTEC), pruebas Serológicas entre otras (Badillo-Rosales, 2004).

En el presente estudio se buscó determinar la presencia de tuberculosis bovina en exudado nasal, así como conocer la sensibilidad y especificidad de métodos tradicionales (cultivo y baciloscopia), en vacas positivas a la prueba de tuberculina en la Campaña Nacional contra la Tuberculosis.

## OBJETIVOS

Estimar la presencia del complejo de *Mycobacterium tuberculosis* en exudado nasal por técnicas tradicionales en bovinos lecheros de la Comarca Lagunera.

Establecer un cepario de *Mycobacterium spp.* a partir de exudados nasales de bovinos lecheros en la Comarca Lagunera.

## HIPÓTESIS

Es posible la identificación del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de exudado nasal de bovinos lecheros por técnicas tradicionales de diagnóstico.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 DESARROLLO HISTÓRICO

La tuberculosis es sin duda una de las enfermedades más antiguas de la humanidad. Entre los años 1907 y 1912 Smith, Rouffer, Fouquet y otros investigadores comprobaron que los huesos de algunas momias egipcias presentaban alteraciones debidas a tuberculosis (Araujo y Waard, 2004), Los griegos la denominaron tempranamente “tisis” (consunción), subrayando su espectacular característica de emaciación en los casos crónicos no tratados (Reyes-Corcho *et al.*, 2004). Es posible que el primer agente causal haya sido *Mycobacterium bovis* o una variante, adquiriendo el hombre la enfermedad al consumir carne o leche de animales enfermos. Se cree que *Mycobacterium tuberculosis* haya surgido posteriormente, como una mutante de *Mycobacterium bovis*; En el siglo XVI Fracastorum hablaba de la transmisión y contagio de la enfermedad. Para 1865 Villemin demostró experimentalmente la contagiosidad y transmisibilidad de la tuberculosis mediante inoculación de material contaminado proveniente de pulmones humanos en conejos. El 24 de marzo de 1882, Roberto Koch comunicó a la Sociedad de Fisiología de Berlín que, mediante coloración con derivados de anilina, había descubierto al bacilo que producía la tuberculosis, de material obtenido de lesiones humanas, y de bovino (Senado-Dumoy, 1999), el cual fue aislado en un medio de cultivo de suero y papa; en 1883 Frank Ziehl y Frederich Neelsen modificaron esta tinción utilizando fucsina, desarrollando de este modo la tinción de Ziehl Neelsen que se utiliza actualmente en la detección de *Mycobacterium* (Soto-Ospina, 2002).

En 1891, como producto exhaustivo de investigación de más de diez años encaminado a obtener la cura de la tuberculosis; Koch descubrió una sustancia obtenida evaporando el filtrado de bacilos tuberculosos cultivados entre 6 y 8 semanas en medio glicerinado, a la que se le denominó el fenómeno de Koch y la tuberculina (Soto-Ospina, 2002).

En 1902, Vallée y Carre notifican sus investigaciones sobre tuberculosis animal, especialmente bovinos, e introducen la noción de que la tuberculosis pulmonar puede contraerse tanto por vía digestiva como por vía respiratoria. En 1906 Calmette revela el principio de la oftalmoreacción en el diagnóstico de la tuberculosis, utilizando una tuberculina que contiene las exo y endotoxinas del bacilo, preparada en caldo glicerinado. Para 1921 se aplicó por primera vez en el hombre, la vacuna del BCG (Araujo y Waard, 2004).

Las sospechas que ligaban la tuberculosis no pulmonar de la niñez debido al consumo de la leche de la vaca fueron destacadas en la literatura científica desde el siglo diecinueve. Sin embargo, cualquier preocupación científica referente al acoplamiento entre la infección micobacterial de los bovinos y la tuberculosis humana fue disipada solamente después de un informe real. Por lo tanto debido a esto, la tuberculosis de los bovinos en el Reino Unido fue desafiada, con esfuerzos veterinarios y científicos. Las medidas empleadas eran inicialmente voluntarias, e inspecciones clínicas rigurosas incluidas con el retiro de ganado enfermo sospechoso de las manadas. Estas prácticas llegaron a ser obligatorias y fueron suplidas eventualmente con la aplicación regular de la tuberculina que probaba detectar ganado infectado, así como programas nacionales de erradicación para la tuberculosis basados en prueba, matanza y restricción de movimiento de animales de granjas infectadas. Esto es muy eficaz, pues la enfermedad en ganado se redujo o suprimió en aquellos países que participaban, la incidencia de la tuberculosis humana causada por *Mycobacterium bovis*, particularmente presentaciones del scrofula en niños y jóvenes, declinó dramáticamente gracias a estas acciones (Neill *et al.*, 2005).

## **2.2 CARACTERISTICAS DE LAS MICOBACTERIAS**

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos de 0.2 a 0.7µm de diámetro y de una longitud de 10 µm, inmóviles, no esporulados, con

abundantes gránulos citoplasmáticos, que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes comunes, pero una vez teñidos son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido (Rodríguez-Cuns, s/f; Soto-Ospina, 2002).

### **Naturaleza de la envoltura de *M. Tuberculosis***

La envoltura bacteriana provee protección y soporte a las bacterias y también poseen mecanismos que permiten el intercambio de sustancias entre la bacteria y el medio ambiente. Hay una marcada similitud tanto química como estructural entre las envolturas de la mayoría de las bacterias. La mayoría de las Micobacterias son biológicamente similares a las bacterias Gram positivas pero tienen aspectos distintos. En las Micobacterias, la envoltura es de naturaleza lipídica en vez de proteínas y lipopolisacáridos, como en otras bacterias; integrada por la membrana plasmática, la pared y la capsula (Soto-Ospina, 2002).

### **Membrana plasmática**

La membrana plasmática cumple básicamente la función de protección osmótica y de transporte de iones y moléculas. Esta conformada por una doble capa de lípidos a la que se le asocian proteínas, lipopolisacáridos y fosfolípidos (Rodríguez-Cuns, s/f).

### **Pared celular**

La base estructural de la pared micobacteriana; pared celular está constituida por tres capas. Con tinciones convencionales su apariencia es:

- **capa interna** moderadamente electrodensa, compuesta por el peptidoglicano cuya estructura es similar a la de otras bacterias (Soto-Ospina, 2002).

- **capa media**, más ancha que la interna, compuesta por el polisacárido, arabinogalactano, cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular y ácidos micólicos, de tamaño y estructura única para las Micobacterias (70-90 átomos de Carbono); los cuales se encuentran fuertemente empaquetados explicando de este modo la alta hidrofobicidad y la resistencia a los antibióticos (Soto-Ospina, 2002).
- **capa externa** de grosor variable, electropaca, de la cual no puede conocerse con las técnicas actuales, su exacta composición, aunque se le atribuye una estructura glucolípida. Aparte de los componentes anteriores se han encontrado proteínas asociadas a la pared, algunas con función enzimática y de porina. Afirmando así la resistencia y la baja permeabilidad de las Micobacterias a las moléculas hidrofílicas (Rodríguez-Cuns, s/f; Soto-Ospina, 2002).

### **La cápsula**

Esta capa externa, constituye la interfase entre la micobacteria y el huésped; tiene entre otras funciones controlar los componentes que pueden entrar al interior de la bacteria, protege del ataque por agentes microbianos, y modula la respuesta inmune del huésped, varía en grosor y apariencia. Esta constituida por polisacáridos, proteínas y pequeñas cantidades de lípidos (Soto-Ospina, 2002).

## **2.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS MICOBACTERIAS**

En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación útil del género *Mycobacterium* en cuatro grupos que se basaba en la velocidad de crecimiento; rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana, producción de pigmento en presencia o ausencia de luz; fotocromógeno, escotocromógeno, no cromógeno y características coloniales (Cuadro 1).

El complejo de *M. tuberculosis* lo constituyen una serie de micobacterias diferenciadas entre si por sus características como es la de afectar al las diferentes especies animales y el hombre. Este, se consideraba constituido por cuatro especies, como son *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*; actualmente, se han agregado nuevas especies a este complejo como son: *M. canettii*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* y el bacilo dassie sin definición de especie (Goh *et al.*, 2005; Mostowy *et al.*, 2005).

### **2.3.1 Taxonomía del *Mycobacterium bovis***

Dominio: *Bacteria*.

Filum: *Actinobacteria*.

Clase: *Actinobacteria*.

Subclase: *Actinobacteridae*.

Orden: *Actinomycetales*.

Suborden: *Corynebacterineae*.

Familia: *Mycobacteriaceae*.

Genero: *Microbacterium*.

Especie: *Mycobacterium bovis* (Prescott *et al.*, 2002; Soto-Ospina, 2002).

### **2.3.2 Micobacterias Productoras de Tuberculosis**

*M. tuberculosis*. Es de lento crecimiento. Es también llamado bacilo de Koch. Afecta primates, hombres, perros, lobos y canarios.

*M. bovis*. Es también de un crecimiento lento en cultivo afecta a animales como: bovinos, cerdos, caballos, cabras, gatos, hombres, ovejas, perros y primates.

*M. avium*. Crece de forma lenta. Afecta a caballos, cabras cerdos ovejas y primates.

*M. microti*. Es de crecimiento lento. Causa tuberculosis en los roedores.

### **2.3.3 Micobacterias Productoras de Lesiones Granulomatosas.**

*M. chelonil.* Daña a peces y bovinos.

*M. fortuitum.* Crece rápidamente. Causa enfermedad en bovinos, cerdos, gatos, perros, ranas y monos.

*M. marinum.* Crece lentamente, afecta animales de agua principalmente peces, anfibios y mamíferos acuáticos.

### **2.3.4 Micobacterias Productoras de Lesiones Nódulo Ulcerosas.**

*M. ulcerans.* Crece de forma lenta afecta a los felino.

*M. xenopi.* Afecta al los sapos y felinos.

*M. phlei.* Afecta a los felinos.

### **2.3.5 Micobacterias Productoras de Lepra**

*M. leprae* bacilo de Hansen, crece en las lesiones pero nunca ha podido ser cultivado; es el causante de la lepra humana y puede ser identificado por laminillas de exudados de las lesiones ulcerosas de humanos infectados, aunque también se ha visto que afecta al armadillo (Davis-D *et al.*, 1984).

*M. lepraemurium.* Crece de forma lenta y daña a los ratones.

*Mycobacterium* de lepra felina. No se hacen cultivos pero se cree que se transmiten por mordeduras, por los piquetes de los artrópodos, así como el contacto con humanos con lepra.

### **2.3.6 Mycobacterium que Afectan las Mucosas**

*M. paratuberculosis.* Crece lentamente produce la enfermedad de Johns en los rumiantes principalmente bovinos y caprinos.

*M. farcinogenes.* Crece lento produce el muermo en los bovinos africanos inflamación de mucosas al igual que el *M. senegalense* teniendo como diferenciación que es de crecimiento rápido.

*M. porcinum*. Es de crecimiento muy rápido produce linfadenitis similar a la tuberculosis (Veterinaria, s/f).

**Cuadro 1.** Clasificación realizada por Timpe y Runyon de las micobacterias de acuerdo a su velocidad de crecimiento y fotoluminosidad (Rodríguez-Cuns, s/f).

| Grupos y subgrupos  | Especies de Micobacterias  | Patología   |
|---|--|---|
| I. Fotocromogenos de crecimiento lento.                   | <i>M. Kansasii (M.licopenogenos)</i><br><i>M. asiaticum.</i>   | Pulmonar, ganglionar, menígea, osteoarticular, urogenital, generalizada.  |
| II. Escotocromogenos de crecimiento lento.<br>a<br>b<br>c | <i>M. lacticus.</i><br><i>M. scrofulceum (M. Marinum)</i><br><i>M. gordoniae (M. Aquae)</i><br><i>M. flavescens</i><br><i>M. ssulgai</i><br><i>M. ulcerans</i><br><i>M. xenopi</i><br><i>M. simiae</i>   | Ganglionar, pulmonar, osteoarticular.<br><br>Pulmonar, ganglionar, articular.<br>Cutánea.<br>Cutánea, urogenital.<br>Pulmonar.  |
| III. No cromogenos de crecimiento lento.                  | <i>M. tuberculosis</i><br><br><i>M. bovis (M. bovis BCG)</i><br><i>M. africanum</i><br><i>M. avium.</i><br><i>M. intracellulare</i><br><i>M. gastri</i><br><i>M. nonchromogenicum</i><br><i>M. terrea (M. novium)</i><br><i>M. triviale</i><br><i>M. aemophium</i><br><i>M. shimodei</i> | Pulmonar, renal, osteoarticular, menígea, intestinal, ganglionar, cutánea, etc.<br>Cutánea, ganglionar, generalizada.<br>Ganglionar, pulmonar, generalizada, osteoarticular.<br><br>Pulmonar. |
| IV. Fotocromogenos de crecimiento rápido.                 | <i>M. marinum (M. balnei)</i>  | Cutánea, articular.   |
| V. Escotocromogenos de crecimiento rápido.<br>a<br>b<br>c | <i>M. engbaekii</i><br><i>M. acapulcense</i><br><i>M. aurum</i><br><i>M. gilvium</i><br><i>M. duvalii</i><br><i>M. neoaurum</i><br><i>M. gadium</i><br><i>M. phlei</i><br><i>M. smegmatis.</i><br><i>M. vaccae</i><br><i>M.parafortuitum</i><br><i>M. thermoresistibile</i>              |   |
| VI. No cromógenos de crecimiento rápido.                  | <i>M. fortuitum (M.peregrinum)</i><br><br><i>M. chelonae</i><br><i>M. chitae</i>   | Cutánea, pulmonar, osteoarticular y ocular.<br><br>Cutánea pulmonar, osteoarticular ocular y menígea.   |

## 2.4 SALUD PÚBLICA

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

Con 10 millones de nuevos casos y tres millones de muertes al año, la tuberculosis es una de las enfermedades infectocontagiosas más importantes del mundo, antecedida solamente por la malaria y el virus de inmunodeficiencia adquirida humana, por lo que se mantiene como una de las enfermedades transmisibles de gran preocupación y ocupación para los sistemas de salud (Mariscal-Mendendez *et al.*, 2005).

La tuberculosis bovina constituye un grave problema de salud animal y humana. El agente causal, *Mycobacterium bovis*, esta ampliamente distribuido en México (Estrada-Chávez *et al.*, 2004). Se caracteriza por un período de latencia prolongado entre la infección inicial y las manifestaciones clínicas en el que predomina la neumopatía (aunque también puede afectar a otros órganos) y una respuesta granulomatosa con inflamación y lesión de los tejidos (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).

### 2.4.1 Pérdidas Económicas por Tuberculosis Bovina

La tuberculosis sigue siendo una enfermedad infecciosa importante que ocasiona pérdidas económicas importante en la industria pecuaria sobre todo en el ganado bovino (Ramírez-Casillas *et al.*, 2004).

Los recursos financieros totales necesarios para la lucha mundial contra la tuberculosis (para la aplicación, incluido el desarrollo de capacidades y para la investigación) fueron de 2,200 millones de dólares anuales en 2004 y 2005, con un déficit anual estimado de 800 millones de dólares (OMS., 2005).

Las pérdidas económicas en el ganado son de la siguiente manera:

1. Pérdidas por decomiso parcial o total por reses afectadas 9 %.
2. Pérdidas en peso de los animales afectados detectados en producción 36 %.

3. Pérdidas en peso de los animales no detectados en producción 18 %.
4. Pérdidas en la producción de terneros 12 %.
5. Pérdidas en la producción de leche 13 %.
6. Costos de las pruebas tuberculínicas a campo 6 %.
7. Costo del tratamiento en casos humanos 1 %.
8. Disminución la fertilidad hasta un 6 %.
9. Las vacas en ordeña disminuyen la producción láctea en un 10 % del total de la producción lechera.
10. La duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia.
11. Lento aumento del peso del animal o disminución gradual del mismo.
12. Se pierde en promedio el 15 % del peso normal.
13. Como efecto secundario causa reducción de la inmunidad.
14. La esterilidad aumenta entre el 5 y 10% (Aguilera, 2002).

## 2.5 ETIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

La enfermedad es causada por *M. bovis* es un bacilo Gram-positivo, con potencial de zoonosis que afecta una gran cantidad de especies mamíferas al que se le relaciona genéticamente con *M. tuberculosis*, el agente causal de tuberculosis humana (Garnier *et al.*, 2003; Neill *et al.*, 2005; Scanlon y Quinn, 2000).

La tuberculosis en el ganado puede dar lugar a una enfermedad crónica, granulomatosa, principalmente de las vías respiratorias. El ganado puede infectarse de numerosas maneras, con la edad y el comportamiento animal, ambiente y clima existente, y las prácticas de manejo que prevalecen en la granja tienen influencia significativa. La inhalación de *M. bovis* es la ruta más probable y más importante, pues la distribución y la patología de la lesión en casos del campo demuestran la implicación predominante de las vías respiratorias superiores e inferiores y de los nódulos linfáticos asociados (Neill *et al.*, 2005).

## 2.6 EPIDEMIOLOGÍA

El agente causal de la tuberculosis es un bacilo, cuyas especies más comunes son *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum* (Complejo de *Mycobacterium tuberculosis*), pero no son las únicas, ya que hasta la fecha se han descrito más de 25 especies de Micobacterias capaces de infectar y desarrollar TB en el humano (Mariscal-Mendendez *et al.*, 2005).

En términos globales se reportan aproximadamente cada año, 10 millones de nuevos casos de TB de los cuales tres millones llegan a fallecer, de forma tal que aproximadamente el 6% de todas las muertes en el mundo son debidas a esta enfermedad. Se estima que la prevalecía global es superior a 70 por cada 100 mil habitantes aunque es mucho mayor en ciertas zonas geográficas y grupos de riesgo, como en algunos países africanos donde llega a ser de 400 por 100 mil habitantes. En cuanto a incidencia, África y Asia ocupan el primero y segundo. América Latina con 250-300 mil casos nuevos se ubica en el tercer puesto. Brasil, Perú y México son los países que tienen las mayores incidencias. Dentro del contexto de México el comportamiento de la tuberculosis en los últimos 10 años ha obedecido a una disminución tanto de su morbilidad como de su mortalidad. De acuerdo al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de la Secretaría de Salud, para el año 2000 se reportaron 16,281 casos; 15,269 (2001); 14,310 (2002); 14,852 (2003) y para el 2004, 13,392. Los estados de Baja California, Chiapas, Nuevo León y Veracruz, considerados como los de mayores aportaciones (Mariscal-Mendendez *et al.*, 2005)

## **2.7 INCIDENCIA**

### **2.7.1 Incidencia Mundial**

Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud afirman que la mitad de la población mundial está infectada por este agente, que existen alrededor de 30,000,000 de enfermos en todo el mundo, produciéndose al menos 10,000,000 de nuevos casos cada año y falleciendo cerca de 3,000,000 anualmente (6 % de todas las muertes). Recientemente se ha predecido un incremento continuo en el número de casos de tuberculosis y se ha estimado una incidencia mundial próxima a 12,000,000 de casos anuales para el año 2005. Particularmente en naciones Asiáticas y del África Subsahariana se evidencia un aumento de la incidencia a más de 300 casos por 100,000 habitantes, agrupándose en estas áreas cerca de 50 % de las personas coinfectadas (Reyes-Corcho *et al.*, 2004).

La tuberculosis humana ha sido identificada por la Organización Mundial de la Salud como una de las cinco pandemias que ocasionan la mayor carga de enfermedad, siendo la principal causa de muerte en la edad adulta y ocupa el octavo lugar a nivel mundial (García-García y Valdespino-Gómez, 2001).

### **2.7.2 Incidencia Nacional**

En México, durante los últimos diez años, la morbilidad por tuberculosis pulmonar mantuvo una tendencia estacionaria durante los tres primeros años de la década, ascendiendo a partir de 1994, alcanzando una cifra máxima de 20.6 casos por 100,000 habitantes en 1998 y luego descender hasta 15.6 casos por 100,000 habitantes en el año 2000 (SSA, 2001)

Durante el año 2000 se registraron 15,649 casos de tuberculosis pulmonar que correspondió a una morbilidad acumulada de 15.6 por 100,000 habitantes, en este año las cifras estatales de morbilidad tuvieron como cifra inferior 3.03 por 100,000 en el estado de Tlaxcala, y como cifra máxima 38 por

100,000 en el estado de Tamaulipas. Los estados con incidencias mayores fueron Tamaulipas, Baja California, Guerrero, Veracruz, Nuevo León, Nayarit, Sinaloa, Tabasco, Chiapas y Colima y los estados con menor morbilidad fueron Tlaxcala, Zacatecas, Guanajuato, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Yucatán, Aguascalientes, Puebla y Jalisco (SSA, 2001).

La mortalidad por tuberculosis pulmonar ha descendido considerablemente en los últimos años, en 1999 ocupó el lugar número 19 con 3.3 muertes por cada 100,000 habitantes, siendo la segunda causa de muerte ocasionada por un sólo agente etiológico sólo superada por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y el 95% de las defunciones ocurre en mayores de 15 años, población económicamente activa. Los últimos 10 años, el estado con la mortalidad más alta en el país ha sido Chiapas (SSA, 2001).

### **2.7.3 Incidencia Regional**

La Comarca Lagunera constituye una de las regiones con mayor incidencia, a nivel nacional, en lo que se refiere a casos de tuberculosis. Las cifras colocan a La Laguna, según casos reportados, arriba de la media nacional. En esta región 17 de cada cien personas contraen tuberculosis, de cada 130 casos que se reportan en La Laguna se registra un promedio anual de 25 muertes (Gómez, 2005).

## **2.8 TRANSMISIÓN DE LA TUBERCULOSIS BOVINA**

La principal fuente de transmisión de la tuberculosis bovina en las explotaciones agropecuarias, son los bovinos afectados por esta enfermedad, los cuales son capaces de transmitir la enfermedad 90 días después de haber adquirido la infección; los gérmenes salen al exterior con el aire expirado, los esputos, las heces, la leche, la orina, las secreciones vaginales y uterinas, exudados de nódulos linfáticos periféricos, mucosidades nasales y traqueales.

Por lo general los gérmenes penetran en el organismo por inhalación o ingestión (Radostits *et al.*, 2002).

La inhalación es la vía de entrada prácticamente invariable en el ganado estabulado y se piensa que también lo es en el que pasta libremente. La ingestión es posible en praderas a través de la contaminación con heces del pasto y los abrevaderos o de los pesebres pero la carga infecciosa debe ser muy elevada; el agua estancada puede causar infección hasta 18 días de haberse contaminado con un animal tuberculoso mientras que una corriente de agua no presenta riesgo (Radostits *et al.*, 2002).

La toma de leche infectada proveniente de una vaca en enfermedad avanzada. La infección intra mamaria por el uso de maquinas de ordeño contaminadas. La alimentación a bovinos con harinas mal procesadas provenientes de animales contaminados (Radostits *et al.*, 2002)

La transmisión genital puede ocurrir también si se infectan los órganos reproductivos, pero éste sigue siendo extremadamente raro, al igual que las infecciones transmitidas congénitas y verticales (Neill *et al.*, 2005).

### **2.8.1 Reservorios y Periodo de Incubación**

Los reservorios son de gran importancia ya que son también responsables de la diseminación y mantenimiento de la enfermedad, de los cuales tenemos animales domésticos y especies silvestres infectadas como son: Tejones (*Meles meles*) al contaminar los pastos con orina, zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) en las que se forman adenopatías periféricas que fistulizan y supuran, el antílope caribú (*Odocoileus hemionus*), venado cola blanca (*O. virginianus*), el alce (*Cervus elaphus canadensis*), bisonte (*Bisón bisón*), el búfalo (*Syncerus caffer*), carabao o búfalo de agua (*Bulbalis bulbalis*), la oveja, las cabras, los caballos, los cerdos, los perros, los gatos, los hurones, los camellos, los zorros, las ratas, los primates, las llamas, los elefantes, los rinocerontes, las ardillas, las nutrias, las focas, las liebres, los mapaches, los coyotes, leones, tigres, leopardos, y lince (Radostits *et al.*, 2002)

El período de incubación depende del estado inmunológico; que transcurre desde el contagio hasta que sobreviene la reacción inmunológica específica variando en un rango de entre 4 y 90 días (Broglia *et al.*, 2002).

## 2.9 PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA

El bacilo tuberculoso no elabora endotoxinas ni exotoxinas, en su lugar, la enfermedad en sí y la destrucción de los tejidos son ocasionados por productos que elabora el huésped durante la respuesta inmune (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).

La patogenia de la tuberculosis de los bovinos no se entiende muy bien como lo es para la tuberculosis humana. Como en seres humanos, la tuberculosis en ganado es muy compleja, implicando una multiplicidad de interacciones entre el huésped, los bovinos y *Mycobacterium bovis* dio lugar a la presentación y patología clínicas en animales (Tay-Zavala *et al.*, 2003).

Cuando *Mycobacterium bovis* consigue llegar al alvéolo pulmonar, se produce una ligera reacción inflamatoria provocada por éste, al multiplicarse dentro de los macrófagos alveolares. Dando lugar a dos tipos de reacciones; (1) la exudativa, caracterizada por inflamación aguda o subaguda con exudado o fluido y acumulación de polimorfonucleares y (2) la productiva, donde los macrófagos sufren una dramática transformación a células epitelioides para formar el tubérculo, lesión característica de la enfermedad (Tay-Zavala *et al.*, 2003).

Las células polimorfonucleares son rápidamente sustituidas por macrófagos alveolares. Cuyo un macrófago alveolar puro desde el punto de vista inmunitario envuelve a un bacilo tuberculoso, al principio le suministra el ambiente nutricional que necesita dentro de su fagosoma, donde el bacilo sobrevive y se multiplica. La capacidad de estos macrófagos para erradicar por sí solos al bacilo tuberculoso en estas primeras etapas, parece ser muy escasa, quizás porque su función se ve interferida por factores que han sido atribuidos a

diversos componentes de la pared celular del *M. bovis* que le permite a éste escapar de la destrucción inducida por las defensas del organismo, destacándose que:

En primer lugar, está el factor cordonal, un glucolípido de superficie que hace que el *Mycobacterium bovis* crezca *in Vitro* en cordones con configuración de serpentina y sólo lo presentan las cepas virulentas. La virulencia está dada por la capacidad de formar cordones. El factor formador de cordones inhibe la migración de leucocitos. Además, la inyección del factor cordonal induce la aparición del granuloma característico.

En segundo lugar, el lipoarabino-manano (LAM), un heteropolisacárido principal con estructura similar a la de la endotoxina de las bacterias gram negativas, inhibe la activación de los macrófagos por el  $\gamma$ -interferón. El LAM también hace que los macrófagos secreten el ( $\gamma$ -TNF), que causa fiebre, pérdida de peso y lesión tisular, y la Interleucina 10 (IL-10), que suprime la proliferación de las células T inducida por las micobacterias.

En tercer lugar, el complemento activado en la superficie de las micobacterias puede dar lugar a la opsonización del *Mycobacterium* y facilitar su captación por el receptor CR3 del complemento existente en los macrófagos (integrina Mac-1). Así la micobacteria ocupa una posición intracelular en los macrófagos, con lo que aumenta la resistencia microbiana y dificulta la quimioterapia.

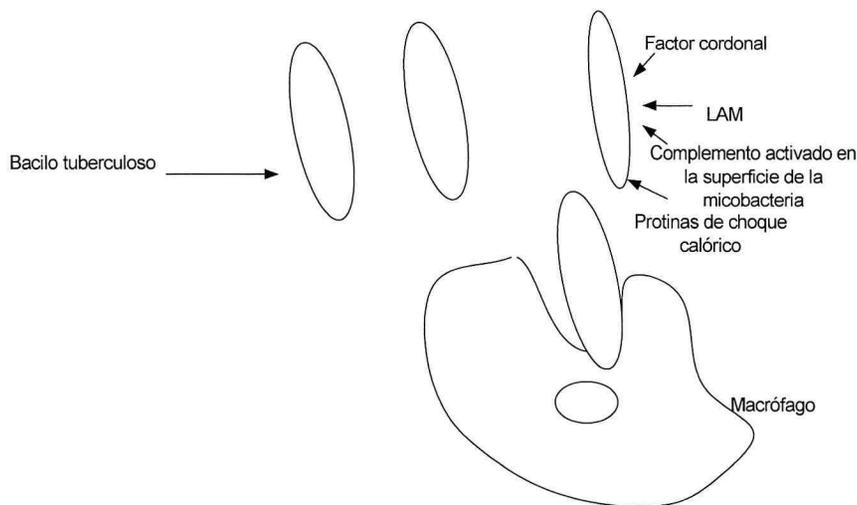
En cuarto lugar, presenta una proteína llamada proteína de choque calórico del *M. bovis* que es intensamente inmunogénica y puede desempeñar un papel importante en las reacciones autoinmunitarias inducidas por el *M. bovis*, el cual reside en los fagosomas, que no son acidificados en los lisosomas (Figura 1). La inhibición de la acidificación se ha asociado con la ureasa secretada por el mismo. Sin embargo, el macrófago infectado libera una sustancia que atrae a los linfocitos T, a continuación los macrófagos presentan los antígenos de los bacilos fagocitados a estos linfocitos, con lo que se inicia una serie de reacciones efectoras inmunitarias. A su vez, los linfocitos elaboran citosinas que activan a los macrófagos, y aumentan su potencial antimicrobiano.

De esta manera se establece una lucha complicada entre el huésped y el parásito (Morán-López y Lazo-Amador, 2001)

Entre las vacas sanas el huésped triunfa en el 95 % de los casos. Sin embargo, es típico que este encuentro inicial se extienda durante semanas o meses, y en este tiempo, la población de bacilos prolifera de manera masiva y se disemina. Después de algunas semanas aparece la inmunidad mediada por células T, demostrable por ser positiva la prueba cutánea de tuberculina con derivado proteico purificado (PPD). Las células T activadas por las Micobacterias interactúan con los macrófagos en 3 formas: primero, las células T colaboradoras CD4+ secretan  $\gamma$ -interferón, que activa a los macrófagos para producir una destrucción intracelular de las Micobacterias a través de intermedios nitrogenados como NO, NO<sub>2</sub> y HNO<sub>3</sub>. Segundo, las células T supresoras CD8+ destruyen los macrófagos infectados por las Micobacterias y así destruyen también las Micobacterias. Tercero, las células T doblemente negativas (CD4- y CD8-) lisan los macrófagos sin destruir las Micobacterias. De esta forma, las defensas del huésped se vivifican a través de interacciones complejas que incluyen a los fagocitos mononucleares y distintos subgrupos de células T. En consecuencia, aparecen macrófagos más competentes que inhiben la multiplicación intracelular de las bacterias al fragmentarse los macrófagos que facilitan la multiplicación bacilar, engloban a las Micobacterias y limitan su crecimiento (Morán-López y Lazo-Amador, 2001; Tay-Zavala *et al.*, 2003).

La lisis de los macrófagos da lugar a la formación de granulomas caseificantes (reacción de hipersensibilidad retardada). Estos granulomas están constituidos por macrófagos transformados en células epitelioides, que tienen una mayor capacidad microbicida, y en células gigantes multinucleadas tipo Langhans, que son macrófagos cuyos núcleos se disponen periféricamente rodeando al antígeno tuberculoso. Las células epitelioides segregan una sustancia estimuladora de los fibroblastos que produce colágeno y contribuye a limitar la periferia del granuloma mediante un área de fibrosis. La toxicidad directa de las Micobacterias sobre los macrófagos también puede contribuir a la

aparición de los centros necróticos. Las Micobacterias no son capaces de crecer en este medio extracelular ácido carente de oxígeno, con lo que la infección queda controlada. El residuo final de la infección primaria es una cicatriz calcificada en el parénquima pulmonar y en el nódulo linfático, conjunto denominado complejo de Ghon (Garza y Treviño, 2000; Morán-López y Lazo-Amador, 2001).



| Factores  | Efectos  |
|---|--|
| Factor Cordonal                                       | Inhibe la migración de leucocitos<br>Provoca aparición de granuloma  |
| LAM   | Hace que los macrófagos secreten: g-interferón, pérdida de peso, lesión de tejidos y fiebre. La IL10 suprime la proliferación de células T |
| Complejo activado en la superficie de la micobacteria | Facilitan su opsonización con lo que:<br>Aumenta la resistencia bacteriana y dificulta la quimioterapia                                    |
| Proteínas de choque calórico                          | Reacciones autoinmunes   |

**Figura 1.** Factores atribuidos a la pared celular de *M. tuberculosis* que le permiten escapar de la defensa del organismo (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).

Se conocen 2 formas de infección tuberculosa: la primaria que corresponde a la infección inicial por el bacilo, la que se ha explicado anteriormente, y la secundaria o de reactivación, que es el resultado de la

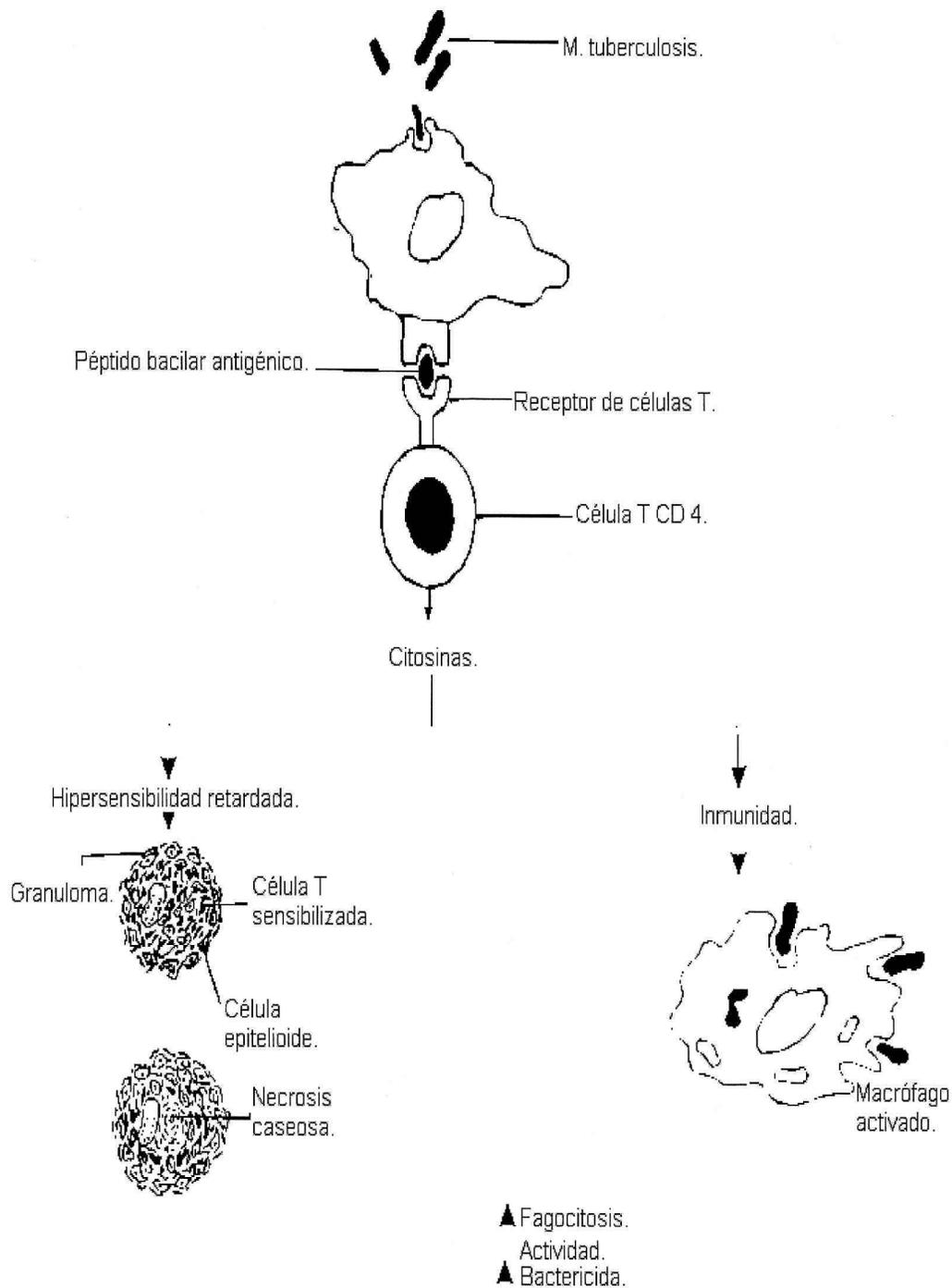
reinfección exógena o de la reactivación de la infección primaria. Esto puede deberse a que la cepa del *Mycobacterium* sea particularmente virulenta o que el huésped sea especialmente susceptible. Los granulomas de la tuberculosis secundaria suelen localizarse en el vértice de los pulmones, aunque también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

### **2.9.1 Periodo de diseminación**

En la tuberculosis secundaria las lesiones por lo general se tornan necróticas, caseosas y eventualmente aumentan. Con el tiempo la lesión caseosa se licua lo que produce una cavidad en el pulmón que hace más factible la proliferación de microorganismos. Esta eliminación de material caseoso hace posible que la infección se disemine a otras partes del organismo y a su vez son una fuente de infección ambiental. Debido a la gran inflamación que se produce puede haber hemorragias lo que produce, exudado hemorrágico. En la tuberculosis avanzada, los vasos sanguíneos pueden quedar expuestos en las cavidades producidas por la necrosis y el paciente muere de hemorragia si se produce ruptura de vasos (Garza y Treviño, 2000).

Una respuesta a la infección de *Mycobacterium tuberculosis* involucra la producción de gama interferón por las células de T antígeno-específicas que activan los macrófagos que están infectados para controlar el crecimiento del bacilo intracelular. Los bacilos intracelulares resisten las defensas del gama interferón activado por los macrófagos. La acidificación del fagosoma es

inhibida por el *Mycobacterium* y la fusión del lisososoma ocurre después de la fagocitosis de los bacilos vivos (Rhoades y Orme, 1997).



**Figura 2.** Consecuencias duales de la activación de los macrófagos (Morán-López y Lazo-Amador, 2001).

## **2.10 SIGNOS CLINICOS DE LA TUBERCULOSIS EN LOS BOVINOS**

La tuberculosis bovina normalmente es una enfermedad debilitadora y crónica, pero rara vez es aguda y rápidamente progresiva. Las infecciones tempranas son a menudo asintomáticas en el ganado por muchos años. En las fases tardías, los síntomas comunes incluyen emaciación progresiva, fiebre, debilidad, e inapetencia. Los animales con el desarrollo pulmonar normalmente tienen una tos húmeda que es peor por la mañana, durante el tiempo frío, en el ejercicio puede tener disnea o taquipnea. En algunos animales, se agrandan los nódulos linfáticos retrofaríngeos u otros, los nódulos agrandados pueden romperse. Así como también pueden obstruir los vasos de sangre, vías aéreas, o el tracto digestivo. Si el tracto digestivo está envuelto, pueden verse diarrea intermitente y estreñimiento. La mayoría de los casos se descubren las lesiones al momento de la inspección de la canal (FAO, 2004; Sullivan, 2005).

## **2.11 LESIONES DE LA TUBERCULOSIS BOVINA**

Las lesiones aparecen generalmente como nódulos firmes, en color blanco amarillento, y son con frecuencia muy pequeñas. Dentro de los focos infectados, los macrófagos tienen generalmente aspecto distintivo de la célula del epitelio y se observan a menudo como células gigantes multinucleadas (tipo de Langhans) formadas por la fusión del macrófago. Este epitelio y las células gigantes forman el centro de los tubérculos jóvenes, que son rodeados posteriormente por una zona de linfocitos, de células del plasma y de monocitos. El tubérculo desarrolla una fibroplasia periférica y una necrosis caseosa central; la mineralización se puede observar en el área necrótica caseosa. Las lesiones pueden persistir en ganado, con o sin la progresión, o quizás se pueden curar totalmente. Se han reportado en la mayoría de ganado tuberculoso previamente para tener lesiones del tejido pulmonar; sin embargo, los estudios subsecuentes han demostrado lesiones del pulmón en solamente

una proporción pequeña de ganado tuberculoso. Tales lesiones que ocurren generalmente solas, de tamaño pequeño (diámetro <1 cm) y por lo tanto son a menudo difícil de encontrar. Las lesiones tuberculosas se encuentran con mas frecuencia posible en los nodos linfáticos bronquiales y/o del mediastino; los nódulos linfáticos de la región principal son el segundo sitio frecuente y en muchas de los casos las son en los nódulos retrofaríngeos y submaxilares. Investigaciones más recientes han revelado la implicación de los tejidos finos como tonsilas. La rareza de estos informes se presenta probablemente por el número limitado de las reexaminaciones principales realizadas en ganado tuberculoso o en la inspección del rastro. No solo es común encontrar lesiones tuberculosas en los nodos de linfáticos mesentéricos solamente ya que resultan probablemente de la ingestión de una carga bacteriana pesada, por ejemplo de beber la leche infectada o presentarse por difusión de lesiones primarias en otros sitios (Aguilera, 2002; Diegel *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2005).

La tuberculosis generalizada es caracterizada por las lesiones en órganos tales como hígado, riñones y ubre o en las meninges y las cavidades serosas que se presentan de lesiones primarias posiblemente en el pulmón o mesenterio , músculos ocasionando Piogranulomas, Caseogranulomas, miositis, celulitis y mineralización (Diegel-K *et al.*, 2002; Neill-D *et al.*, 2005).

### 2.11.1 Formas de presentación de la Tuberculosis

La tuberculosis se suele presentar de diversas maneras, tal y como se describe a continuación:

**Forma pulmonar o localizada:** cuyo la única localización fue el pulmón.

**Forma extrapulmonar:** cuyo se aisló el *Mycobacterium* en una única localización (distinta del pulmón, hígado, médula ósea o sangre) sin evidencia clínica o microbiológicas de infección tuberculosa en otros órganos.

**Forma diseminada:** cuyo el aislamiento de *Mycobacterium* se realizó en más de una localización no contigua, incluido o no el pulmón, o bien únicamente en la médula ósea, hígado o sangre.

**Forma miliar:** además del aislamiento de *Mycobacterium*, existieron lesiones típicas del tamaño de un mijo en el órgano afectado. Generalmente se trató de un diagnóstico anatomohistológico (Reyes-Corcho *et al.*, 2004).

**Forma nodular:** se localiza en todos los nódulos linfáticos afectados por el *Mycobacterium*, por eso se le denomina esta manera.

**Forma meníngea:** se presenta en forma de meningitis que involucra las estructuras de la base craneana. Además de los signos propios de meningismo, existen alteraciones de la conciencia, irritabilidad, parálisis de nervios craneanos, vómitos y cefalea. A nivel del fondo de ojo pueden observarse los tubérculos coroidales. Muchas veces la meningitis tuberculosa es una complicación de la forma miliar (Araujo y Waard, 2004).

**Forma ósea:** Generalmente involucra la columna vertebral, comprometiendo frecuentemente 2 cuerpos vertebrales. El disco intervertebral se compromete, estrechando el espacio del mismo nombre. Se forma un absceso que puede extenderse hacia el psoas. La localización más frecuente es la décima vértebra dorsal (Araujo y Waard, 2004).

**Forma articular:** Las articulaciones más afectadas generalmente son las que mayor peso soportan. La tumefacción de las articulaciones se instala lentamente sin presentar signos clásicos de flogosis como en las artritis sépticas. Puede existir drenaje a través de fistulas. Puede afectarse cualquier articulación, siendo más frecuentes las de miembros posteriores y el hombro (Araujo y Waard, 2004).

**Forma ocular:** La conjuntivitis generalmente se manifiesta por dolor, fotofobia, lagrimeo y manchas alrededor del limbo esclerocorneal. Puede ulcerarse la córnea e infectarse secundariamente. Es producto de una hipersensibilidad a los antígenos del bacilo y no de una infección directa. Otro proceso es la conjuntivitis tuberculosa. Los tubérculos coroidales a nivel del fondo de ojo permiten un diagnóstico rápido en las formas miliar y meníngea. Otras formas son la panofalmitis aguda, la uveítis y retinitis (Araujo y Waard, 2004).

**Forma cutánea:** Puede presentarse la infección primaria de la piel a través de heridas, generalmente acompañada de adenopatías satélites. Otras lesiones son los abscesos y el eritema nodoso, genital y pericarditis tuberculosa (Araujo y Waard, 2004).

## 2.12 DIAGNÓSTICO

Dentro de las estrategias para combatir a la TB (tuberculosis), el diagnóstico representa uno de los pilares importantes debido a que provee la información para que se inicie el tratamiento oportuno y adecuado en un paciente tuberculoso así como la identificación de animales positivos a la enfermedad (Neill-D *et al.*, 2005), por lo tanto para efectos de la campaña contra la tuberculosis se permiten los siguientes métodos de diagnóstico publicados dentro de la norma oficial mexicana NOM – 031- ZOO – 1995 (SAGARPA, 1995), prueba intradérmica con derivado proteico 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 (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

### 2.12.1 Prueba de la Tuberculina

La prueba de la tuberculina se hace intradérmica y es el método por lo general más utilizado en los bovinos para detectarles tuberculosis. Pero algunas ocasiones existen animales que no reaccionan a esta prueba y pueden llegar a dar falsos negativos por lo que estos animales se quedan como sanos en la explotación y son un foco importante de infección por que eliminan el *Mycobacterium bovis* al hato en general (Díaz-Otero *et al.*, 2003).

La tuberculina es un extracto de cultivo de bacilos tuberculosos. Tener una reacción a la prueba lo único que indica es que el individuo ha sido

infectado en algún momento de su vida por una bacteria del complejo tuberculosis, incluyendo el bacilo vacunal (Morán-López y Lazo-Amador, 2001)

Las tuberculinas autorizadas para efectos de Campaña nacional contra la tuberculosis son:

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

b) PPD aviar: elaborado con *Mycobacterium avium* cepa D4, que se utiliza en la prueba cervical comparativa, la cual debe contener un colorante llamado rojo de Ponceau para diferenciarla de la PPD bovina (SAGARPA, 1995).

## 2.12.2 Tuberculización

### Prueba anocaudal

Esta prueba se lleva a cabo para probar hatos sospechosos a tuberculosis bovina, donde se debe limpiar el sitio de la inyección evitando el uso de desinfectantes o productos químicos que irriten la piel. Previamente a la inoculación de la tuberculina, se medirá el pliegue anocaudal interno (milímetros), los cuales se registran en el protocolo correspondiente (SAGARPA, 1995).

Si se observa cualquier aberración de la piel que se pueda confundir con la lectura del test, se deberá inocular en el pliegue anocaudal interno opuesto, registrándolo en la planilla (SAGARPA, 1995).

Se procede a insertar la aguja intradérmicamente en toda su longitud en las capas superficiales de la piel, aplicada en el tercio medio del pliegue anocaudal, a unos 6 cm de la base de la cola y en el centro del pliegue. La inyección se hará con 0.1 ml de tuberculina PPD bovina de 1.0 mg/ml de

concentración (SENASA, 2000) con un porcentaje de sensibilidad del 72 al 91% y especificidad del 78 al 96% (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

### **Interpretación**

La interpretación de los resultados de esta prueba se hace de la siguiente manera.

P = POSITIVO: un engrosamiento de igual o mayor de 5 milímetros.

S = SOSPECHOSO: un engrosamiento de 3 o más y menos de 5 milímetros.

N = NEGATIVO: un engrosamiento menor de 3 milímetros (Torres, 2004).

### **Prueba cervical simple**

Esta prueba se empleará para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis*; o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis*; Se debe rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en el tercio medio superior del cuello. El sitio de aplicación será aproximadamente 10 cm debajo de la cresta. Esta prueba se aplica mediante la inoculación intradérmica de 0.1 ml de PPD bovino en la región media cervical, haciendo la lectura el mismo Médico Veterinario que aplicó la prueba mediante la observación y palpación del sitio en donde se practicó, realizándose a las 72 mas, menos 6 horas posteriores a su inoculación (SAGARPA, 1995).

### **Interpretación**

En esta prueba existen solo dos clasificaciones:

P = POSITIVO: un engrosamiento de la piel de igual o mayor de tres milímetros.

N = NEGATIVO: un engrosamiento menor de tres milímetros.  
No existe la clasificación de sospechoso (Torres-PM., 2004).

### **Doble comparativa**

Se debe rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en el tercio medio superior del cuello. El sitio de aplicación superior será cerca de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior será aproximadamente de 13 cm debajo de esta aplicación, se hace inoculando intradérmicamente de 0.1 ml de PPD aviar y 0.1 ml de PPD bovino. Previo a la inoculación, se levanta un pliegue de piel en el centro de las áreas rasuradas y se procederá a medir el grosor de éstos, utilizando el cutímetro. El registro final de las medidas deberá redondearse según el siguiente criterio: de 6.2 baja a 6.0, 6.3 sube a 6.5; de 6.7 baja a 6.5; de 6.8 sube a 7; debiendo registrarse los valores en los formatos para prueba cervical comparativa. El PPD aviar se inocula intradérmicamente en el área rasurada superior y el PPD bovino en la inferior. La lectura de esta prueba se realizará 72 horas (+- 6 horas), midiendo con el cutímetro el grosor de las reacciones, éstas serán anotadas en el formato oficial de la prueba cervical comparativa, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda; una vez realizada esta operación se procede a graficar los valores obtenidos tanto de PPD aviar como del bovino y el punto de intersección dará el resultado de la prueba. De acuerdo a la gráfica oficial se interpretarán los resultados (SAGARPA, 1995).

### **Interpretación**

Por diferencia en milímetros anterior y posterior a las inoculaciones determina la respuesta final de cada DPP.

La interpretación esta basada en el tamaño de la respuesta de la tuberculina bovina comparada con la aviar.

A nivel individual, para interpretar la prueba comparativa, se considera reaccionante positivo, aquel bovino con 4mm o mas de respuesta a la DPP bovina que a la DPP aviar.

**Cuadro 2.-** Interpretación de las medidas de la prueba de tuberculina doble comparativa.

| DPP Bovino. | DPP Aviar. | Respuesta. |
|-------------|------------|------------|
| + de 4mm.   | 0          | Positiva.  |
| + de 1mm.   | 0          | sospechosa |
| = o <       | 0          | Negativa.  |

(SAGARPA, 1995; Torres, 2004)

### 2.12.3 Análisis Histopatológico

Se deberá utilizar la tinción de hematoxilina-eosina. Esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además pueden utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y en cortes o improntas realizados con el material sospechoso a bacilos ácido alcohol resistentes (Estrada-Chávez *et al.*, 2004; Estrada-Chavez. C. *et al.*, 2004; SAGARPA, 1995).

### 2.12.4 Baciloscopia

La baciloscopia es en la mayoría de los laboratorios, la técnica tradicional para el diagnóstico de enfermos con tuberculosis pulmonar que son bacilíferos, esto es, que son fuente de diseminación de la enfermedad; tiene menor sensibilidad que el cultivo, ya que para obtener un resultado positivo requiere que la muestra presente, como mínimo, 5.000-10.000 bacilos/ml y se estima que la mitad de los 10 millones de casos reportados anualmente, son infecciones pulmonares y extra-pulmonares baciloscópico negativas (Broglia *et al.*, 2002; Mariscal-Mendendez *et al.*, 2005), siendo el método más rápido y económico para detectar Micobacterias (García-Quintanilla *et al.*, 2000).

La tinción mas apropiada para la baciloscopia es la de Ziehl Neelsen que consta de las siguientes etapas:

### **Coloración**

a) se colocan los frotis, conservando el orden numérico, sobre las varillas de vidrio dispuestas en el lavamanos o sobre una cubierta o bandeja metálica de coloración, con el extendido hacia arriba y el tercio numerado hacia el operador.

b) Se cubre la superficie del extendido con fucsina fenicada previamente filtrada.

c) Con la llama de un hisopo de algodón humedecido en alcohol calentar por debajo de las láminas cubiertas con fucsina, hasta que se produzca emisión de vapores blanquecinos visibles; dejar de calentar y repetir la operación por 2 veces más. En ningún caso la fucsina debe hervir o secarse sobre la lamina; si ocurre esto ultimó, debe reponerse el colorante.

Esta operación de calentar tres veces seguidas hasta la emisión de vapores toma habitualmente unos 5 minutos, que es el tiempo adecuado de contacto entre el extendido y el colorante.

d) Se elimina la fucsina tomando el porta objetos por los bordes del extremo numerado, entre el pulgar y el índice o con una pinza, inclinándolo hacia delante y lavándolo con agua a baja presión.

e) Se gira la lamina para la cara inferior, eliminando la fucsina que ha escurrido hacia ella.

### **Decoloración**

a) se cubre el extendido con alcohol ácido.

b) Se toma la lámina por los bordes del extremo numerado y se efectúa un suave movimiento de vaivén, de modo que el alcohol ácido vaya decolorando y

arrastrando la fucsina. Cuando la solución decolorante adquiere una coloración roja se lava con agua y si es necesario se decolora nuevamente.

c) Se elimina el alcohol ácido, lavando la lámina con agua a baja presión. Se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas solo conservan un ligero tinte rosado. Esta operación tarda de .5 a 1 minuto.

### **Coloración de contraste**

a) se cubre la superficie del extendido con azul de metileno durante un minuto.

b) Se elimina el azul de metileno y la lámina se lava con agua a baja presión, tanto por la superficie del extendido como por su cara inferior.

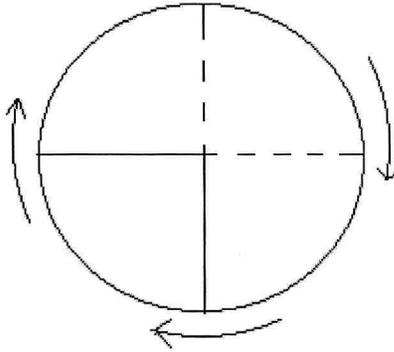
c) Las láminas ya teñidas se secan a temperatura ambiente, colocándolas verticalmente sobre papel absorbente limpio y apoyadas sobre una repisa.

d) Se revisa la numeración de las mismas y se remarcan si se ha borrado durante la tinción

### **Observación microscópica**

Se emplea un microscopio equipado con objetivo de inmersión (100 X) y ocular de 7X, 8X, o 10X. Con un gotero se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el extremo mas cercano a la numeración del extendido y sin tocar la superficie del portaobjetos (puede usarse de cedro diluido en benzoato de bencilo o vaselina líquida). Se enfoca el microscopio acercando el objetivo de inmersión hasta tocar la superficie de la gota de aceite ajustando en seguida con el tornillo micrométrico.

Cada campo microscópico se divide mentalmente en cuatro cuadrantes como la esfera de un reloj. La lectura se inicia en el superior derecho y se continua con los otros en sentido de las manecillas del reloj. Debe observarse el superficie y en profundidad, utilizando constantemente el tornillo micrométrico.

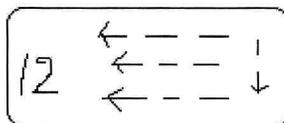


**Figura 3.** Lectura en sentido de las manecillas del reloj para baciloscopia.

La observación microscópica debe establecer en primer termino si se encuentran o no bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) y si los hay, el número promedio por campo microscópico.

Los bacilos aparecen como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo, generalmente con gránulos mas coloreados en su interior, aislados, en parejas o en grupos sobre el azul claro de la tinción de contraste.

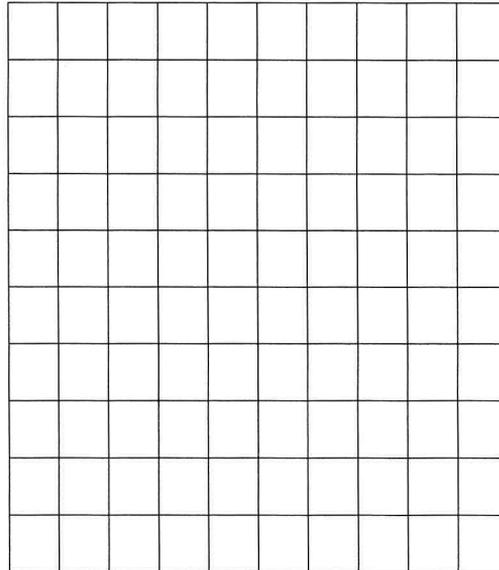
Se debe seguir una pauta uniforme de observación, leyendo de izquierda a derecha del extendido un mínimo de 100 campos útiles.



**Figura 4.** Observación de los campos útiles para la lectura de la baciloscopia.

Se aconseja utilizar un cuadriculado con 100 cuadros para registrar en cada uno de ellos los hallazgos correspondiente a 100 campos microscópicos como el siguiente.

CUADRICULADO PARA REGISTRAR LOS HALLAZGOS DE BACILOS  
EN 100 CAMPOS MICROSCOPICOS



**Figura 5.** Observación de los campos útiles para la lectura de la baciloscopia.

Se considera campo útil aquel que se encuentran elementos celulares; los campos en los que no se encuentran dichos elementos no deben contabilizarse en la lectura.

El número de campos a observar varia según la cantidad de bacilos:

a) sino se encuentran bacilos ácido – alcohol resistentes o hay menos de un bacilo por campo en promedio, se examinan al menos 100 campos microscópicos útiles.

b) Si se encuentran de 1 a 10 bacilos por campo en promedio, es suficiente la observación de 50 campos.

c) Si se encuentran mas de 10 bacilos por campo en promedio, basta con la observación de 20 campos.

**Informe de resultados**

Los resultados se informan de la siguiente manera:

**Negativo:** no se encuentran bacilos en 100 campos observados.

**Positivo:** menos de un bacilo por campo en promedio, en 100 campos observados.

**Positivo:** de 1 a 10 bacilos por campo en promedio en 50 campos observados.

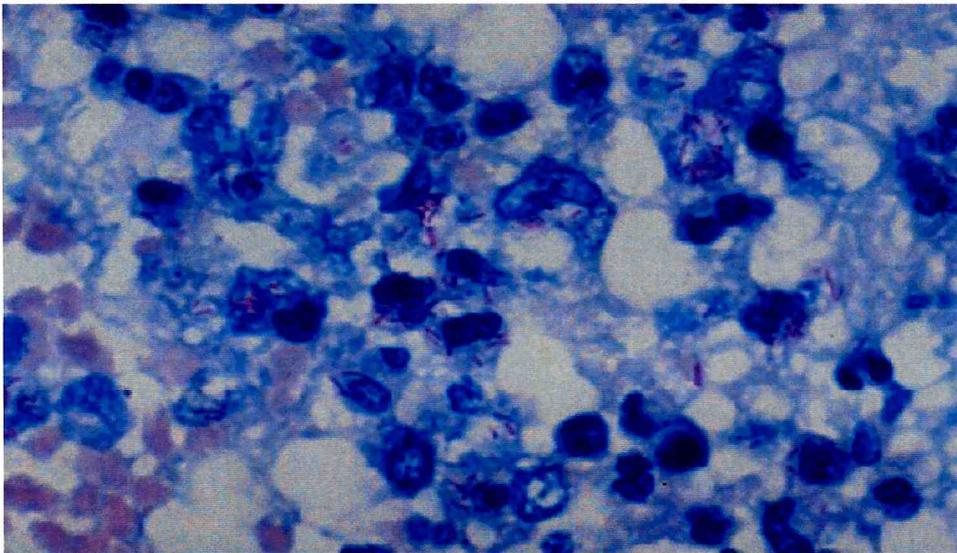
**Positivo:** mas de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados.

Si en una lamina se observan entre 1 y 4 bacilos en 100 campos se recomienda la siguiente conducta.

- a) Ampliar la lectura a 200 campos adicionales.
- b) Si no se encuentran mas bacilos hacer otro extendido de la misma muestra.
- c) Si la lectura de este segundo extendido no modifica el resultado anterior, la muestra debe informarse como negativa, consignar el hallazgo de 1 a 4 bacilos en el libro de registro de laboratorio. Es conveniente hacer cultivo en aquellas muestras en que se encontró de 1 a 4 bacilos.

(Blancarte *et al.*, 1992).

**Nota:** El criterio anterior se tomo como referencia ya que es para tuberculosis humana, el criterio para bovinos es el siguiente al encontrar un bacilo el animal se considera positivo (fuente personal de el laboratorio de la Unión Ganadera Regional de Guadalupe Nuevo León México).



**Figura 6.** Baciloscopia directa de exudado nasal por la técnica de Ziehl Neelsen *M. bovis* se ve como pequeños bastones rojo oscuros sobre fondo azulado.

## Conservación y eliminación de los frotis

El frotis observado se sumerge en xilol, se escurre para eliminar el aceite y se puede guardar por mucho tiempo.

### 2.12.5 Análisis Microbiológico

a) Examen directo: Mediante la tinción de Ziehl Neelsen para microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observarán bacilos teñidos de color rojo. Puede utilizarse la microscopia de fluorescencia mediante la tinción con auramina-rodamina, auramina acridina o auramina fenol, que tiñe a la bacteria de color verde brillante.

b) Examen indirecto: Cultivo, aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con y sin huevo, Middlebrook, Stonebrink, Petragnani, ATS y Lowenstein Jensen (SAGARPA, 1995).

### 2.12.6 Cultivo Microbiano

Es el método de elección para el diagnóstico e identificación del bacilo, ya que es la técnica de mayor sensibilidad en la detección de *M. tuberculosis* por requerir la presencia de sólo 10 bacilos/ml en la muestra para obtener un resultado positivo. En las formas de tuberculosis extrapulmonar es quizás la única forma de diagnóstico bacteriológico disponible (Broglia *et al.*, 2002).

Existen diferentes medios de cultivo para el aislamiento de micobacterias, que garantizan un buen soporte nutritivo para su crecimiento. Estos pueden ser sólidos o líquidos, selectivos y no selectivos. Los medios sólidos pueden ser elaborados a base de huevo o agar. Los medios basados en huevo se caracterizan por que contienen verde de malaquita, que inhibe el crecimiento de la flora bacteriana asociada, pueden guardarse refrigerados por

largo tiempo, resisten la desecación y garantizan el crecimiento de la mayoría de las Micobacterias, entre ellas *M. bovis*, ya que se desarrollan en forma adecuada en medios sintéticos simples que contengan una fuente de carbono, nitrógeno e iones de metales esenciales como hierro y magnesio. Sin embargo, para el aislamiento a partir de muestras clínicas se requiere de medios más complejos, a base de papa-suero, agar-suero o huevo. Los integrantes del complejo TBC y la mayoría de las Micobacterias capaces de infectar al hombre tienen un crecimiento muy lento, dado por una tasa de duplicación de aproximadamente 18 horas, por lo tanto se requiere un período de incubación que puede durar entre 3 y 6 semanas, a 37°C. Aunque son aerobios estrictos, el incremento de la tensión de CO<sub>2</sub> puede favorecer la velocidad de crecimiento. El pH óptimo de crecimiento es 7, pero pueden crecer en pH que oscilen entre 6 y 7.6 (Araujo y Waard, 2004).

### **2.12.7 El medio de Cultivo Middlebrook 7H10**

Este medio es semisintético con base de agar siendo uno de los más utilizados. Debido a la alta hidrofobicidad de la pared de las Micobacterias tienden a crecer en este medio (Soto-Ospina, 2002)

El medio de Middlebrook 7H10 es un medio sólido que da facilidad para la recuperación y cuantificación de *Mycobacterium* (Neill *et al.*, 2005).

Contiene sales definidas, vitaminas, cofactores, ácido oleico, albúmina, catalasa, glicerol, glucosa y verde malaquita (Jawetz *et al.*, 1995)

Es un medio que se debe incubar a 37°C para el crecimiento de *Mycobacterium*, el cual es de entre 4 y 8 semanas requiriendo tres más para hacer las pruebas de sensibilidad (Alfonso *et al.*, 2002; Broglia *et al.*, 2002; Qing *et al.*, 2002).

En un estudio realizado se demostró que muchos de los componentes individuales de este medio basal pueden variar significativamente el resultado de la susceptibilidad de las pruebas de forma dramática (Guthertz *et al.*, 1988), debido a que contienen 10 veces menos verde de malaquita que los medios a base de huevo, lo que explica la mayor incidencia de contaminación (Araujo y Waard, 2004).

### Ingredientes Para Preparar 900ml de Cultivo

|                                |          |                                |         |
|--------------------------------|----------|--------------------------------|---------|
| Sulfato de amonio-----         | 0.5g     | Sulfato de cobre-----          | 0.001g  |
| Fosfato monopotásico-----      | 1.5g     | Ácido L-glutámico -----        | 0.5g    |
| Fosfato disódico-----          | 1.5g     | Citrato de amonio ferrico----- | 0.004g  |
| Citrato de sodio-----          | 0.4g     | Sulfato de magnesio-----       | 0.025g  |
| Cloruro de calcio-----         | 0.0005g  | Sulfato de zinc-----           | 0.001g  |
| Clorhidrato de piridoxina----- | 0.001g   | Biotina-----                   | 0.0005g |
| Verde de malaquita-----        | 0.00025g | Agar-----                      | 15.0g   |

(Atlas y Parks, 1997).

### 2.12.8 Sistema BACTEC

El sistema BACTEC comenzó en la década de los 70, inicialmente utilizando técnicas radiométricas y posteriormente desarrollando técnicas fluorescentes; en la actualidad se utilizan sensores fluorescentes, que permiten el monitoreo continuo de las botellas las cuales se agitan e incuban automáticamente detectando la cantidad de bióxido de carbono que se genera por la respiración de las bacterias. Este sistema ofrece crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios así como resinas para inactivación de antibióticos, además permite la recolección directa con un vacutainer de microorganismos para cultivo con mayor seguridad y nula contaminación (Paz-Oplustil *et al.*, 2001; Ynterian, 2000).

El método radiométrico, permite disminuir a 10-15 días las primeras lecturas positivas, disminuye el tiempo de estudio de sensibilidad a drogas y permite diferenciar rápidamente entre Micobacterias tuberculosas y otras Micobacterias. Sus desventajas son el mayor costo, mayor complejidad en aparatos de bioseguridad, mayor contaminación si no se maneja bien y riesgo para el personal (Broglia *et al.*, 2002).

### **2.12.9 Pruebas Serológicas**

Pruebas de ELISA (Inmunoabsorbancia Ligada a Enzimas) indirecto, para la detección de anticuerpos séricos. Posee baja sensibilidad, pero es muy fiable en la detección de vacas "anérgicas" a las pruebas de la tuberculina y  $\gamma$ -Interferón. En su forma "anamnástica" incrementa notablemente su sensibilidad (> 90%) y su fiabilidad en la detección de animales "anérgicos". Se han introducido varias pruebas (ELISA, Radio Inmunoensayo [RIA], aglutinación del látex) para el diagnóstico serológico de la enfermedad micobacteriana activa. No obstante, las pruebas para detectar los antígenos micobacterianos o los anticuerpos específicos son inespecíficos e insensibles. Se han conseguido resultados mejores mediante el uso de antígenos altamente purificados para el diagnóstico de la meningitis tuberculosa. Sin embargo, estas pruebas solo tienen utilidad en la enfermedad crónica y extensa (Garza y Treviño, 2000).

### **2.12.10 Diagnóstico Molecular por PCR**

Esta técnica es considerada la más revolucionaria del último cuarto del siglo XX. Con ésta, se consigue copiar millones de veces, en un par de horas, una secuencia predeterminada, dentro de una mezcla de ADN tan compleja como el propio genoma humano (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldana, 2004).

La PCR mejora el diagnóstico rápido de tuberculosis permitiendo el descubrimiento directo de *M. bovis* sin requerir de cultivo previo partiendo de cualquier muestra biológica (Estrada-Chávez *et al.*, 2004) En forma específica,

sensible y en pocas horas, permitiendo por ello el diagnóstico en la fase aguda de la infección como se ha demostrado en humanos (Martínez *et al.*, 2005).

La PCR es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de ADN micobacterianos en muestras biológicas de pacientes con sospecha clínica de tuberculosis, en muestras con resultado negativo a la tinción de Ziehl-Neelsen o en el cultivo (Loera-Castañeda *et al.*, 2003).

Este proceso se desarrolla de manera habitual en tres etapas. La primera consiste en la extracción y purificación de los ácidos nucleicos del microorganismo de la muestra biológica, seguido de la amplificación de un segmento seleccionado del genoma del microorganismo. Finalmente, en la tercera etapa se lleva a cabo la detección de los fragmentos amplificados en la PCR (amplicones) por electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio, o mediante hibridación con sondas específicas. En general todo este proceso suele durar aproximadamente 24 horas (Costa, 2004)

Las aplicaciones de la PCR son múltiples, abarcando desde la evolución hasta la clínica, pasando por la genética, la biología molecular y la biotecnología; amén de aplicaciones en la agricultura y la ganadería (Rodríguez-Sánchez y Barrera-Saldana, 2004).

## **Ventajas**

- Rapidez de detección ya que no precede de otra prueba.
- Disminuye el riesgo de contaminación en forma muy importante.
- Detección de mutaciones que pueden estar ligados a factores de resistencia antimicrobiana (Simon y Listiawan, 2003).
- Se pueden correr varias muestras al mismo tiempo (Costa, 2004).

## **Desventajas**

- Dificultades relacionadas con la ruptura de la pared celular micobacteriana y la extracción de ADN.
- Presencia de inhibidores de la PCR.
- Variabilidad biológica y la amplificación inespecífica.
  - Costo económico de la prueba (Loera-Castañeda *et al.*, 2003).

## **Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada**

La PCR anidada puede permitir la confirmación del diagnóstico de tuberculosis en menos de 24 horas (Estrada-Chávez *et al.*, 2004), esta técnica ha demostrado ser tan sensible como el cultivo; la técnica involucra la amplificación de diferentes elementos genéticos usados como iniciadores (primers) dentro del cromosoma de *Mycobacterium*, para generarnos copias múltiples de una región génica específica de secuencias de inserción, por lo general IS6110 (Alfonso-R. *et al.*, 2002).

## **2.13 CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS**

En la mayoría de los países desarrollados del mundo, la enfermedad en animales estabulados es controlada en la actualidad relativamente bien y las precauciones suplementarias de la inspección de la carne y de la pasteurización regulada de la leche han reducido al mínimo el riesgo de la infección humana de *M. bovis* (Neill *et al.*, 2005) En estos países también se ha logrado la erradicación pero hay evidencias que la enfermedad esta presente en la fauna silvestre como tejones o ciervos (Amadori *et al.*, 2002).

Actualmente la Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina considera los estados fronterizos del norte, Quintana Roo y Yucatán en etapa de erradicación, con excepción de Baja California Norte. El

resto del territorio Nacional se considera zona en control (Estrada-Chávez *et al.*, 2004)

La TB bovina puede controlarse dentro de un hato afectado a través de la comprobación regular y eliminación de cualquier animal que de positivo a la prueba de tuberculina, enviándolo a sacrificio al rastro. Sin embargo, no hay ningún método disponible que asegure efectivamente que se ha eliminado la TB bovina de un hato por lo que se recomienda la despoblación total (Vantiem, 2002).

### **2.13.1 Vacunación en humanos**

La vacunación en la actualidad se realiza con el uso del bacilo Calmette-Guérin (BCG) la cual comenzó en 1908 cuyo Albert Calmette y Camille Guérin iniciaron su trabajo a partir de una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* llamada Lait Nocard, ésta fue aislada por Nocard de una vaca con mastitis tuberculosa. Calmette y Guérin subcultivaron el organismo cada semana en un medio de papa glicerinada, medio prevalente de la época, al que añadieron bilis bovina para asegurar una mejor homogeneización del cultivo. La cepa que creció en ese medio se inyectó con regularidad en animales; para su sorpresa, la cepa perdió su virulencia luego del décimo quinto pasaje y no provocó lesiones en los conejos, cobayos y terneros en quienes se administró. En 1921 después de trece años y 230 pasajes, BCG había perdido su virulencia en animales. El primer niño inmunizado con BCG en julio de 1921 fue un recién nacido cuya abuela padecía tuberculosis. Ese mismo año, se empleó por primera vez en Francia la BCG por vía oral, con fines de vacunación (Araujo y Waard, 2004). Desde entonces se han administrado más de 3.000 millones de dosis en el mundo y es la más usada (Garnier *et al.*, 2003), siendo la única vacuna aprobada para la prevención de tuberculosis (Fredag-L *et al.*, 2000). Con una cantidad como mínimo de 200,000 UFC (Unidades Formadoras de Colonias) (SSA, 1995).

El progreso hacia las estrategias de vacunas para la tuberculosis de los bovinos se ha repasado recientemente. Junto con el uso estandarizado de BCG, la gama de candidatos alternativos potenciales ha tenido aumento debido a los avances en la biología molecular. Las vacunas adicionales posibles incluyen cepas atenuadas de las Micobacterias; vacunas de la proteína de la subunidad presente como coadyuvante y vacunas del DNA. Lo más recientemente posible, son datos que emergen de la vacunación neonatal indica una nueva generación de estrategias de vacunación teniendo gran potencial en programas para combatir la tuberculosis de los bóvidos (Neill *et al.*, 2005), aumentando su eficacia biológica con refuerzos hasta del 80% (Araujo y Waard, 2004; Fredag *et al.*, 2000; Fredag-L *et al.*, 2000), dando mejor resultado que en ganado adulto (Hope *et al.*, 2005), pero tiene el inconveniente que convierte a los animales en reactores a la tuberculina, inhabilitando la prueba diagnóstica reconocida oficialmente (Ramírez-Casillas *et al.*, 2004).

### **2.13.2 Tratamiento**

El tratamiento en la actualidad se utiliza principalmente para humanos ya que los bovinos tienen un tiempo muy corto de vida, y los que se encuentran positivos a la enfermedad se espera a que no sea rentable su producción y se mandan a sacrificio; en el pasado, a las personas que padecían tuberculosis, se les aislaba en sanatorios, previniendo así la diseminación de la enfermedad; además se trataba por colapso de pulmón, lo cual era eficaz. Actualmente, la base del tratamiento contra la tuberculosis, son los antibióticos, para lo cual debe tomarse en cuenta lo siguiente:

1. Las Micobacterias son bacterias intracelulares, por lo que solo deben utilizarse antibióticos que se acumulen en el interior de las células del huésped
2. Las Micobacterias son de crecimiento lento, por tanto los antibióticos eficaces solo contra bacterias de crecimiento rápido no son útiles

3. Los antibióticos deben administrarse durante un período de tiempo prolongado y en dosis pequeñas para asegurar su cumplimiento (Araujo y Waard, 2004).

El curso de tratamiento para humanos con TB bovina toma de 6 a 9 meses, y la proporción de éxito es de 95 por ciento (Vantiem-JS., 2002).

Habitualmente se utiliza la combinación de isoniazida y rifampicina, aunque el tratamiento debe elegirse de acuerdo con los resultados de las pruebas de sensibilidad aplicadas al microorganismo (Tay-Zavala *et al.*, 2003).

## CAPÍTULO III

### MATERIAL Y METODOS

#### 3.1. Localización Geográfica de la Comarca Lagunera

El presente estudio fue realizado en las instalaciones de la Clínica del Seguro Social número 71 y la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna.

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

#### 3.2 Sitio de Muestreo

Se llevó a cabo un estudio descriptivo transversal y prospectivo, en las Unidades Productivas de la Comarca Lagunera. Actualmente, en la región se cuenta con aproximadamente 280,000 cabezas de ganado lechero, distribuidas en 251 establos que se encuentran localizados en Torreón, Matamoros, San Pedro de la Colonias y Viesca en el Estado de Coahuila y Gómez Palacio, Tlahualilo, Lerdo y Nazas en el Estado de Durango. Como inicio y con los recursos disponibles, se realizó el presente estudio analizando 85 animales considerados como positivos por la campaña Nacional de Tuberculosis distribuidos en tres establos de la región. Por criterios de privacidad, se omiten los nombres de los mismos.

A los 85 animales seleccionados, se les tomó muestras de exudado nasal.

### 3.3 Obtención y Procesamiento de Muestras

Las vacas positivas a la prueba de tuberculina seleccionadas, fueron entrampadas para inmovilizarlas. La toma muestra se realizó introduciendo el hisopo en su totalidad en la nariz del animal, recolectando exudado nasal. Una vez tomada la muestra, el hisopo se depositó en un tubo de ensayo con tapón de rosca con 1.5 ml de solución salina 0.85%. La muestra se mantuvo en hielo durante el transporte al laboratorio para su análisis.

En el laboratorio se tararon las muestras y se colocaron en una Centrífuga (modelo CU5000), a 1500 rpm para la separación de las muestras de la solución salina fisiológica y se tiro el sobrenadante en un frasco con fenol dentro de una campana de bioseguridad nivel IIB.

En las muestras siempre se encontró flora asociada la cual se elimino para no tener crecimiento no deseado en el cultivo y para esto se utilizo el método de Petroff siendo el más empleado en procedimientos de aislamiento de *M. tuberculosis* a partir de esputo (Cedrés *et al.*, s/f; Palomino y Portaels, 1998). En tubos identificados con tapón de rosca, se flamearon y agregó a cada uno un volùmen igual al contenido de la muestra de hidróxido de sodio al 4% con rojo de fenol. Enseguida, se agitaròn los tubos y se incubaròn por un lapso de 15 minutos a 37°C agitando periódicamente cada 5 minutos a la temperatura indicada.

Terminada la incubación se centrifugaròn los tubos a 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Eliminar cuidadosamente el sobrenadante en un contenedor el cual tiene tris de fenol al 5 % poniendo especial atención a las salpicaduras; realizando todo dentro de la campana de flujo lamina Nivel IIB. Se neutralizo el sedimento con ácido clorhídrico 1N antes de sembrar. El proceso de neutralización debe ser muy cuidadoso de manera que el pH no sea menor de 6.5 ni mayor de 7.2. para medir el pH se utilizaron tiras reactivas.

Una vez neutralizado se tomo una muestra y sembró en agar Middlebrook 7H10 colocándola con una pipeta Pasteur cerca del mechero para

evitar la contaminación. La siembra se realizó dentro de la campana con un mechero de gas encendido utilizando dos repeticiones de cultivo Middlebrook 7H10 enriquecido (Bauer *et al.*, 1997).

Se incubaron los tubos de forma inclinada a 37°C, por espacio de 6-14 semanas.

### **Tinción de Ziehl Nelsen (Bácilos Ácido Alcohol Resistentes; [BAAR]).**

La preparación de laminillas se hizo en los establos tomando la muestra tanto para el cultivo, como la preparación de frotis de exudado extendiéndola inmediatamente en la laminilla identificada y fijando con mechero de alcohol.

Una vez fijadas, se colocan los frotis sobre gradilla de acero inoxidable para portaobjetos donde se tiñeròn por la técnica de Ziehl Neelsen en una tarja del laboratorio; los resultados se determinaron de acuerdo con la información de resultados de la técnica de baciloscopia.

La protección personal que se utilizó en el establo fue la siguiente:

Overol, botas, guantes y doble cubre bocas.

La protección utilizada dentro del laboratorio fue la que a continuación se menciona:

Bata de cirujano, doble cubre bocas, guantes estériles, fenol para desinfectar el área de trabajo y campana de flujo laminar nivel IIb con luz ultravioleta.

### **Análisis de datos**

El análisis de los resultados se realizaron de manera descriptiva y se aplicaron los cálculos para los coeficientes de Cohen's Kappa para determinar especificidad y sensibilidad (Estrada-Chávez *et al.*, 2004).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS y DISCUSIÓN

En 1908 Albert Calmette y Camille Guérin comenzaron el cultivo con una cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* llamada Lait Nocard proveniente de una vaca con mastitis tuberculosa utilizando un medio de papa glicerizada. En 1921 después de 13 años y 230 pasajes el bacilo perdió su virulencia y adquirió capacidad antigénica (Araujo y Waard, 2004). Desde entonces se han hecho una infinidad de trabajos en cultivo con esta bacteria arrojando diferentes resultados.

De este modo tomando en cuenta la gran importancia que tiene la tuberculosis en los bovinos debido a las pérdidas económicas que causa y el riesgo de salud pública se llevó a cabo este trabajo, arrojando los siguientes resultados:

De las 85 muestras analizadas 7 nos mostraron resultado positivo en el medio de cultivo Middlebrook 7H10 utilizado en el experimento

En la técnica de baciloscopia con tinción Ziehl – Neelsen 9 nos dieron resultado positivo de las 85 muestras analizadas.

Al hacer la comparación de las diferentes técnicas con tuberculina nos dieron 16.7% de especificidad para cultivo, 18.4% para Ziehl Neelsen y sensibilidad 71.4% y 88.9% respectivamente.

Como es ya conocido la tuberculosis bovina es causada principalmente por el *Mycobacterium bovis* aunque también la puede causar el *Mycobacterium tuberculosis* los cuales son capaces de infectar una amplia gama de especies animales incluyendo al hombre, siendo una enfermedad infecciosa importante ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria pecuaria sobre todo en el ganado bovino (Ramírez-Casillas *et al.*, 2004).

Los recursos financieros totales gastados para la lucha mundial contra la tuberculosis en el 2004 y lo que va del 2005 son de 2200 millones de dólares, con un déficit anual estimado de 800 millones de dólares (OMS., 2005).

Con referencia en los resultados que se obtuvieron del experimento debemos tomar en cuenta los siguientes factores importantes para el cultivo que son:

La neutralización del pH de las muestras al momento de la descontaminación, ya que los resultados que se obtuvieron pueden atribuirse a esto debido que se tenían variaciones drásticas de pH, así como también la posible contaminación al momento de ser medido este con tiras reactivas hasta obtener un pH de 6.9 hasta 7.5 que es el ideal para cultivo de *Mycobacterium tuberculosis* según apuntes del Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio en Tuberculosis de 1992 de la Secretaria de Salud.

La falta de experiencia que se tenía para trabajar con el medio Middlebrook 7H10 ya que en el laboratorio no se ha trabajado con este medio por lo cual nos hace pensar que pudiera ser no tan específico para aislar *Mycobacterium* aun que en la literatura se encuentran reportes que es un medio apropiado para este microorganismo.

Otro factor que pudo haber afectado es el tiempo que duraban algunas muestras en el hidróxido de sodio, ya que al momento de neutralizar el pH muchas veces no se les podía establecer el nivel óptimo de este y las muestras que proseguían a la que se estaba neutralizando tardaban mas tiempo en el hidróxido de sodio que las neutralizadas al principio.

Otro factor que pudo haber afectado para el caso de Ziehl – Neelsen es la cantidad de muestra que se manejo para las laminilla ya que en todas no se recolecto 1ml de exudado y según reportes que se han tenido se necesitan al menos 10 000 bacterias por mililitro de muestra para poder identificar bacilos ácido alcohol resistentes al momento de la baciloscopia. Mientras que el cultivo requiere de unos pocos cientos de bacilos para su crecimiento en medios sintéticos (Blancarte *et al.*, 1992).

Como podemos observar en este caso el cultivo presentó menor sensibilidad que la prueba de tuberculina lo cual nos demuestra que este medio de cultivo no es muy apropiado para el crecimiento del Complejo

Mycobacterium así como también la tinción Ziehl Neelsen para el tipo de muestras manejadas bajo estas condiciones.

Las Micobacterias son microorganismos de características muy específicas y de crecimiento lento, a pesar de haber utilizado un medio comercial ya preparado y enriquecido con el objeto de ofrecerles las mejores condiciones para su crecimiento.

**Cuadro 3.-** Resultados de las pruebas del experimento y datos de las vacas.

| Fecha    | Muestra | # de arete | # de lactancias | Días en Leche | Estado Reproductivo | Ultimo Promedio de leche. | Tuberculina | Resultado de ZN | Cultivo Middlebrook 7H10 |
|----------|---------|------------|-----------------|---------------|---------------------|---------------------------|-------------|-----------------|--------------------------|
| 26-08-05 | 1       | 872        | 3               | 53            | fresca              | 41                        | +           | -               | -                        |
| 26-08-05 | 2       | 1417       | 3               | 64            | limpia              | 46                        | +           | -               | +                        |
| 26-08-05 | 3       | 3163       | 4               | 204           | inseminada          | 40                        | +           | -               | -                        |
| 26-08-05 | 4       | 3122       | 3               | 227           | gestante            | 30                        | +           | -               | -                        |
| 26-08-05 | 5       | 3012       | 4               | 199           | gestante            | 31                        | +           | -               | +                        |
| 26-08-05 | 6       | 3190       | 2               | 210           | inseminada          | 40                        | +           | -               | -                        |
| 26-08-05 | 7       | 3075       | 2               | 203           | gestante            | 33                        | +           | -               | -                        |
| 26-08-05 | 8       | 1362       | 2               | 476           | inseminada          | 29                        | +           | -               | -                        |
| 26-08-05 | 9       | 3147       | 3               | 317           | gestante            | 32                        | +           | -               | -                        |
| 26-08-05 | 10      | 3107       | 3               | 610           | gestante            | 9                         | +           | -               | -                        |
| 07-09-05 | 11      | 3185       | 2               | 324           | gestante            | 24                        | +           | +               | -                        |
| 07-09-05 | 12      | 2216       | 2               | 267           | gestante            | 29                        | +           | +               | -                        |
| 07-09-05 | 13      | 3133       | 2               | 216           | limpia              | 29                        | +           | -               | -                        |
| 07-09-05 | 14      | 1065       | 2               | 465           | gestante            | 36                        | +           | +               | -                        |
| 07-09-05 | 15      | 3061       | 2               | 290           | limpia              | 21                        | +           | +               | -                        |
| 07-09-05 | 16      | 3241       | 5               | 254           | gestante            | 25                        | +           | -               | -                        |
| 07-09-05 | 17      | 3441       | 2               | 206           | gestante            | 41                        | +           | -               | -                        |
| 07-09-05 | 18      | 3425       | 2               | 241           | inseminada          | 35                        | +           | -               | -                        |
| 07-09-05 | 19      | 3285       | 5               | 217           | gestante            | 31                        | +           | -               | -                        |
| 07-09-05 | 20      | 3266       | 2               | 289           | sucia               | 42                        | +           | +               | -                        |
| 22-09-05 | 21      | 7773       | 4               | 228           | limpia              | 27                        | +           | -               | -                        |
| 22-09-05 | 22      | 7791       | 4               | 272           | limpia              | 41                        | +           | -               | -                        |
| 22-09-05 | 23      | 183        | 3               | 94            | limpia              | 37                        | +           | -               | +                        |
| 22-09-05 | 24      | 7815       | 5               | 202           | limpia              | 4.3                       | +           | -               | -                        |
| 22-09-05 | 25      | 9770       | 4               | 89            | limpia              | 37                        | +           | +               | -                        |
| 22-09-05 | 26      | 9812       | 3               | 180           | gestante            | 50                        | +           | -               | -                        |
| 22-09-05 | 27      | 9256       | 4               | 236           | limpia              | 37                        | +           | -               | +                        |

|          |           |      |   |     |            |    |   |   |   |
|----------|-----------|------|---|-----|------------|----|---|---|---|
| 22-09-05 | <b>28</b> | 9274 | 4 | 126 | limpia     | 35 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>29</b> | 8323 | 4 | 202 | limpia     | 37 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>30</b> | 9912 | 4 | 33  | limpia     | 19 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>31</b> | 7938 | 4 | 24  | limpia     | 52 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>32</b> | 7546 | 5 | 250 | limpia     | 35 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>33</b> | 968  | 2 | 286 | limpia     | 26 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>34</b> | 7589 | 6 | 339 | limpia     | 28 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>35</b> | 9951 | 2 | 343 | gestante   | 40 | + | - | + |
| 22-09-05 | <b>36</b> | 2223 | 2 | 57  | limpia     | 46 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>37</b> | 7321 | 6 | 79  | limpia     | 25 | + | - | - |
| 22-09-05 | <b>38</b> | 8752 | 3 | 658 | limpia     | 26 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>39</b> | 7312 | 6 | 230 | gestante   | 28 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>40</b> | 7013 | 5 | 290 | gestante   | 33 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>41</b> | 8384 | 4 | 41  | inseminada | 34 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>42</b> | 9694 | 4 | 195 | gestante   | 43 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>43</b> | 9522 | 4 | 183 | gestante   | 29 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>44</b> | 8464 | 4 | 286 | gestante   | 43 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>45</b> | 9856 | 3 | 254 | gestante   | 36 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>46</b> | 1252 | 2 | 260 | gestante   | 37 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>47</b> | 9552 | 4 | 299 | gestante   | 34 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>48</b> | 7446 | 4 | 369 | gestante   | 12 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>49</b> | 9151 | 4 | 251 | gestante   | 30 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>50</b> | 9869 | 3 | 218 | gestante   | 37 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>51</b> | 9313 | 3 | 207 | gestante   | 27 | + | + | - |
| 24-09-05 | <b>52</b> | 9616 | 3 | 309 | limpia     | 25 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>53</b> | 7275 | 5 | 778 | gestante   | 14 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>54</b> | 9425 | 3 | 511 | gestante   | 26 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>55</b> | 9653 | 3 | 207 | gestante   | 27 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>56</b> | 554  | 2 | 176 | gestante   | 61 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>57</b> | 7255 | 5 | 461 | gestante   | 40 | + | + | - |
| 24-09-05 | <b>58</b> | 7110 | 6 | 175 | gestante   | 49 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>59</b> | 494  | 3 | 243 | gestante   | 34 | + | - | - |

|          |           |      |   |     |          |    |   |   |   |
|----------|-----------|------|---|-----|----------|----|---|---|---|
| 24-09-05 | <b>60</b> | 9688 | 3 | 451 | gestante | 5  | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>61</b> | 298  | 2 | 289 | gestante | 38 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>62</b> | 7030 | 4 | 146 | gestante | 51 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>63</b> | 8967 | 4 | 354 | gestante | 34 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>64</b> | 9564 | 3 | 234 | gestante | 41 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>65</b> | 9652 | 4 | 249 | gestante | 33 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>66</b> | 8645 | 4 | 360 | gestante | 24 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>67</b> | 838  | 3 | 220 | gestante | 36 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>68</b> | 7478 | 6 | 320 | gestante | 6  | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>69</b> | 1168 | 2 | 267 | gestante | 41 | + | - | - |
| 24-09-05 | <b>70</b> | 7040 | 5 | 231 | gestante | 49 | + | - | - |
| 19-10-05 | <b>71</b> | 2426 | 2 | 58  | limpia   | 53 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>72</b> | 7382 | 6 | 130 | gestante | 27 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>73</b> | 3967 | 1 | 48  | limpia   | 30 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>74</b> | 2032 | 2 | 173 | gestante | 44 | - | + | + |
| 19-10-05 | <b>75</b> | 1910 | 2 | 48  | limpia   | 31 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>76</b> | 2018 | 2 | 117 | gestante | 44 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>77</b> | 1821 | 2 | 132 | gestante | 35 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>78</b> | 7068 | 5 | 54  | limpia   | 38 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>79</b> | 2179 | 2 | 187 | gestante | 37 | - | - | - |
| 19-10-05 | <b>80</b> | 2144 | 2 | 173 | gestante | 33 | - | - | - |
| 24-10-05 | <b>81</b> | SN   | 0 | 0   | Becerra  | 0  | - | - | - |
| 24-10-05 | <b>82</b> | SN   | 0 | 0   | Becerra  | 0  | - | - | - |
| 24-10-05 | <b>83</b> | SN   | 0 | 0   | Becerra  | 0  | - | - | + |
| 24-10-05 | <b>84</b> | SN   | 0 | 0   | Becerra  | 0  | - | - | - |
| 24-10-05 | <b>85</b> | SN   | 0 | 0   | Becerra  | 0  | - | - | - |

+\* Presuntivamente positivos, se enviaron para confirmación al Centro Nacional de Referencia Epidemiológica de México DF.

## CONCLUSIONES

El aislamiento del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* en el medio de cultivo Middlebrook 7H10 es difícil por el bajo crecimiento que presenta.

La identificación de bacilos ácido alcohol resistentes por medio de la baciloscopia con la tinción Ziehl Neelsen no es apta para el tipo de muestras que se manejó.

La prueba de la tuberculina sigue siendo un método de diagnóstico de amplia sensibilidad y especificidad con la ventaja de poderla realizar en el campo.

## LITERATURA CITADA

1. **Aguilera, L. E.** 2002. Tuberculosis Bovina. Universidad. Nacional Río Cuarto.
2. **Aguirre, S. O.** 1981. Guía Climática de La Comarca Lagunera. CIAN-CAELALA-ANIA-SARH, Torreón, Coahuila, México.
3. **Alfonso, R.,** R. E. Romero, M. E. Patarroyo, y L. A. Murillo. 2002. Mtp-40 and Alpha Antigen Gene Fragment Amplification for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Colombian Clinical Specimens. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:1157-1163.
4. **Amadori, M.,** S. Tagliabue, S. Lauzi, G. Finazzi, G. Lombardi, P. Teloia, P. Pacciarini, y L. Bonizzi. 2002. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* Infection in Calves Sensitized by *Mycobacteria* of the *avium*/intracellulare Group. *J. Vet. Med.* 49:89-96.
5. **Annonimus.** 2004. Bovine Tuberculosis, p. 1-3, Center for Food Security and Public Health, Iowa Sate, USA.
6. **Araujo, Z.,** y J. H. Waard. 2004. Curso Latinoamericano Sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela.
7. **Atlas, R. M.,** y L. C. Parks. 1997. Microbiological Media, 2a. ed. CRC Press, New York, USA.
8. **Badillo Rosales, O.** 2004. Obtención de Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* a Partir de Tejidos Sospechosos a Tuberculosis Bovina, en Medio de Cultivo Lowenstein - Jensen. Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna., Torreon Coahuila Mexico.
9. **Bauer, J.,** V. O. Thomsen, S. Poulsen, y B. A. Andersen. 1997. False-Positive Results from Cultures of *Mycobacterium tuberculosis* Due to Laboratory Cross-Contamination Confirmed by Restriction Fragment Length Polymorphism. *J. Clinic. Microbiol.* 35:988-991.
10. **Blancarte, M.,** L., J. G. Anzaldo, y S. Balandrano, S. 1992. Manual de Técnicas y Procedimientos de Laboratorio en Tuberculosis., vol. 20. Secretaria de Salud., México, D.F.
11. **Broglia, B.,** E. Bonifachich, M. Cerqueiro, N. Díaz, G. Diez, N. González, G. Laube, I. Miceli, C. Pérez, J. Rey, y R. Silberberg. 2002. Criterios de

- diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis infantil. Arch. Arg. Pediatr. 2:159-178.
12. **Caminero Luna, J. A.** 2001. Mycobacterias Atípicas. *BSCP Can Ped.* 25:237-248.
  13. **Cedrés, J., F., J. Pesenti, R., M. Cicuta, E., M. Montenegro, A., G. Barrientos, J., y W. Roibón, R.** s/f. Tuberculosis y leucosis bovina: confirmación diagnóstica en decomisos de frigorífico (resultados preliminares). Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE. s/n:1-3.
  14. **Costa, J.** 2004. Reacción en Cadena de la Polimeraza (PCR) a Tiempo Real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 22:299-305.
  15. **Davis, D. B., R. Dulbecco, N. H. Eisen, y S. H. Ginsberg.** 1984. Tratado de Microbiología., 3a. ed. Salvat, Barcelona Esp.
  16. **Devallois, A., E. Legrand, y N. Rastogi.** 1996. Evaluation of Amplicor MTB Test as Adjunct to Smears and Culture for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the French Caribbean. *J. Clinic. Microbiol.* 34:1065-1068.
  17. **Díaz Otero, F., V. Banda Ruiz., L. Jaramillo Meza, C. Arriaga Díaz, D. González Salazar, and C. Estrada Chávez.** 2003. Identification of *Mycobacterium bovis* Infected Cattle by Immunological and Molecular Methods. *Vet. Mex.* 34:13-26.
  18. **Diegel, K. L., S. D. Fitzgerald, D. E. Berry, S. V. Church, W. M. Reed, J. G. Sikarskie, y J. B. Kaneene.** 2002. Experimental Inoculation of North American Opossums (*Didelphis virginiana*) with *Mycobacterium bovis*. *J. Wildlife Dis.* 38:275-281.
  19. **Estrada Chávez, C., F. Díaz Otero, C. Arriaga Díaz, N. Villegas Sepuveda, R. Pérez González, y D. González Salazar.** 2004. Agreement Between PCR and Conventional Methods for Diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Vet. Mex.* 35:225-226.
  20. **FAO.** 2004. Posting date. Tuberculosis. <http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/es/health/diseases-cards/ccpp.html>. [Online.]
  21. **Fredag, L. B., G. B. Melton, F. Collins, D. M. Klinman, A. Cheever, L. Stobie, W. Suen, y R. Seder.** 2000. CpG Oligodeoxynucleotides and Interleukin-12 Improve the Efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination in Mice Challenged with *M. tuberculosis*. *Infection And Immunity* 68:2948-2953.

22. **Gallardo Nieto, J.**, L. Villamar Angulo, H. Pérez Frías, and E. Olivera Cazares. 2004. Situación Actual de la Producción de Leche de bovino en México 2004. SAGARPA, Mexico Df.
23. **García García, M. L.**, E. Mayar Maya, L. Ferreyra Reyes, M. Palacios Martínez, C. Álvarez García, and J. L. Valdespino Gómez. 1998. Eficacia y Eficiencia del Tratamiento Antituberculoso en Jurisdicciones Sanitarias de Morelos. *Salud Publica Mex.* 40:421-429.
24. **García García, M. L.**, y J. L. Valdespino Gómez. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* en Pulmones sin Lesiones Tuberculosas, ¿Santuario Inmunológico? *Rev. Inv. Clin.* 58:460-461.
25. **García Quintanilla, A.**, L. García, G. Tudo, M. Navarro, J. González, y M. T. Jiménez de Anta. 2000. Single-Tube Balanced Heminested PCR for Detecting *Mycobacterium tuberculosis* in Smear-Negative Samples. *J. Clinic. Microbiol.* 38:166-1169.
26. **Garnier, T.**, K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, C. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P. R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, y R. G. Hewinson. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100:7877-82.
27. **Garza, R.**, y I. Treviño 2000, posting date. Tuberculosis Pulmonar. <http://mnemonica.org/docs/patologia/Tuberculosis.doc> unica. [Online.]
28. **Goh, K.**, S., N. Rastogi, M. Berchel, R. C. Huard, y C. Sola. 2005. Molecular Evolutionary History of Tubercle Bacilli Assessed by Study of the Polymorphic Nucleotide within the Nitrate Reductase (narGHJ) Operon Promoter. *J. Clinic. Microbio.* 43:4010-4014.
29. **Gómez, A.** 2005. Foco rojo por la tuberculosis en La Laguna, Vanguardia, Vol. 2005. Vanguardia.com, Saltillo, Coah. México.
30. **Guthertz, L. S.**, M. E. Griffith, E. G. Ford, J. M. Janda, y T. F. Midura. 1988. Quality Control of Individual Components Used in Middlebrook 7H10 Medium for Mycobacterial Susceptibility Testing. *J. Clin. Microbiol.* 26:2338-2342.
31. **Hope, J. C.**, M. L. Thom, B. Villarreal-Ramos, H. M. Vordermeier, R. G. Hewinson, y C. J. Howard. 2005. Vaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG induces protection against intranasal challenge with virulent *M. bovis*. *Clin. Exp. Immun.* 139:48-56.

32. **Jawetz, E.**, J. L. Melnick, y E. A. Adelberg. 1995. *Microbiología Médica.*, 15 ed. Manual Moderno.
33. **Loera Castañeda, V.**, J. Sánchez Corona, y M. C. Morán Moguel. 2003. El papel de las Técnicas de Biología Molecular en el Diagnóstico y Control de Tuberculosis. *Gaceta Med. Méx.* 139:288-290.
34. **Mariscal Mendendez, A.**, C. Ramírez Palacios, L. González Sánchez, y R. Zenteno Cuevas. 2005. Pobreza, resistencia a los medicamentos, diagnóstico, VIH-SIDA y su impacto en la evolución de la tuberculosis en México. *MedUNAB* 8:37-42.
35. **Mariscal Mendendez, A.**, C. Ramírez Palacios, L. González Sánchez, y R. Zenteno Cuevas. 2005. Pobreza, resistencia a los medicamentos, diagnóstico, VIH-SIDA y su impacto en la evolución de la tuberculosis en México. *MedUNAB* 8:37-42.
36. **Morán López, E.**, y Y. Lazo Amador. 2001. Tuberculosis. *Rev. Cub. Estomatol.* 38:33-51.
37. **Mostowy, S.**, J. Inwald, S. Gordon, C. Martin, R. Warren, K. Kremer, D. Cousins, y M. A. Behr. 2005. Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. *J. Bacteriol.* 187:6386-6395.
38. **Neill, S. D.**, R. A. Skuce, y J. M. Pollock. 2005. Tuberculosis – new light from an old window. *J. Appl. Microbiol.* 98:1261-1269.
39. **OMS.** 2005. Financiación sostenible de la prevención y el control de la tuberculosis, p. 2-4, 58ª Asamblea Mundial de la Salud, vol. 58A, Ginebra, Suiza.
40. **Palomino, J. C.**, y F. Portaels. 1998. Effects of Decontamination Methods and Culture Conditions on Viability of *Mycobacterium ulcerans* in the BACTEC System. *J. Clin. Microbiol.* 36:402-408.
41. **Paz Oplustil, C.**, S. R. Teixeira, S. Kimie Osugui, y C. F. Mendes. 2001. Impact of Automation in the Diagnosis of Mycobacterial Infection. *J. Bacteriol. Patol. Med. Laborat.* 38:170-173.
42. **Prescott, L. M.**, J. P. Harley, y D. A. Klein. 2002. *Microbiología.*, 5 ed. MC Graw Hill Interamericana., México, D.F.
43. **Qing, L.**, C. C. Whalen, M. J. Albert, R. Larkin, L. Zukowski, M. D. Cave, y R. F. Silver. 2002. Differences in Rate and Variability of Intracellular Growth of a Panel of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates within a Human Monocyte Model. *Infec. Inmun.* 70:6489–6493.

44. **Radostits, O. M.**, C. C. Gay, D. C. Blood, y K. W. Hinchclitt. 2002. Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino., 9ª ed, vol. 1. MC Graw Hill Interamericana, Mexico, D.F.
45. **Ramírez Casillas, I. C.**, M. A. Santillán Flores, C. Arriaga Díaz., B. Arellano Reynoso, and F. Morales Álvarez. 2004. Using a Multiplex PCR to Differentiate Between *M. bovis* BCG-Vaccinated and pathogenic *M. bovis*-infected goats. *Tec. Pecu. Mex.* 42:419-428.
46. **Reyes Corcho, A.**, M. Díaz Jidy, and A. Pérez Rodríguez. 2004. Tuberculosis y SIDA: algunos aspectos clínicos y epidemiológicos en 72 enfermos cubanos. *Rev. Cub. Med. Trop.* 56:35-41.
47. **Rhoades, E.**, y I. Orme. 1997. Susceptibility of a Panel of Virulent Strains of *Mycobacterium tuberculosis* to Reactive Nitrogen Intermediates. *Infect. Immun.* 65:1189-1195.
48. **Rodríguez Cuns, G.** s/f, posting date. Género *Mycobacterium*. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2024.pdf>. [Online.]
49. **Rodríguez Sánchez, I. P.**, y H. A. Barrera Saldana. 2004. La Reaccion en Cadena de la Polimerasa a dos Decadas de su Invencion. *Ciencia UANL* 8:323-335.
50. **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.
51. **Scanlon, M. P.**, y P. J. Quinn. 2000. Inactivation of *Mycobacterium bovis* in cattle slurry by five volatile chemicals. *J. App. Microbiol.* 89:854-861.
52. **Senado Dumoy, J.** 1999. El Riesgo de Enfermar de Tuberculosis. *Rev. Cub. Med. Gen. Integ.* 15:168-175.
53. **SENASA.** 2000. Pruebas Tuberculínicas (inoculación, lectura e interpretación) Preguntas y Respuestas, Argentina.
54. **Simon, S.**, y I. Listiawan. 2003. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A Molecular Perspective. *J. Indon. Med. Assoc.* 4:26-35.
55. **Soto Ospina, C. Y.** 2002. Caracterización de la Reacción Histoquímica de *Mycobacterium tuberculosis* con Rojo Neutro. Correlación con el Contenido de Sulfolipido. Universidad Autónoma de Barcelona, España, Barcelona, España.

56. **SSA.** 1995. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la Prevención y Control de la Tuberculosis en la Atención Primaria a la Salud. Diario Oficial de la Federación, México, D.F.
57. **SSA.** 2001. Programa de Acción Tuberculosis, vol. 1. Secretaria de Salud, México.
58. **Sullivan, H. M.** 2005. Bovine Tuberculosis, p. 1-2, New Mexico State University, New Mexico, USA.
59. **Tay Zavala, J., M. Gutiérrez Quiroz, y R. López Martínez.** 2003. Microbiología y Parasitología Medicas., 3 ed. Mendez Editores.
60. **Torres, P. M.** 2004, posting date. Pruebas Diagnosticas de Campo [Online.]
61. **Vantiem, J. S.** 2002. Bovine Tuberculosis., p. 1-3, APHIS USDA, Riverdale, MD, USA.
62. **Veterinaria, R. A. d.** s/f, posting date. *Mycobacterias*. [Online.]
63. **Ynterian, C. G.** 2000, posting date. Bactec 9050. [http://www.interlabdist.com.br/news\\_htm/internews\\_junho.htm](http://www.interlabdist.com.br/news_htm/internews_junho.htm) 107. [Online.]