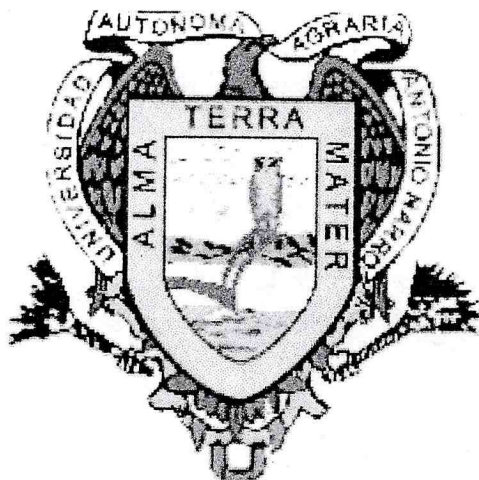


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“Diagnóstico diferencial entre *Mycobacterium bovis* y  
*Actinobacillus lignieresii* por medio de PCR en cortes de  
tejido incluidos en parafina”**

**POR**

**VÍCTOR HUGO MORENO GONZÁLEZ**

**TESIS**

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

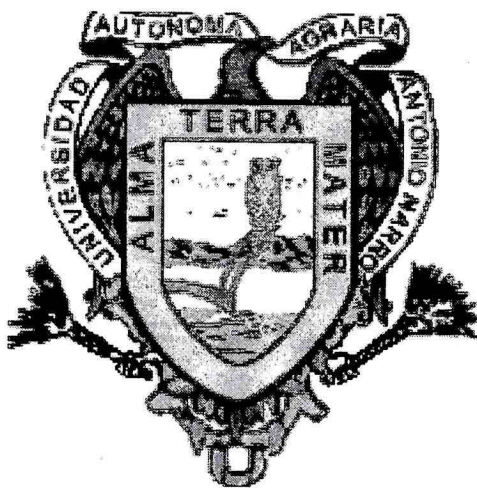
**TORREÓN COAHUILA, MÉXICO**

**AGOSTO DEL 2005**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**"Diagnóstico diferencial entre *Mycobacterium bovis* y  
*Actinobacillus lignieresii* por medio de PCR en cortes de  
tejido incluidos en parafina"**

**POR**

**VÍCTOR HUGO MORENO GONZÁLEZ**

**TESIS**

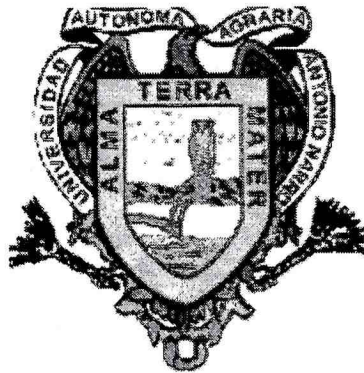
**ASESOR PRINCIPAL**

---

**DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”**

**UNIDAD LAGUNA  
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“Diagnóstico diferencial entre *Mycobacterium bovis* y  
*Actinobacillus lignieresii* por medio de PCR en cortes de tejido  
incluidos en parafina”**

**TESIS**

**DIRECTOR INTERNO: DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA**

**DIRECTOR EXTERNO: DR. JORGE E. CASTRO GARZA**

**ASESORES: MVZ. NELIDA JIMÉNEZ GONZÁLEZ**

**MVZ. EDITH NEVAREZ MARTÍNEZ**

00586

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**"Diagnóstico diferencial entre *Mycobacterium bovis* y  
*Actinobacillus lignieresii* por medio de PCR en cortes de  
tejido incluidos en parafina"**

**TESIS**

**POR:**

**VÍCTOR HUGO MORENO GONZÁLEZ**

**ASESOR PRINCIPAL**



---

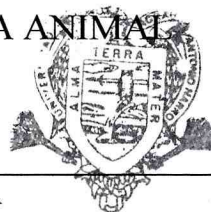
**DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA**

**COORDINADOR REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



---

**M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

UAAAN - UL

AGOSTO DEL 2005

TORREÓN COAHUILA, MÉXICO

*UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"*

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**PRESIDENTE**



---

**DR. MARCO A. HERNÁNDEZ VERA**

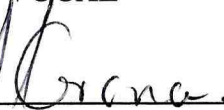
**VOCAL**



---

**M.C. JOSÉ LUIS FCO. SANDOVAL ELIAS**

**VOCAL**



---

**M.C. JOSÉ LUIS CORONA MEDINA**

**VOCAL SUPLENTE**



---

**M.C. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**



4.2.5.- Lesiones.....	30
4.3.- Diagnóstico.....	32
4.3.1.- Métodos tradicionales de diagnóstico de <i>A lignieresii</i> .....	32
4.3.2.- Métodos de diagnóstico para TBb.....	33
4.4.-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).....	37
4.4.1.-Extracción de DNA.....	38
4.4.2.-Reactivos.....	38
4.4.3.- Mecanismo.....	38
4.4.4.- Condiciones generales.....	39
4.4.5.- Naturaleza exponencial de los ciclos.....	42
4.4.6.-Visualización de los productos de la PCR.....	43
4.4.7.- Límites de la PCR.....	43
4.5.- Características moleculares.....	43
4.5.1.-Características molecular de <i>A. lignieresii</i> .....	44
4.5.1.1.-Gene 16S ARNr.....	44
4.5.1.2.-Factor 2 de Iniciación.....	44
4.5.1.3 Gene <i>GyrB</i> .....	45
4.5.2.-Características molecular de <i>M. bovis</i> (complejo <i>M. tuberculosis</i> ).....	45
4.5.2.1.-Secuencia de inserción IS6110.....	46
4.6.-Control y prevención de la TBb.....	47
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
5.1.- Toma de muestras.....	48
5.2.- Preparación y acondicionamiento de la muestra para histopatología...	49
5.3.- Extracción de DNA a partir de tejidos incluidos en parafina.....	50
5.3.1.- Desparafinación de los tejidos.....	50
5.3.2.- Extracción del DNA.....	50
5.4.- Selección y diseño de Iniciadores.....	51
5.4.1.- Iniciadores para amplificar un fragmento de la secuencia IS6110 de <i>M. bovis</i> .....	51

5.4.2.- Iniciadores internos de la secuencia de inserción IS6110 de <i>M. bovis</i> .....	52
2.4.3.- Diseño de iniciadores para la amplificación del gene <i>GyrB</i> de <i>A. lignieresii</i> .....	53
5.5.- PCR.....	54
5.5.1. – Amplificación de la secuencia IS6110 con los iniciadores IS41-IS43 (PCR externa).....	54
5.5.1.1.- Composición de los reactivos.....	55
5.5.2. – Amplificación de la secuencia IS6110 con los iniciadores IS1-IS2 (PCR interna).....	57
5.5.3. –Amplificación del gene <i>GyrB</i> de <i>A. lignieresii</i> .....	58
5.6.- Visualización de los productos de la PCR por Electroforesis.....	58
VI.-RESULTADOS.....	59
6.1.-Ensayo de PCR, Grupo-A.....	59
6.2.-Ensayo de PCR, Grupo-B.....	60
VII.-DISCUSIÓN.....	66
VIII.-CONCLUSIÓN.....	70
VII .-LITERATURA CITADA.....	71



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 4.1.- <i>M. tuberculosis</i> .....	14
Figura 4.2.- Interacción macrófago-micobacteria.....	18
Figura 4.3.- Mecanismo celular de la respuesta inmunitaria en la TB.....	21
Figura 4.4.-Tinción HE X 100.....	22
Figura 4.5.- Lesiones macroscópicas más frecuentes a la necropsia en un pulmón tuberculoso .....	23
Figura 4.6.-Apariencia microscópica de lesiones típicas de actinobacilosis.....	31
Figura 4.7.- Colonia de <i>A. lignieresii</i> en un ganglio linfático bovino.....	31
Figura 4.8.- Termociclador (Mastercycler gradient thermal cycler).....	39
Figura 4.9.-Desnaturalización del DNA.....	40
Figura 4.10.- Inicio de la reacción de PCR.....	40
Figura 4.11.- Progreso de la PCR.....	41
Figura 4.12.-Ciclos de la PCR.....	41
Figura 4.13- Naturaleza Exponencial de los ciclos.....	42
Figura 6.1.- Muestras sospechosas y negativas a TBb, Grupo A, PCR anidada...	59
Figura 6.2.- Muestras positivas a TBb, Grupo A, PCR anidada .....	60
Figura 6.3.- Muestras positivas a TBb, Grupo-B, PCR anidada.....	61
Figura 6.4 - Muestras sugestivas a Actinobacilosis, Grupo-B.....	62

ÍNDICE DE  
CUADROS Y GRÁFICAS

	pag
Cuadro 5.1.- Secuencia del elemento de inserción IS6110 de <i>M. tuberculosis</i> .....	52
Cuadro 5.2.- Localización de los iniciadores internos para IS6110.....	53
Cuadro 5.3.- Secuencia del gene <i>GyrB</i> de <i>A. lignieresii</i> .....	54
Cuadro 5.4.- Preparación de la mezcla de reacción de PCR Grupo-A.....	56
Cuadro 5.5.- Preparación de la mezcla de reacción de PCR Grupo-B.....	57
Cuadro 6.1.- Grupo-A. Resultados comparativos de las pruebas de diagnósticos para tuberculosis bovina de las muestras de tejido incluidas en parafina.....	63
Cuadro 6.2.- Grupo-B. Resultados comparativos de las pruebas de diagnósticos para tuberculosis bovina de las muestras de tejido incluidas en parafina.....	64
Gráfica 6.1.- Resultados.....	65

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR HABERME DADO LA VIDA, POR ESTA DICHA TAN GRANDE Y POR ILUMINAR MI CAMINO.

A MI MADRE Ma. VICTORIA MORENO GONZALEZ POR SU INFINITO AMOR Y POR SUS SACRIFICIOS PARA QUE PUEDA FORJAR MI DESTINO.

A MI ESPOSA ARACELI LEYVA MEZA Y A MI HIJO VICTOR HUGO MORENO LEYVA POR SU COMPRESIÓN, POR SU PACIENCIA, POR SER LA INSPIRACION Y LA FUERZA PARA SEGUIR ADELANTE.

AL DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA POR SU APOYO Y ORIENTACIÓN PROFESIONAL EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AI DR JORGE CASTRO GARZA POR SU ORIENTACIÓN PROFESIONAL EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA M.V.Z. NELIDA JIMÉNEZ G. POR SU VALIOSA COOPERACIÓN EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A LA M.V.Z. NEDITH NEVARES M. POR LA AYUDA Y ORIENTACIÓN BRINDADOS EN ESTE TRABAJO.

A MIS HERMANAS JESSICA AURORA MORENO GONZALEZ Y ALEJANDRA EDITH DURAN MORENO POR SU APOYO Y CARÍÑO.

A MIS SUEGROS SOCORRO MEZA ESPINOZA Y JOSE LEYVA POR SU APOYO DURANTE MIS ESTUDIOS.

A MI ALMA MATER POR SER DENTRO DE ELLA DONDE FORJE MI PROFESIÓN.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE CONTRIBUYERON A LA REALIZACIÓN DE ESTE ARDUO, DIFÍCIL PERO BENDITO CAMINO.

**DEDICATORIA**



**CON TODO MI AMOR PARA...**

**MI MADRE**

**VICTORIA MORENO GONZALEZ**

**MI ESPOSA**

**ARACELI LEYVA MEZA**

**MI HIJO**

**VICTOR HUGO MORENO LEYVA**

**MIS ABUELOS**

**JUAN PABLO MORENO DE SANTIAGO**

**VICTORIA GONZALEZ GUERRERO**

**MIS HERMANAS**

**JESSICA AURORA MORENO GONZALEZ**

**ALEJANDRA EDITH DURAN MORENO**

***DIOS LOS BENDIGA SIEMPRE...***

## RESUMEN

*Mycobacterium bovis* es el agente causal de la tuberculosis bovina (TBb) y *M. tuberculosis* es el agente más importante de la tuberculosis humana clásica (TB), son muy similares antigénica y genéticamente y causan una enfermedad clínicamente idéntica en humanos. *Actinobacillus lignieresii* es la especie de actinobacilos con mayor interés en patología veterinaria y es el agente causal de la enfermedad denominada “**lengua de madera**” que afecta a los bovinos principalmente. Ambos microorganismos se presentan en el ganado bovino como infecciones crónicas granulomatosas, por lo que, *A. lignieresii* debe de diferenciarse de una fase de la TBb. El objetivo de este trabajo fue el de realizar el diagnóstico diferencial entre *M. bovis* y *A. lignieresii* mediante la técnica de (PCR) (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en muestras de tejidos incluidos en parafina. Se tomaron 10 muestras negativas a TBb (tejido sin cambios patológicos aparentes), 20 muestras de tejidos incluidos en parafina positivas a TB (tejidos con lesiones granulomatosas y observación de bacilos alcohol-ácido resistente), 20 muestras de tejido incluidos en parafina sugestivos a TB (con la presencia de granulomas, pero sin la observación de bacilos alcohol-ácido resistentes). 10 muestras de tejido incluidos en parafina sugestivos a actinobacilosis (tejidos con lesiones piogranulomatosas). Se utilizaron los iniciadores IS41 e IS43 que amplifican un fragmento de 315 pb del elemento de inserción IS6110, y los iniciadores internos IS1 e IS2 que amplifica una región de 155 pb del amplicon dado por IS41 e IS43 para la detección de *M. bovis*. Para la detección de *A. lignieresii* se diseñaron los iniciadores GR-1 y GR-2 que amplifican una región de 182 pb del gene *GyrB*. Los resultados obtenidos mostraron que en solo el 23% de las muestras detectaron DNA micobacterial y en un 26% de los casos sospechosos a TBb no se pudo

determinar la presencia de *M. bovis* por PCR o histopatología. 10 muestras que prestaron lesiones compatibles con actinobacilosis fueron negativas para PCR al no detectar DNA micobacterial ni la presencia de DNA de *A. lignieresii*. La poca sensibilidad mostrada por la PCR puede ser explicada por la presencia de inhibidores de la reacción de la PCR al igual que la dificultad en la extracción del DNA micobacterial debido al bajo número de bacilos.

En el presente trabajo, no se determinó el diagnóstico diferencial entre *M. bovis* y *A. lignieresii* debido a que no se pudo probar la sensibilidad de los iniciadores para *A. lignieresii* al no presentar amplificación de los iniciadores probados y por falta de el control positivo. En los caso donde el agente causal de lesiones granulomatosas no fue detectado, podría deberse a otros agentes etiológicos o a una baja sensibilidad de la PCR producida por algunos inhibidores de la reacción.

La PCR debe de ser combinada en ciertas condiciones con protocolos de purificación para remover los inhibidores de la PCR y mejorar así los resultados, de esta manera se podrán obtener mejores resultados en el diagnóstico de la TBb y se podría confirmar los casos no claros para la histopatología.

---

Palabras Claves: tuberculosis, actinobacilosis, *Mycobacterium bovis*, *Actinobacillus lignieresii*, Reacción en Cadena de la Polimerasa, IS6110, *GyrB*.

## INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (TB) es considerada la principal causa de muerte en el mundo debida a un solo agente infeccioso. Se calcula que aproximadamente un tercio de la población mundial esta infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. Dos millones de personas mueren anualmente debido a esta enfermedad. En gran parte la falta en el control de la TB se debe a la aparición de cepas resistentes a drogas, a la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), además de problemas de hacinamiento y el debilitamiento de los programas de control del la TB (Salazar, 2002).

La tuberculosis bovina (TBb) es considerado una zoonosis y un problema de salud pública (Hamid y Col., 2002). Se estima que *Mycobacterium bovis* es el causante de mas de 7000 casos de tuberculosis humana cada año en América Latina (Milián y Col., 2000) y contribuye con el 1% al 30% de la tuberculosis pulmonar en los humanos (Espinosa de los Monteros y Col., 1998). *M. tuberculosis* y *M. bovis*, presentan una alta homología a nivel del DNA y producen una enfermedad clínicamente idéntica en humanos y tiene la capacidad de infectar a un amplio rango de especies domésticas (porcinos, caprinos, ovinos, equinos, caninos y felinos) y una gran variedad de animales silvestres (Niemann y Col., 2000; Corner y Col., 2003).

La TBb es considerada como una barrera en el comercio y continua siendo un problema económico para la agricultura de muchos países, se estiman perdidas económicas de cientos de miles de millones de dólares al año (Pedrosa y Col., 2000; Estrada-Chávez y Col., 2001). Estas perdidas se relacionan con la disminución en la ganancia de peso, baja en la producción de leche (de hasta un 17 %) y fertilidad en los hatos infectados. Los costos adicionales incluyen, aumento en el porcentaje de reemplazos por muerte prematura en

vacas, pruebas de diagnóstico, decomisos de canales y medidas de control (Coetsier, y Col. 2000).

La TBb se manifiesta en el ganado bovino como una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que se disemina rápidamente en el hato (Hamid y Col., 2002). Las manifestaciones clínicas son variables, las lesiones primarias se presentan en los pulmones causando bronconeumonía (Menzies y Neill, 2000). La erosión del parénquima tuberculoso hacia el torrente sanguíneo o linfático puede favorecer la diseminación del organismo en una forma miliar y producir lesiones en forma de pequeños nódulos involucrando a los nódulos linfáticos del tracto respiratorio principalmente (Chávez y Lizardi, 2002).

Existen una gran variedad de padecimientos que comparten características epidemiológicas, clínicas e incluso histopatológicas con la tuberculosis bovina (TBb) lo que puede dificultar el diagnóstico (Castañeda y Laniado-Laborín, 2002). Dichos padecimientos se presentan como enfermedades granulomatosas de curso crónico con la peculiar imagen de “gránulos de azufre” o “colonias de mazas” y estos pueden deberse a una gran variedad de agentes etiológicos como lo son *Actinobacillus lignieresii*, *Actinomyces bovis*, *Staphylococcus spp*, *Manhemia spp*, *Brucella spp*. Coccidioidomicosis, así como también reacción a cuerpos extraños, etc (Woolcock, 1984; Castañeda y Laniado-Laborín, 2002; Park y col., 2003).

*M. bovis* y *A. lignieresii* se presentan en el ganado bovino como infecciones intracelulares crónicas que producen lesiones inmuno-patológicas (Woolcock, 1984), por lo cual la diferenciación entre ambas infecciones se complica porque producen lesiones granulomatosas principalmente en linfonódulos, por tanto *A. lignieresii* debe diferenciarse de una fase de la TBb donde los ganglios linfáticos faríngeos y el canal esofágico se encuentren involucrados (Merchant y Pocker, 1980; Simón, 2001)



La actinobacilosis es una enfermedad que se presenta tanto en formas esporádicas como en epizootias en el ganado bovino (Freeman 1984), produce lesiones que van desde supurativas hasta granulomatosas, el agente etiológico es *A. lignieresii*, el cual es un habitante normal de la cavidad oral de los rumiantes y es un patógeno oportunista que produce enfermedad cuando la integridad de sus hospedadores se ve comprometida, por la inoculación directa del germen en el tejido de la submucosa debido a traumatismos producidos por alimentos toscos u objetos cortantes (Sergent, 1999; Rycroft y Garside., 1999)

El diagnóstico de la TBb se basa en la detección microscópica que carece de especificidad y tiene una sensibilidad máxima de 80%. La identificación por cultivo es lenta y requiere métodos radiométricos (Laniado-Laborín y Col., 2001). Las técnicas inmunohistológicas aplicadas directamente al espécimen son más sensibles que la tinción de Ziehl Neelsen pero la especificidad sigue siendo controversial. Es evidente la necesidad de contar con pruebas de diagnóstico más sensibles, rápidas, simples y específicas para la detección de micobacterias (Coetsier y Col., 2000).

En el diagnóstico, las secuencias de ácidos nucleicos presentan un valor potencialmente mayor que las características fenotípicas tradicionalmente usadas, porque estas contienen más información evolutiva, por ser más exactas y por ser relativamente más simples de identificar (Hedegaard y Col. 1999). Desde la invención de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha utilizado para la detección de *M. tuberculosis* (Rodríguez y Col., 2000).

Los ensayos moleculares como la PCR permite una identificación rápida y específica a partir de nódulos linfáticos con lesiones típicas de tuberculosis, con un límite inferior de detección que varía de 1 a 100 bacilos por mililitro de muestra, esta es una ventaja si tomamos en cuenta que el análisis microscópico tiene un límite inferior de detección de  $10^4$  bacilos por mililitro de muestra mejorando la sensibilidad entre el 35 al 39 % con respecto a los análisis histopatológicos y reduciendo el tiempo del diagnóstico de 36 a 72 horas (Coetsier y Col., 2000; Rodríguez y Col., 2000).

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de DNA con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima de DNA polimerasa termoestable (Rodríguez y Barrera, 2004). Una forma de optimizar la PCR es realizando una PCR “nested” o “anidada”, que consiste en dos reacciones de PCR con el fin de hacer más específica la amplificación y aumentar el rendimiento (Loera-Castañeda y Col., 2003).

Los elementos de inserción (IS), son elementos genéticos transpuestos presentes en múltiples copias en un genoma y son capaces de moverse a una nueva localización (Fang y Col., 2001). *M. tuberculosis* contiene en su cromosoma la secuencia de inserción IS6110 la cual pertenece a la familia móvil IS3 del elemento de secuencia de inserción enterobacterial (Vera-Cabrera y Col., 2001). Esta inserción está presente en otras especies del complejo *M. tuberculosis* pero ausente en micobacterias que no están tan estrechamente relacionadas. La IS6110 es utilizada por los laboratorios que desarrollan sistemas de detección de TB por amplificación de ácidos nucleicos, debido a que existen múltiples copias y es fácil de estandarizar (Zenteno, 2003).

En el caso de *A. lignieresii* el gene *GyrB* es utilizado para realizar trabajos con el fin de su identificación y determinar las relaciones filogenéticas entre *Pasteurellaceae* por medio de PCR (Hedegaard y Col., 1999).

La National Center for Biotechnology Information (NCBI) ofrece el programa BLAST el cual es un método estadístico que permite una búsqueda rápida de secuencias de genes y muestra el porcentaje de similitud con otros organismos diferentes. Este programa está disponible gratuitamente en internet (Benson y Col., 1996)

La elección del gene *GyrB* fue debido a los resultados obtenidos en la búsqueda BLAST para la secuencia de este gene, la cual mostró un 80% de semejanza con *Haemophilus ducreyi* (agente etiológico del chancro en el humano) y mostró una menor similitud con otros organismos. De igual forma mostró un 80% de semejanza con *H. ducreyi* en el diseño de iniciadores específicos para *A. lignieresii*.

La PCR parece promisorio para la identificación de microorganismos causantes de enfermedad en animales infectados, como de patógenos potenciales en animales sanos o sus ambientes y como una herramienta para el estudio de la epidemiología, además pueden facilitar el procesamiento de muestras clínicas a gran escala para programas en el control de la tuberculosis (Coetsier y Col., 2000).

El objetivo del presente trabajo fue el de realizar el diagnóstico diferencial entre *M. bovis* y *A. lignieresii* utilizando la técnica de PCR en cortes de tejidos incluidos en parafina que son utilizados para el diagnóstico de histopatología. También determinar la presencia de DNA micobacterial en muestras de tejidos sospechosos a TB, donde no se pudo determinar la presencia del bacilo alcohol-ácido resistente por medio de histopatología. Además se diseñaron un par de iniciadores específicos para la identificación de *A. lignieresii* en muestras piogranulomatosas sospechosas a actinobacilosis,

## II.- OBJETIVOS.

1. Realizar el diagnóstico diferencial entre *M. bovis* y *A. lignieresii* mediante PCR en cortes de tejidos incluidos en parafina.
2. Diseñar un par de iniciadores específicos para *A. lignieresii*.
3. Descartar la presencia de *M. bovis* en muestras de tejidos sugestivos a actinobacilosis.

### III.- HIPÓTESIS.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que permitirá la detección de DNA de *M. bovis* y *A. lignieresii* en cortes de tejidos incluidos en parafina con lesiones sospechosas a tuberculosis y a actinobacilosis y confirmará los casos no claros para la histopatología, donde en dichas lesiones sugestivas a tuberculosis no se demuestra la presencia de bacilos alcohol-ácido resistentes.

## IV.- REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 4.1.- TUBERCULOSIS BOVINA.

La Tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad infecciosa de carácter típico crónico, que se caracteriza por lesiones granulomatosas en el tejido infectado. Se considera un problema socio-económico en todo el mundo y una enfermedad devastadora en la ganadería, afecta a humanos y especies animales domésticos, mamíferos salvajes y en bovinos esta extendida por todo el mundo.

#### 4.1.1.- Complejo *Mycobacterium*:

##### 4.1.1.1.- Antecedentes.

La Tuberculosis (TB) es un padecimiento casi tan antiguo como la humanidad misma; su transmisibilidad se conocía desde antes del año 1000 AC (Moreno, 2004). En la literatura de la antigüedad se hace referencia a esta enfermedad y algunas momias egipcias muestran lesiones de la infección (González, 2004). Existen escritos hindúes sobre la TB que datan del año 700 AC. En la era hipocrática la llamaron *tisis* (fundirse o derretirse en griego), Aristóteles sugirió que era causada por una sustancia que se respiraba. En la época de Cristo al nódulo pulmonar se le llamo *tuberculum*, en latín (Moreno, 2004).

En el siglo XVI, Jerónimo Fracastoro, médico y poeta italiano, menciona por primera vez la teoría del contagio. Villemin en 1865, anuncio que había podido provocar la TB en un animal mediante el injerto de un tubérculo (Moreno, 2004).

La historia de la investigación científica en tuberculosis ha vivido momentos cruciales. El primero fue el descubrimiento del bacilo por Robert Koch en 1882 (González, 2004). Posteriormente, Calmette y Guerin desarrollaron la vacuna con una cepa atenuada de *M. bovis* (BCG) cuyo uso se extendió a casi todo el mundo. Por esa época se vivió otra etapa importante en la lucha contra este mal, al desarrollarse un arsenal de antibióticos de gran eficacia. Estos avances, así como el desarrollo de campañas sanitarias eficaces, resultaron en una disminución progresiva de los casos de tuberculosis al punto de que la llamada “plaga blanca” se consideró una enfermedad en vías de extinción. Esta predicción optimista, desafortunadamente se ha visto desmentida por la reemergencia observada a partir de la década de 1980, tanto en países ricos como pobres. Otro evento crucial en la historia de la investigación científica en tuberculosis, es la caracterización completa del genoma de *M. tuberculosis* (Mancilla, 2004).

#### 4.1.1.2.- Salud pública.

La TB es la principal causa de muerte en el mundo. Se calcula que aproximadamente un tercio de la población mundial esta infectada con *M. tuberculosis* (Salazar, 2002). *M. bovis* es el causante de mas de 7000 casos de TB humana cada año en América Latina (Milián y Col., 2000), Además se estima que del 1 al 30% de tuberculosis extra-pulmonar en humanos es producida por *M. bovis*, presentándose en el tracto gastrointestinal, en los linfonódulos cervicales y mesentéricos, en peritoneo y en el tracto genito-urinario (Espinosa de los Monteros y Col., 1998; Hamid y Col., 2002). En décadas pasadas, la incidencia de TB causada por *M. bovis* era alta. Sin embargo, recientemente con la pasteurización de la leche, la incidencia de TB humana por *M. bovis* a disminuido en países desarrollados (Milián y Col., 2000).

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistente a drogas y la interacción con la con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) han convertido nuevamente a la TB en un problema serio de salud pública en el mundo (Zúñiga y Col., 2000). Dos millones de personas mueren anualmente debido a ella (Salazar. 2002). El 30% de las personas que mantienen contacto con pacientes bacilíferos se infectan. En términos generales solo del 5 al 15% desarrollan la TB activa, la cual sin tratamiento pueden seguir un curso prolongado y causar la muerte en 2 ó 3 años (Zenteno, 2003). Las estadísticas actuales estiman que entre los años 2000 y 2020, se infectarán aproximadamente mil millones de personas, 2000 millones desarrollaran la enfermedad activa y 35 millones morirán a causa de la TB (Zúñiga y Col., 2000). En México la tasa de incidencia varía entre entidades, que van de los 5 casos por 100 mil habitantes en Guanajuato hasta los 38 por 100 mil habitantes de Tamaulipas. La tasa registrada en los países desarrollados es de 0.5 por 100 mil habitantes y depende de la densidad de grupos relativamente marginados como inmigrantes, hispanos, afroamericanos y pacientes con SIDA (Trejo y Col., 2003).

#### 4.1.1.3.- Características generales.

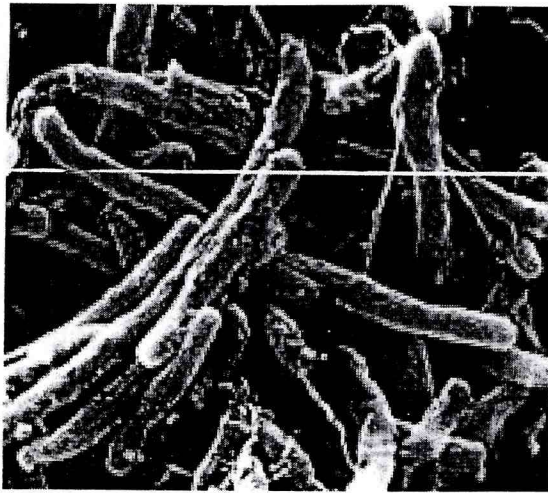
Las micobacterias taxonómicamente pertenecen al orden *Actinomycetales*, de la familia *Mycobacteriaceae*, del genero *Mycobacterium*, este genero incluye mas de 100 especies y su taxonomía y clasificación son complejas y están en constante revisión (Fagundo y Col., 2004). Runyon propuso agrupar a las micobacterias diferentes a *M. tuberculosis* como “atípicas” en base a su velocidad de crecimiento y producción de pigmentos. En la actualidad los avances en genética sugieren una clasificación de orientación clínica en dos grandes grupos: complejo *M. tuberculosis* que incluyen a *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* *M. microti* y *M. canetti*, entre las cuales existe una



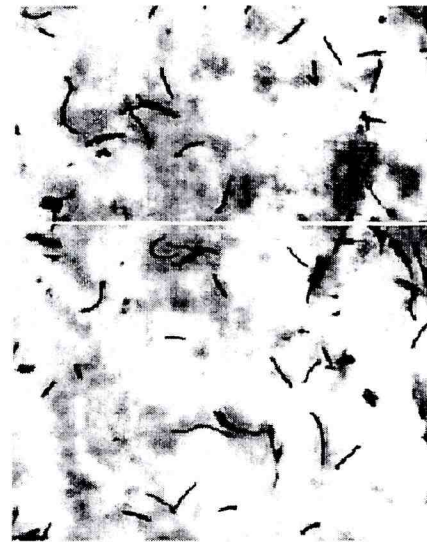
alta homología a nivel del DNA y producen enfermedad tanto en humanos como en animales (Niemann y Col., 2000; Fagundo y Col., 2004). El otro grupo es el complejo MOTT (otras micobacterias diferentes al complejo *M. tuberculosis*) que no causan TB pero pueden causar enfermedad en individuos inmunocomprometidos. Las micobacterias del complejo MOTT pueden ser aisladas a partir del agua y del suelo, pero pueden ser colonizadores habituales de superficies mucosas corporales o ser contaminantes en el laboratorio, por este motivo es importante la identificación correcta para evitar diagnósticos falsos (Fagundo y Col., 2004).

Las micobacterias son bacilos delgados, aerobios, no esporulados, no capsulados e inmóviles (fig. 4.1) (Fagundo y Col., 2004). puede permanecer durante periodos prolongados de 30 a 40 días o meses al aire libre cuando las condiciones de temperatura y humedad son optimas (Menzies y Neill., 2000). Una de las características principales de las micobacterias es la ácido-resistencia, esta propiedad se debe a la resistencia que tiene el microorganismo para teñirse, gracias a una pared rica en lípidos., pero un vez que captan el colorante (fucsina fenicada) resisten a la decoloración con alcohol acidificado y por ello se les llama bacilos alcohol-ácido resistentes (Blackwood y Col., 2000; Fagundo y Col., 2004).

El cromosoma del bacilo de la TB está integrado por cerca de 4.4 millones de bases y 4000 genes, con alto contenido de citosina-guanina (lo que se traduce en una composición peculiar de aminoácidos), rico en DNA repetitivo particularmente en secuencias de inserción y joven en términos evolutivos (Barrera, 2000 ).



(a)



(b)

Figura 4.1.- *M. tuberculosis*. (a) *M. tuberculosis* mide 2-6 micras de largo por 0.2 de ancho, son ligeramente curvados y con granulaciones. (b) Frotis de expectoración teñidos con la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) los bacilos abundantes se tiñen de rojo brillante sobre fono azul (Carrada, 2002).

#### 4.1.2.- Tuberculosis Bovina.

La TBb es causada por *M. bovis* y produce una enfermedad respiratoria crónica, contagiosa del ganado que se propaga horizontalmente, dentro de la misma especie y entre otras por medio de aerosoles e ingestión del bacilo (Hamid y Col., 2002).

Representa un problema de salud importante por tener fuertes implicaciones en la producción y salud animal. Las fuertes pérdidas económicas se relacionan a disminución en la ganancia de peso, baja en la producción leche (de hasta un 17 %) y menor porcentaje de fertilidad en los hatos infectados. Los costos adicionales incluyen, aumento los reemplazos por muerte prematura en vacas, pruebas de diagnóstico y medidas de control (Coetsier y Col., 2000). La TBb es considerado como una barrera en el comercio y continua siendo un

problema económico para la agricultura de muchos países, se estiman pérdidas económicas de cientos de miles de millones de dólares al año (Pedrosa y Col., 2000).

#### 4.1.2.1-Epidemiología.

La TBb persiste en casi todas las naciones en vía de desarrollo y desarrolladas del mundo. La incidencia de la enfermedad es más alta en los países en desarrollo debido a la ausencia o a la deficiencia en los programas de erradicación de la enfermedad (Hamid y Col., 2002). A pesar de que muchos países han erradicado exitosamente la TBb en algunos otros países continúa la infección con *M. bovis* aunque los programas de erradicación sean similares y este fracaso se atribuye a los reservorios del bacilo y al ganado infectado que se desconoce (Menzies y Neill, 2000).

Los mamíferos y una gran variedad de aves poseen micobacterias de una extraordinaria variabilidad y adaptabilidad que pueden adquirir propiedades especie-específicas (Hamid, y Col. 2002). *M. bovis* tiene la capacidad de infectar a un amplio rango de especies domésticas (porcinos, caprinos, ovinos, equinos, caninos, felinos) y una gran variedad de animales silvestres (Corner y Pfeiffer, 2003).

En la República de Irlanda la TBb persiste en la población del ganado a pesar de los programas de erradicación y esto se debe a que existe un gran movimiento de ganado en el país y se han mantenido reservorios de la infección en animales domésticos y salvajes. En Irlanda y en el Reino Unido el tejón es considerado como una fuente principal de infección exterior a la población del ganado y es un factor que contribuye en el brote repetido en manadas observadas en ciertas áreas del país (O'Brien y Col., 2000). En la India y Pakistán

la incidencia de la TBb en el ganado es alto y los búfalos son un importante reservorio para esta enfermedad (Hamid, y Col. 2002).

En México, la campaña nacional para la erradicación de la TBb (CANETB) considera los estados fronterizos del norte, con excepción de Baja California Norte a Quintana Roo y Yucatán en etapa de erradicación, el resto del territorio nacional se considera como zona en control (Estrada-Chavéz y Col., 2004).

#### 4.1.2.2.-Transmisión.

El sistema respiratorio es claramente la principal ruta por la cual ocurre la infección y su propagación entre el ganado (Menzies y Neill, 2000). Se ha demostrado que el 30% de las vacas tuberculosas expulsan *M. bovis* a través del tracto respiratorio (Díaz y Col., 2003). La infección por *M. bovis* puede establecerse por un solo bacilo que alcance la superficie alveolar del pulmón (Menzies y Neill, 2000). La TBb es multifactorial, es importante el cuantificar la importancia que tiene la transmisión entre bovinos y el rol de los animales salvajes en la transmisión y mantenimiento de la enfermedad, así como también los factores ambientales (Skuce y Col., 2002)

La excreción respiratoria y la inhalación de *M. bovis* es considerada como la principal ruta para la transmisión de bovino a bovino. El bacilo tuberculoso es transportado en el núcleo de una gotita de esputo por vía aérea, al establecerse el bacilo en el tejido sobreviene un periodo de latencia , seguido de la infección y de la excreción del bacilo tuberculoso en un periodo de 87 días aproximadamente. (Menzies y Neill, 2000).

La vía digestiva es considerada como la segunda forma mas importante de transmisión. La ingestión de *M. bovis* por medio de pastura, agua o fomites va del 10 al

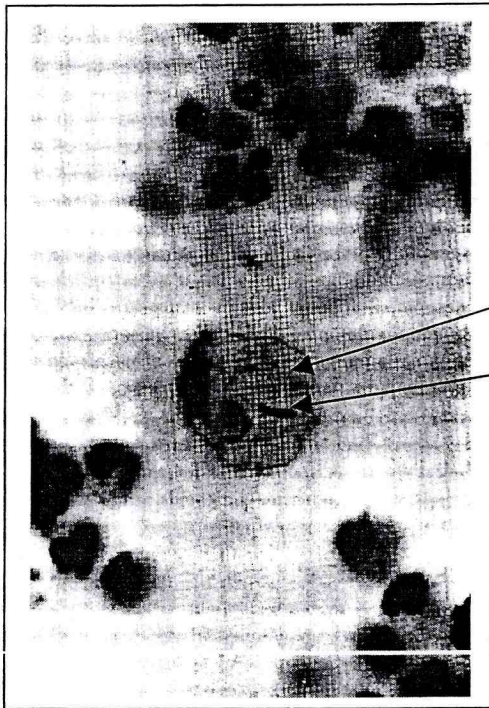
20% de los casos, además hay contagio por amamantar becerros con leche de vacas con mastitis tuberculosa (Pollock y Neill, 2001). La diseminación de *M. bovis* por medio de la leche, orina y heces fecales tiene una menor importancia en la enfermedad del ganado comparada con la infección por vías aéreas. La excreción de *M. bovis* por medio de las heces se debe a que el animal traga exudado contaminado con las lesiones procedentes del pulmón afectado (Menzies y Neill, 2000).

#### 4.1.2.3.-Patogenia.

Posterior a la inhalación de los núcleos de las gotas estos son acarreados al árbol bronquial y se implantan en los bronquios o en el alveolo, el bacilo tuberculoso crece lentamente, dividiéndose aproximadamente cada 25 a 35 horas dentro del macrófago (fig. 4.2) (Chávez y Lizardi, 2002).

No se conocen endotoxinas ni exotoxinas para el complejo tuberculoso, por lo tanto no existe una respuesta inmediata por el hospedero (Chávez y Lizardi, 2002). Una vez que el bacilo ha llegado al pulmón, se inicia una serie de mecanismos destinados a su eliminación, se han descrito cuatro posibles consecuencias durante el proceso infeccioso: **a)** la respuesta puede ser efectiva conduciendo a la eliminación y muerte del bacilo, jamás se desarrollara TB clínica; **b)** el sistema inmune puede impedir el crecimiento del bacilo sin su eliminación total, esto puede sospecharse con positividad a la prueba intradérmica de PPD; **c)** los microorganismos que quedaron latentes, eventualmente pueden multiplicarse y producir una reactivación; **d)** la micobacteria no es eliminada totalmente y empieza a multiplicarse por 2 o 12 semanas, en este periodo el animal se encuentra en un estado denominado anérgico debido a que la inmunidad celular está en proceso de desarrollo

(Jiménez y Col., 2001), cuando se alcanza un número de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> organismos, se hacen suficiente para promover una respuesta a la infección que pueda ser detectada por una reacción dérmica a la tuberculina (Díaz y Col., 2003).



Macrófago

*M. tuberculosis*

Figura 4.2.- Interacción macrófago-micobacteria. en el centro de la preparación microscópica se observa un macrófago, en su interior lleva un bacilo tuberculoso. *M. tuberculosis* es un parásito intracelular muy exitoso. Tinción ZN x 100. (Carrada, 2002)

Antes del desarrollo de la inmunidad celular, los bacilos tuberculosos se diseminan por vía linfática a los nódulos linfáticos hiliares y de ahí al torrente sanguíneo hacia lugares más distantes. Los organismos depositados en zonas superiores del pulmón, riñón, huesos y cerebro pueden encontrar entornos que favorecen su crecimiento (Chávez y Lizardi, 2002).

#### 4.1.2.3.1.-Mecanismo celular de la respuesta inmunitaria en la TB

La TB es una enfermedad granulomatosa, el papel de este mecanismo está enfocado al confinamiento de bacilos que se multiplican activamente en un granuloma debido a una respuesta de hipersensibilidad del tipo tardío a los antígenos de las bacterias. Esta reacción se encuentra inicialmente por macrófagos (respuesta inmune natural) y posteriormente por células T CD4+ de tipo 1 (células Th1) y por células T citotóxicas CD8+. Dichas células fagocitan y eliminan micobacterias por una serie de mecanismos de producción de óxido nítrico y otros reactivos activos de oxígeno que se vuelve altamente tóxicos y letales para muchos microorganismos intracelulares. En respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos producen interleucinas 12 (IL-12) que promueve la producción de gamma interferón (IFN $\gamma$ ) por parte de células TCD4+, T CD8+ y células NK, que forman parte de la respuesta del tipo-1 y el IFN $\gamma$  promueven activación celular (Zúñiga y Col., 2000).

La afluencia de leucocitos y fibroblastos forma esta estructura en un intento de segregar la infección, al prevenir la diseminación bacteriana a las partes restantes del pulmón y a otros órganos o al foco de la respuesta inmune directa en el sitio de la implantación. El factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) es una citosina inducible que posee actividad proinflamatoria, catabólica e inmunoestimulante. (Zúñiga y Col., 2000).

Los macrófagos y las proteínas tienen un papel importante en el transporte de cationes divalentes como Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup> al interior del compartimiento fagolisosomal, lo cual facilita el proceso de acidificación dentro de dicha estructura. El descenso del pH provoca la transformación de algunos compuestos nitrogenados en ácido nítrico,

posteriormente en óxido nítrico y otros compuestos nitrogenados altamente reactivos y tóxicos que suelen ser letales para muchos microorganismos intracelulares, de esta manera controlando la infección (figura 4.3) (Zúñiga R., y Col., 2000). Pero cuando un macrófago alveolar puro desde el punto de vistas inmunitario envuelve a un bacilo tuberculoso le suministra el ambiente nutricional necesario dentro del fagosoma, donde el bacilo sobrevive y se multiplica (Pollock y Neill, 2001). y si la expresión de la inmunidad del hospedero no es efectiva completamente, da como resultado que puedan sobrevivir bacilos elevando el estado crónico de la enfermedad (Turner y Col., 2003).

Una gran ductilidad en el metabolismo y una gran capacidad para sintetizar proteínas dedicadas a la óxido-reducción, al transporte de oxígeno y al almacenamiento, justifican la resistencia del bacilo en el granuloma, en microaerobiosis, frente al estrés oxidativo generado por células fagocíticas o ante la limitación de nutrientes (Barrera, 2000).

La patogenia de la reinfección difiere de la primoinfección en que la reacción neutrófila pura es más breve y desde el comienzo la reacción adopta la forma exudativa aguda intensa, en si, es la fase de infección que sigue a la reinfección de un animal previamente expuesto. Se ha comprobado en las lesiones primarias que experimentan fibrosis parcial e incluso calcificación, la persistencia de bacterias viables por muchos años y de hecho esto puede provocar en cualquier momento la reinfección endógena (Pollock y Neill, 2001).



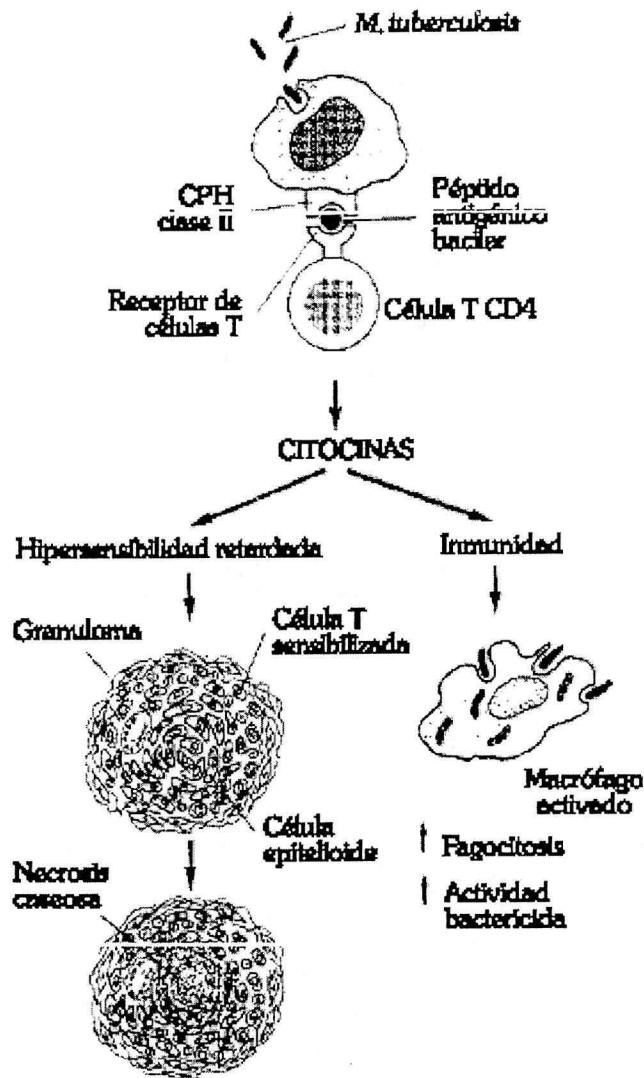


Figura 4.3 Mecanismo celular de la respuesta inmunitaria en la TB.

Las células dendríticas presentadoras de antígeno (CPH) estimulan los receptores de linfocitos T (CD-4) que liberan las citocinas responsables de la inmunidad celular, la hipersensibilidad retardada y de la formación de granulomas. Se sabe que los linfocitos Th-1 favorecen la capacidad defensiva del hospedero. (Carrada, 2002)

#### 4.1.2.4.- Lesiones.

Las lesiones granulomatosas son la característica clásica de la tuberculosis, la morfología del granuloma es caracterizada por una necrosis caseosa central la cual esta rodeada por una capa de macrófagos epiteliales, que es rodada a su vez por una capa concéntrica de linfocitos y fibrosis, ocasionalmente son vistas células gigantes multinucleares y células plasmáticas (figura. 4.4 ) (Turner y Col., 2003).

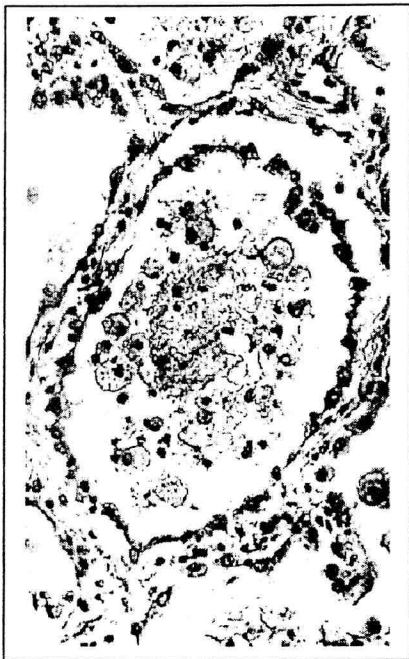


Figura 4.4.-Tinción HE X 100.En el estudio microscópico de los pulmones se observa un alveolo con abundante exudado de macrófagos y linfocitos (Carrada, 2002).

La TB que se desarrolla como resultado de una activación endógena o latente, usualmente causa anomalías en uno o en ambos ápices pulmonares, conforme la TB progresa, el material infectado puede ser diseminado por vía aérea hacia otras partes de los pulmones causando bronconeumonía (figura. 4.5) (Carrada, 2002).

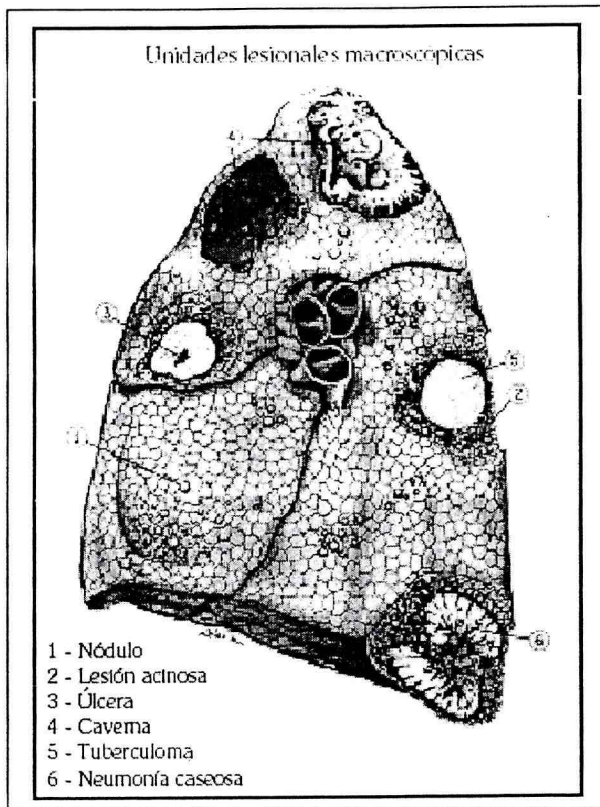


Figura 4.5.- Lesiones macroscópicas mas frecuentes a la necropsia en un pulmón tuberculoso (Carrada, 2002)

La erosión del parénquima tuberculoso hacia el torrente sanguíneo o linfático puede favorecer la diseminación del organismo en una forma miliar y producir lesiones en forma de pequeños nódulos, el termino miliar se deriva de la semejanza visual de las lesiones diseminadas y las semillas de mijo, histológicamente estas lesiones son granulomas de 1 a 2 mm (Jiménez, 2001; Chávez y Lizardi, 2002).

Las manifestaciones clínicas son variables. Las lesiones primarias involucran a los nódulos linfáticos del tracto respiratorio (Menzies y Neill, 2000). De las manifestaciones sistémicas la fiebre es la mas recurrente, también se produce caquexia, anorexia y debilidad, esto debido al aumento en la concentración plasmáticas de citocinas proinflamatorias, Las manifestaciones hematógenas mas comunes son la leucocitosis y la anemia, aunque la leucopenia también ha sido reportada (Jiménez, 2001; Chávez y Lizardi,

2002). También se pueden presentar casos de hepatomegalia, hallazgos pulmonares y esplenomegalia (Chávez y Lizardi, 2002). Todas estas manifestaciones clínicas son responsables de las repercusiones en la economía del animal, (pérdida en la ganancia de peso, baja en la producción de leche, disminución en la fertilidad, etc.)

#### **4.2.- ACTINOBACILOSIS. ( Lengua de Madera).**

Es una enfermedad infecciosa granulomatosa específica que en los bovinos se caracteriza por una severa inflamación de la lengua, afectando los ganglios linfáticos faríngeos y el surco o canal esofágico, lesiones cutáneas y rara vez estructuras óseas. *Actinobacillus lignieresii*, es la especie de *Actinobacillus* con mayor interés en patología veterinaria y es el agente etiológico de la enfermedad denominada “**lengua de madera**” que afecta a los bovinos principalmente.

##### **4.2.1.-Antecedentes .**

En 1902 Lignieres y Spitz describieron una enfermedad granulomatosa parecida a la actinomicosis en el ganado bovino de Argentina, designaron al germen como *Actinobacillus lignieresii* y a la enfermedad actinobacilosis (Rycroft y Garside., 1999). Nocard confirmó estos descubrimientos en 1902. Desde entonces el germen ha sido descrito por numerosos autores y en la actualidad la enfermedad se considera muy frecuente (Merchant y Pocker , 1980). Thomson confirmó la prevaencia de actinobacilos en el ganado bovino de los Estados Unidos de América. Revant y Pinoy fueron los primeros en descubrir la patogenicidad de *Actinobacillus* en humanos y otros autores reportaron a *A.*

*lignieresii* como agente causal de enfermedades en humanos e incluso pudiendo causar la muerte (Lentsch y Warner, 1980).

#### 4.2.2.- Características Generales.

*A. lignieresii* es una bacteria comensal de la cavidad oral, faringe y rumen de bovinos, ovinos y también puede ser aislado de caballos sanos (Rycroft y Garside, 1999; Christensen, y Col., 2002) es susceptible a la influencia ordinaria del medio ambiente, no sobrevive mas de 5 días en heno o paja y la temperatura a 60° C lo mata en 15 minutos, no resiste a los desinfectantes, luz solar y a la desecación, los cultivos de laboratorio deben sembrarse semanalmente de lo contrario se pierden (Merchant y Pocker , 1980).

La clasificación taxonómica de *A. lignieresii* indica que pertenecen al orden *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae*, del genero *Actinobacillus* y que este genero esta estrechamente relacionado con el genero *Pasteurella* y *Haemophilus*. (GenBank/NCBI. 2005). Por estudios de la hibridación del ADN, ahora se sugiere que algunos organismos no se encuentran tan estrechamente relacionados a otros miembros de este grupo por lo que probablemente serán transferidos del genero *Actinobacillus* en un futuro. *A. lignieresii*, *A. suis*, *A. equulii*, *A. seminis*, *A. pleuroneumoniae*, *A. capsulatus* y el taxon 5, 9, y 11 de Bisgaard son miembros que se consideran como causa importante de enfermedad en los animales y *A. rossii*, *A. muris*, *A. hominis*, *A. ureasa* son especies con un impacto menor en la medicina veterinaria, además *A. actinomycetemcomitans* es considerado como el único patógeno significativo para humanos de este género (Rycroft y Garside., 1999).

#### 4.2.2.1.-Morfología y Tinción.

*A. lignieresii* es extremadamente pleomórfico en circunstancias naturales. Su tamaño varia desde formas cocoides de 0.4  $\mu\text{m}$  de diámetro hasta largos filamentos de unos 15  $\mu\text{m}$ . Es inmóvil, no capsulado, no forma esporas, Una característica morfológica de interés es la tendencia a formar grumos en el tejido infectado (Merchant y Pocker, 1980). Estos grumos son similares a los “gránulos de azufre” de la actinomicosis, pero menores y en gran número, estas son colonias que semejan mazas dispuestas radialmente alrededor de un centro compuesto de residuos y bacilos Gramnegativos (Freeman, 1984). Cuando se fragmentan estos gránulos y se hacen preparaciones, se comprueba que *Actinobacillus lignieresii* es un germen bacilar uniformemente Gramnegativo, mientras que *Actinomyces bovis* aparece en filamentos ramificados Grampositivos (Merchant y Pocker, 1980).

#### 4.2.2.2.-Necesidades y Características de Cultivo.

Estos agentes son parásitos estrictos y se desarrollan poco o nada en medios que carezcan de suero o sangre completa (Freeman, 1984). Son anaerobios facultativos y crecen mejor en medios líquidos o cultivos profundos en agar glucosado con suero ligeramente alcalino (Merchant y Pocker, 1980) en especial si se incuban en una atmósfera de 10% de bióxido de carbono, los cultivos se desarrollan en 24 horas a 37° C, a 20° C el desarrollo es escaso (Freeman, 1984) y usualmente no viables de los 7 a los 10 días de el primer cultivo, almacenadas a 4° C algunas cepas pueden persistir por un tiempo considerable (Rycroft y Garside., 1999).

Las colonias de *A. lignieresii* de aislamientos frescos en agar sangre son pequeñas, (.5 a 2mm) abultadas o convexas, de color blanco grisáceo con una textura pegajosa o

cerosa. Las colonias no son hemolíticas en sangre de oveja en las primeras 24 horas, pero se puede presentar una  $\alpha$  hemólisis aparente a las 48 horas (Lentsch y Warner, 1980; Rycroft y Garside., 1999). En medios líquidos como caldo glucosado con suero, el desarrollo origina pequeños gránulos grisáceos adheridos a la pared del tubo, que se desprenden fácilmente al agitar; el caldo no se enturbia y puede tomar una consistencia de queso procesado (Freeman, 1984; Rycroft y Garside., 1999).

#### 4.2.2.3.-Propiedades Bioquímicas.

*A. lignieresii* fermenta maltosa, manitol, fructosa, xilosa, galactosa, sacarosa y arabinosa en 24 horas (Lentsch y Warner, 1980). Tras prolongada incubación forma ácido de la lactosa, rafinosa y glicerina (Merchant y Pocker , 1980), presenta oxidasa positiva (en algunas muestras son débilmente positivas) e hidrolisa la urea en tan solo unas horas (Lentsch y Warner, 1980). La mayor parte de las cepas no modifican la leche tornasolada pero algunas producen pequeñas cantidades de ácido sin coagulación (Merchant y Pocker , 1980). No convierte el triptofano a inodol pero puede reducir los nitratos a nitritos (Rycroft y Garside., 1999). Phillips ha descrito gérmenes actinobaciloides que se han aislado de la panza de los bovinos. Además de los azúcares señalado antes, estas cepas fermentan la dextrosa, levulosas, arabinosas, xilosas y dextrina, además produce  $H_2S$  y reduce el azul de metileno (Merchant y Pocker , 1980). El cultivo se realiza en el medio de McConkey las reacciones de rojo de metilo, Voges-Proskauer y agar TSA son negativas. *A. lignieresii* y *A. equuli* son bioquímicamente similares y las muestras bioquímicas son casi idénticas con la excepción de que *A. lignieresii* es incapaz de utilizar la trelosa, siendo esta la principal reacción diferencial entre estos dos microorganismos del mismo género (Lentsch y Warner, 1980).

#### 4.2.3.- Epidemiología.

La enfermedad se ha observado tanto en formas esporádicas como en epizootias (Freeman 1984). *A. lignieresii* es un microorganismo que no se ha estudiado a fondo y este solo se asociado a lesiones granulomatosas crónicas de la lengua en el ganado (lengua de madera) y lesiones de la piel, lengua y glándula mamaria en ovejas, también puede ser aislado de la nasofaringe y oído medio de ratas de laboratorio sanas (Lentsch y Warner, 1980; Peel y Col.1991).

Los actinobacilos son microorganismos patógenos oportunistas que producen enfermedad cuando la integridad de sus hospedadores se ve comprometida, por la inoculación directa del germen en el tejido de la submucosa debido a traumatismo producidos por alimentos toscos u objetos cortantes (Rycroft y Garside., 1999) que pueden originar brotes de la enfermedad en los rebaños que hacen pensar que se trata de una enfermedad transmisible (Biberstein 1994).

En Australia se reporto en 1999 un incremento en el número de casos de diagnóstico de *A. lignieresii*. En algunos casos solo fueron afectados animales individualmente y en otros la enfermedad se reporto en varios animales. Los casos incluyeron la formación de masas blandas bajo la mandíbula de 8 a 15 cm de diámetro en 35 novillos y 30 novillos con abscesos mandibulares y 18 meses después con signos clínicos de lengua de madera y 40 casos con grandes abscesos en la cara y en el área de la garganta y parótida. El número de casos fue asociado a las buenas condiciones climáticas del verano y se reveló que en los dos años con mayor número de reportes de abscesos faciales (1993 y 1999) tuvieron un invierno muy húmedo en los años previos (Sergent, 1999).

Se han señalado algunos cuantos casos de infecciones en humanos ( principalmente trabajadores rurales) producidas por mordeduras de animales de granja. Dibb y col.,



reportaron un caso donde un joven de 13 años de edad fue mordido en la cara por un caballo y *A. lignieresii* era la causa de la infección (Peel y Col., 1991). Además otros tres casos de infecciones en humanos mordidos por ovejas, donde dicha bacteria jugaba claramente un papel patogénico y tuvo crecimientos puros de cultivos de las heridas inflamadas (Peel y Col., 1991). La escasez de reportes de infecciones en humanos puede ser debido a la dificultad de la diferenciación de *Actinobacillus* con otros integrantes de la familia *Pasturellaceae* como lo son *Pasturella* y *Haemophilus*, ya que el genero *Pasturella* y *Actinobacillus* se encuentran estrechamente relacionados y solo son diferenciadas por la combinación distintiva de las reacciones bioquímicas que caracterizan a cada especie (Peel y Col. 1991).

#### **4.2.4.-Patogenia.**

El tipo de lesiones granulomatosas indican que *A. lignieresii* produce una respuesta inmune medida por células (Rycroft y Garside., 1999). Este tipo de respuesta es el resultado de una interacción entre un componente capsular microbiano y un componente polipéptidico catiónico de los leucocitos del hospedador (Woolcock 1984).

Tal interacción produce una sustancia matriz hialina en forma de maza que puede proteger a los microorganismos localizados en el interior de estas estructuras y permite una supervivencia microbiana más prolongada en los tejidos del hospedador (Woolcock, 1984). En el ganado, animales particularmente jóvenes son mas susceptibles a la inoculación subcutánea experimental y las lesiones (pequeños abscesos) empiezan a desarrollarse en pocos días comenzando con una leucocitosis seguida por la formación de reacciones granulomatosas con células epiteloides y algunas células gigantes en el centro (Rycroft y Garside., 1999). Las infecciones crónicas bacterianas y fúngicas presentan como

característica predominante, lesiones inmuno-patológicas de base celular (Woolcock 1984), que se manifiesta formando un complejo rodeado por neutrófilos y por un tejido de granulación que contiene macrófagos, células plasmáticas, linfocitos, células gigantes y fibroblasto, por confluencia se pueden formar granulomas de mayor tamaño (con un diámetro de 1 cm o más). La infección se propaga a los ganglios linfáticos, formándose granulomas en el trayecto de su propagación, la reacción del tejido proliferativo provoca que la lengua se salga fuera de la boca. Pueden estar afectados tanto tejidos próximos algunos que se encuentran a lo largo del tracto intestinal, junto con los ganglios subsidiarios (Biberstein 1994). Los anticuerpos de *A. lignieresii* son comunes en el suero del ganado y la aglutinación de los anticuerpos no se asocia con la protección o con la recuperación de la infección (Rycroft y Garside., 1999).

#### **4.2.5.-Lesiones.**

Produce signos y lesiones macroscópicas semejantes a las observadas por actinomicosis y solo difiere de ella por que los huesos rara vez son invadidos (Freeman 1984). El progreso de las lesiones granulomatosas es lento y crónico, en ocasiones contiene pus inodora y son localizados en los tejidos blandos de la cabeza y cuello de forma subcutánea, generalmente en la región parótida entre la mandíbula, en la mejilla, encías, lengua y la infección puede diseminarse a linfonódulos y a órganos internos tales como los pulmones (Rycroft y Garside., 1999). En los óvidos las lesiones se encuentran supurando alrededor de la cabeza y cuello además en la piel de la glándula mamaria, la lengua rara vez se encuentra involucrada (Biberstein 1994). En los bovinos es frecuente que los tumores subcutáneos terminen rompiéndose y formen abscesos, las lesiones subcutáneas responden a la cirugía, pero las infecciones de la lengua a menudo resultan mortales (Freeman 1984).

El curso de la enfermedad es largo, la curación lenta, la dificultad para comer debido a las lesiones origina perdida de peso y deshidratación como sucede con las enfermedades crónicas (Biberstein 1994).

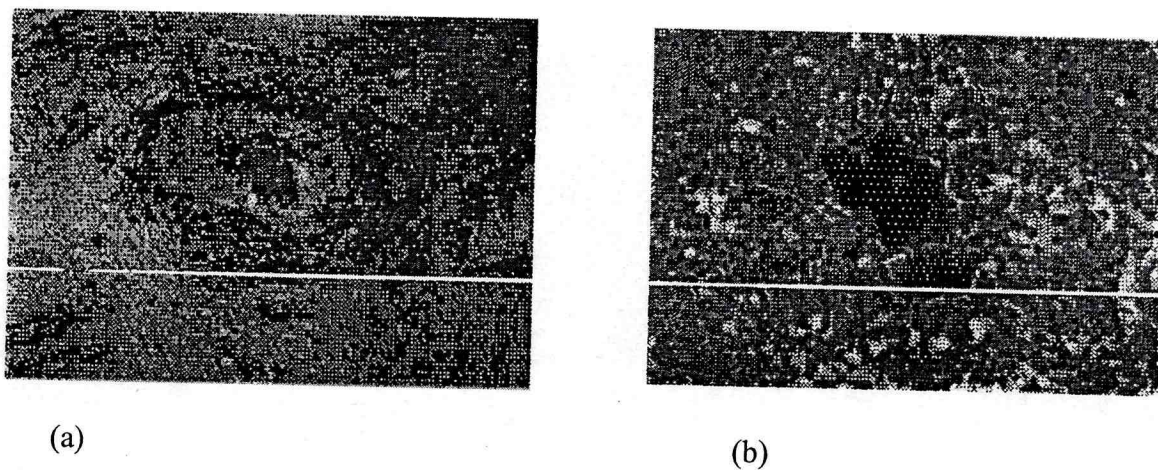


Figura 4.6.-Apariencia microscópica de lesiones típicas de actinobasilosis (lengua de madera) en el ganado bovino debido a *A. lignieresii*. (a) colonia bacteriana envuelta por un reactivo de células (100x); (b) lesión expuesta donde se muestra la colonia (400x) (Rycroft y Garside., 1999).

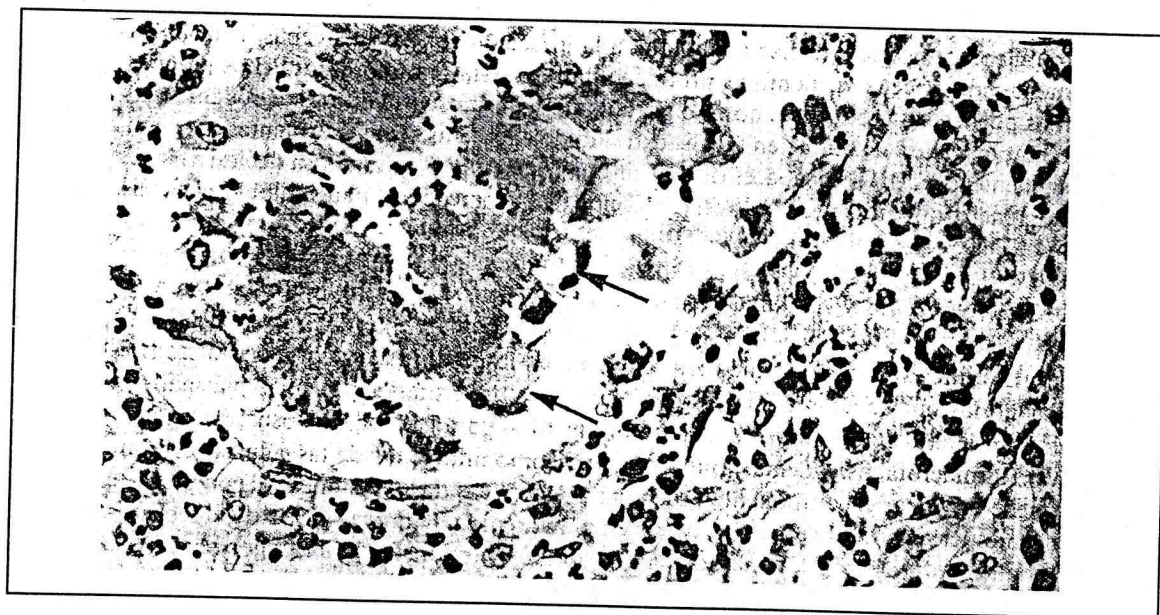


Figura 4.7.- Colonia de *A. lignieresii* en un ganglio linfático bovino. El granulo de azufre se compone de la colonia bacteriana rodeada por mazas delgadas y largas, la respuesta celular consta inicialmente de neutrófilos que quedan encerrados en el tejido de granulación constituido por macrófagos y células gigantes (Woolcock, 1984).

#### 4.3.- DIAGNÓSTICO.

En la actualidad muchos métodos de diagnóstico se encuentran disponibles para la detección de TB en animales infectados (Hamid, y Col. 2002). *A. lignieresii* es un organismo que aun no esta bien caracterizado, su rango de hospederos no se conoce completamente, hay reportes en los que se indica que se ha diagnosticado *A. lignieresii* erróneamente como *Pasturella spp* (Lentsch y Wagner, 1980).

##### 4.3.1.- Métodos tradicionales de diagnóstico de *A. lignieresii*.

Se puede descubrir el actinobacilo en los exudados de las lesiones, debe tenerse en cuenta que los gránulos de azufre no tienen valor diagnóstico para actinobacilos. Para diferenciar el actinobacilo de *Actinomyces bovis*, es necesario el fragmentar los gránulos de azufre y teñirlas por el método de Gram (Merchant y Pocker , 1980; Biberstein, 1994).

El cultivo es un método muy utilizado para el diagnóstico, estos microorganismos crecen mejor en agar-sangre en atmósfera de elevada concentración de CO<sub>2</sub>. La diferenciación de las especies se lleva acabo mediante cultivo y posteriormente pruebas bioquímicas (Biberstein, 1994). Algunos investigadores han aplicado al diagnóstico la reacción de aglutinación con buenos resultados (Merchant y Pocker , 1980).

La identificación de *Actinobacillus* por métodos tradicionales no ha tenido el éxito deseado en su especificidad, ya que se ha tenido dificultad de diferenciación de *A. lignieresii* con otros integrantes del mismo genero como lo es *A. equuli*. Ambos son bioquímicamente similares y las muestras bioquímicas de sus aislamientos casi son iguales con la única diferencia de que *A. equuli* fermenta trelosa y lactosa en 24 horas y *A. lignieresii* no. Otra dificultad en el diagnóstico es la estrecha relación entre otros miembros

de la familia *Pasturellaceae* como lo son *Pasturella* y *Haemophilus*, ya que el género *Pasturella* y *Actinobacillus* solo son diferenciadas por la combinación distintiva de las reacciones bioquímicas que caracterizan a cada especie (Peel y Col. 1991).

#### 4.3.2.- Métodos de diagnóstico para TBb.

En México como en gran parte del mundo, los programas gubernamentales para controlar y erradicar la TBb utiliza un esquema de aplicación intradérmica de la tuberculina o derivado proteínico purificado (PPD) y el sacrificio de los animales reactivos. Sin embargo, su sensibilidad es insuficiente, así como su especificidad, Se estima que hasta un 19% de ganado tuberculoso no reacciona a la tuberculina, esto en animales sin hipersensibilidad tardía hacia *M bovis*, denominados anérgicos, ya sea con una infección diseminada o una infección reciente, debido a que estos casos de inmunidad se encuentran deprimidos o en proceso de desarrollo. El problema que se tiene es la baja especificidad y los falsos positivos causados por reacción cruzada del antígeno con *M. avium*, *M. paratuberculosis* y micobacterias atípicas (Estrada-Chávez y Col., 2001; Díaz y Col., 2003).

La histopatología es un método que se utiliza conjuntamente con la inspección *post mortem*, donde se buscan lesiones sugestivas a TBb. Las lesiones tuberculosas encontradas en la inspección *post mortem* se presentan principalmente en nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio (Estrada-Chávez y Col., 2004). La detección convencional de las micobacterias en muestras clínicas esta basada en la demostración del bacilo alcohol-ácido resistente, la baciloscopia realizada con la tinción de Ziehl Neelsen presenta una sensibilidad máxima de 80% al tener como limitante concentraciones del bacilo mayores a  $10^4$ /ml de muestra. La especificidad es baja al no permitir distinguir entre micobacterias del

complejo *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas (Laniado-Laborín y Col., 2001; Zenteno, 2003).

El ensayo inmunoenzimático (ELISA) ha sido utilizado para detectar anticuerpos específicos en el suero contra los antígenos de *M. bovis* de esta manera identificar una infección. Para el ELISA se han utilizado diferentes antígenos, tales como el PPD, el filtrado de cultivo, así como antígenos purificados, ya sean nativos o recombinantes (Estrada-Chávez y Col., 2001; Zenteno, 2003). Posee la ventaja de evaluar el nivel de respuesta inmune ante la infección bacteriana, es decir, discernir cuando se presentan bacterias vivas y muertas en el huésped, es fácil estandarizar y necesita menos reactivos y equipamiento que otros sistemas, además este sistema genera resultados en cuestión de horas (Zenteno, 2003). La principal ventaja de ELISA es que identifica animales infectados no reactivos a la tuberculina ni a IFN- $\gamma$ , sin embargo debido a su baja sensibilidad ( $60 \pm 10$ ) no identifica a todos los animales infectados, por lo cual no se recomienda su empleo como prueba única para el diagnóstico de la TBb (Díaz y Col., 2003). Otra desventaja presentada por ELISA son las variaciones dependientes del antígeno empleado, los falsos positivos por mal manejo de los reactivos o contaminación de las muestras (Zenteno, 2003).

El ensayo del gamma Interferón (IFN- $\gamma$ ) es un método bien establecido para el diagnóstico de la TBb y se ha visto que si se emplea conjuntamente con la prueba de tuberculina se incrementa la sensibilidad hasta 95.2% (Liébana y Col., 1995; Díaz y Col., 2003). Este método mide la cantidad del IFN- $\gamma$  producido por célula sanguíneas totales o células mononucleares de sangre periférica previamente estimulados PPD o antígenos más específicos (Zenteno, 2003). La prueba de IFN- $\gamma$  ha demostrado identificar animales infectados naturalmente ya que presenta una prueba intradérmica negativa. Esta

herramienta de diagnóstico presenta mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de la tuberculina y correlaciona mejor con la histopatología. Sin embargo tiene como desventajas al igual que la prueba de la tuberculina el no detectar animales anérgicos (Díaz y Col., 2003), también presenta problemas en la limitante de tiempo con respecto a las muestras, ya que la sangre necesita ser incubada con tuberculina dentro de las primero 8 horas de la recolección, la reactivación cruzada por antígeno y el costo, son otras desventajas de esta prueba (Liébana y Col., 1995).

El cultivo es considerado como el “estándar de oro” y la prueba definitiva para la confirmación de la TBb (Liébana y Col., 1995). El cultivo tradicional en el medio de Lowenstein-Jensen es lento, demora ocho semanas para el desarrollo inicial del microorganismo, requiere un procedimiento intensivo y laborioso (Fagundo y Col., 2004). Además, puede llegar a ser positivo varias semanas después de la inoculación, especialmente por muestras que tienen bajo numero de micobacterias (Coetsier y Col., 2000). Sin embargo, los métodos actuales para el cultivo de micobacterias muestran mayor sensibilidad para su recuperación en menor tiempo, utilizando equipos automatizados como por ejemplo el sistema ESP Culture System II, donde se realiza el seguimiento del crecimiento bacteriano mediante el consumo de O<sub>2</sub> y producción de CO<sub>2</sub> trazando una curva de crecimiento, sin embargo para que se detecte la muestra como positiva deben existir aproximadamente 10<sup>6</sup> UFC/ml de micobacterias. El tiempo promedio para detectar resultados positivos es de 21 días lo cual representa una ventaja con respecto a los métodos tradicionales (Fagundo y Col., 2004). Aun así, con los nuevos métodos se tiene como principal desventaja que la sensibilidad del cultivo no es del 100% y los resultados de falsos positivos pueden ocurrir debido a crecimientos de micobacterias no tuberculosas (Liébana y Col., 1995).

Los métodos radimétricos son utilizados conjuntamente con el cultivo, en el se emplean como única fuente de carbono Palmítico-C<sup>14</sup>, estos sistemas funcionan detectando los desechos metabólicos gaseosos radioactivos que se generan de 10 a 15 días de cultivo, lo cual indica el crecimiento de bacterias. Sin embargo, el empleo de este sistema se ha visto limitado en parte con la dificultad asociada con la disposición final de los radioisótopos generados (Zenteno, 2003). Se han generado nuevas sistemas no-radiométricos que demuestran diferentes niveles de eficiencia, funcionan midiendo cambios en la presión de gas, consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono, ya sea fluométrico o colorimétrico. En términos generales este sistema permite detectar micobacterias en baciloscopia positiva en 14 días y el resto de las muestras en 21 días. La desventaja de este sistema, es que todavía toma muchos días y es oportuno resaltar la importancia de la capacitación del personal, ya que los porcentajes de contaminación y diagnóstico de falsos positivos son más altos cuando el personal no posee experiencia o carece de un entrenamiento adecuado (Zenteno, 2003).

Otras técnicas de diagnóstico en el cultivo celular son, la detección de ácido micólico en muestras sanguíneas o de orina por cromatografía de líquidos o de alta presión, identificación de ácidos tuberculoesteáricos u otro tipo de cromatografía de gases y el incremento de la actividad de la adenosindesaminasa (ADA) como una respuesta a antígenos específicos a *Mycobacterium* (Zenteno, 2003). Si bien, estas técnicas poseen especificidad y sensibilidades altas en muestras baciloscópicas positivas y negativas, tienen la desventaja de que requieren un equipo sofisticado, caro y una ultra capacitación, lo que limita su aplicación en zonas de bajos recursos económicos (Zenteno, 2003).



La amplificación de ácidos nucleicos, es una técnica de biología molecular que tiene como primer objetivo resolver las limitaciones del diagnóstico bacteriológico por métodos tradicionales (Barrera, 2000). La PCR es una poderosa herramienta en la identificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en muestras de tejido incluidos en parafina y puede ser utilizado exitosamente para el estudio epidemiológico y evolución de patógenos tuberculosos (Zink y Nerlich, 2004). Esta técnica utiliza oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de DNA en el genoma de las bacterias (Estrada-Chávez y Col., 2004) y es capaz de demostrar la presencia de fragmentos de DNA micobacterianos en muestras biológicas con sospecha a TB negativas a la tinción con Ziehl-Neelsen o al cultivo, obteniendo resultados en 24 a 48 horas (Loera-Castañeda y Col., 2003).

#### **4.4.-PCR. (Reacción en cadena de la polimerasa)**

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés), es considerado como un gran salto tecnológico, el cuál ocurrió en 1983, cuando Kary y Mullis desarrollo una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de DNA sin tener que clonarlo (Rodríguez y Barrera, 2004). Esta técnica es considerada como la mas revolucionaria en el ultimo cuarto del siglo XX. Con esta se consigue copiar millones de veces en un par de horas una secuencia predeterminada dentro de una mezcla de DNA tan compleja como el propio genoma humano, donde la secuencia de interés solo representa una diezmillonésima parte (Rodríguez y Barrera, 2004). Desde su descubrimiento varios autores han empleado la PCR para la detección de *M. tuberculosis* (Rodríguez y Col., 2000).

#### 4.4.1.-Extracción de DNA.

La extracción del DNA se realiza al producir una ruptura celular, esta ruptura puede realizarse por métodos térmicos (por calentamiento en baño de agua a 100°C por 10 minutos en una solución tampón Tris EDTA, pH 8), por métodos enzimáticos (adición de proteinasa K), mecánicos o mixtos. Los métodos de descontaminación de las muestras mas comúnmente utilizados está el protocolo estándar del NaOH –N-acetilcisteína y el protocolo de Lauril sulfato de sodio (Rodríguez y Col., 2000).

#### 4.4.2.-Reactivos.

Para la reacción de PCR se mezcla en un tubo el DNA a amplificar, los dexosirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP y dTTP.) los dos iniciadores, la DNA polimerasa y la solución amortiguadora, la cual consiste en KCL, Tris-HCL (pH= 8.3 a 9.0) gelatina y MgCL<sub>2</sub> (Martínez-Murcia y Col., 1998; Espinosa de los Monteros y Col., 1999). Algunos autores recomiendan el uso de coadyuvantes para aumentar la especificidad y fidelidad de la reacción, tales como el dimetilsulfóxido (DMSO) para disminuir la estructura secundaria del DNA, el tween 20 o el Tritón x-100 que ayudan a estabilizar la enzima. Además el polietilglicol (PEG), el glicerol, la formamida o la seroalbumina bovina, entre otros, aunque en ningún caso estos últimos son imprescindibles (Rodríguez y Barrera, 2004).

#### 4.4.3.- Mecanismo.

La PCR es un método *in vitro* de síntesis de DNA con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de “cebadores” o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de

repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima de DNA polimerasa termoestable (DNA polimerasa *Taq* proveniente de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus* la cual funciona bien a altas temperaturas como 72°C e incluso es estable a 94°C). El diseño de los termocicladores condujo a la automatización total del proceso al permitir calentarse y enfriarse rápidamente en determinados tiempos en una forma programada (figura 4.8). Así se obtiene en cuestión de horas millones de copias de la secuencia deseada de DNA (Rodríguez y Barrera, 2004).

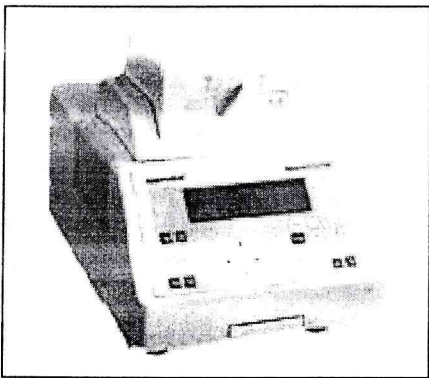


Figura 4.8.- Termociclador (Mastercycler gradient thermal cycler) a estos aparatos se les atribuye junto con las DNA polimerasas termoestables el permitir automatizar por completo la PCR. (Rodríguez y Barrera, 2004).

#### 4.4.4.- Condiciones generales.

Los iniciadores generalmente están compuestos de 15 a 30 pb de largo y contienen 50% de G+C. La DNA polimerasa varía sus requerimientos de sales y pH, la actividad enzimática varía dependiendo de la solución de reacción y la cantidad de  $Mg^{+2}$  es crítica para la amplificación del blanco específico. Una alta concentración de dNTPs disminuye la eficiencia y especificidad de la amplificación. De igual modo un exceso en la concentración de iniciadores conduce a la formación de productos no específicos o dímeros de iniciadores,

debido a que en la desnaturalización del templado liga moléculas de los iniciadores en lugar de unir las hebras del DNA (EpiBio, 2005).

Las condiciones de amplificación constan por lo regular de veinticinco o treinta ciclos repetitivos y cada uno de tres pasos: Desnaturalización a 94°C por un minuto, el primer paso consiste en la ruptura del puente de hidrógeno del DNA para desnaturalizarlo, este paso expone las bases nitrogenadas del DNA blanco; El segundo paso es la alineación, en la que ocurre la hibridación las cadenas desnaturalizadas del DNA blanco con los iniciadores de la replicación (DNA sintético de hebra sencilla) a un temperatura de 60°C por un minuto y el tercer paso es el alineamiento a 72°C por 2 minutos, la polimerasa extiende la longitud los iniciadores añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden en que va dictado la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde (Nørskov-Lauritsen y Col., 2004; Rodríguez y Barrera, 2004).

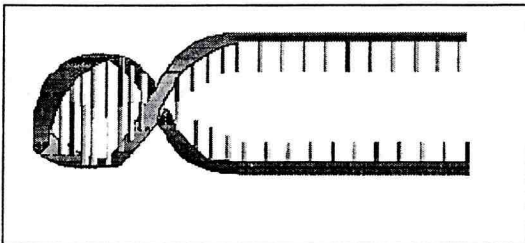


Figura 4.9.-Desnaturalización del DNA. Los puentes se rompen dejando el DNA en forma de cadena sencilla, permitiendo exponer las bases nitrogenadas para la hibridación con los oligonucleotidos iniciadores (Rodríguez y Barrera, 2004).

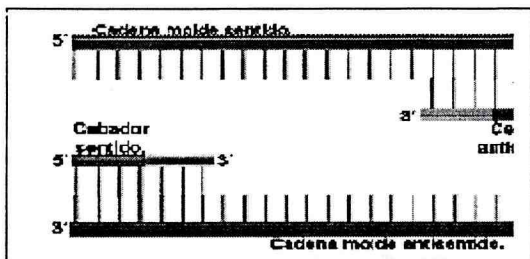


Figura 4.10.- Inicio de la reacción de PCR. Los iniciadores complementarios que flanquean el sitio a amplificar se enlazan formando puentes de hidrógeno. De este modo la polimerasa puede comenzar a extenderlos para copiar ambas hebras molde (Rodríguez y Barrera, 2004).

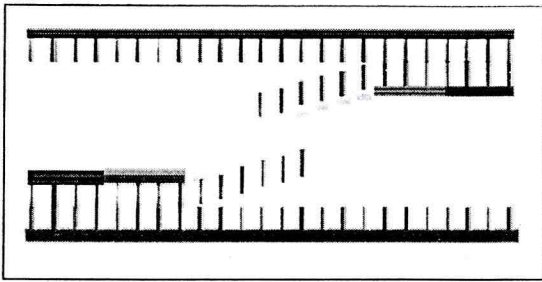


Figura 4.11.- Progreso de la PCR. A la temperatura optima de la ADN polimerasa Taq (72°C), la enzima agrega los dNTPs apartir de 5' hacia el extremo 3' (Rodríguez y Barrera, 2004).

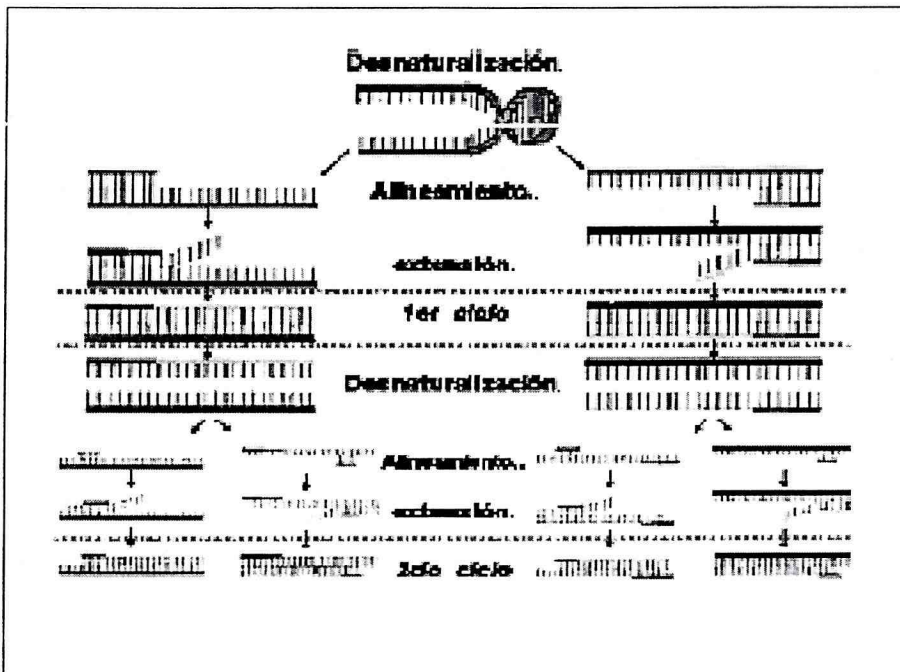


Figura 4. 12. Ciclos de la PCR. La PCR se integra por ciclos de tres diferentes periodos de incubación y temperaturas. (Rodríguez y Barrera, 2004).

#### 4.4.5.- Naturaleza exponencial de los ciclos.

Al final del primer ciclo se han generado dos nuevas hebras de ADN, al repetir por segunda ocasión el ciclo de tres pasos, las dos moléculas del primer paso se copian para producir ahora cuatro moléculas. El tercer ciclo genera ocho moléculas. En teoría, 20 ciclos producirían aproximadamente un millón de copias de la molécula molde de DNA y 30 ciclos generaran mil millones de copias de ésta (Rodríguez y Barrera, 2004). Pero en la practica este proceso no es tan eficiente, el número de ciclos que se utilizan adquieren gran relevancia a la hora de optimizar la PCR. Este número depende de la cantidad de DNA que existe en la muestra (Rodríguez y Barrera, 2004).

Después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de comportarse de manera exponencial y se vuelve aritmética y finalmente llega a una fase estacionaria, este fenómeno en la enzima se le llama efecto meseta, aunque cuando este efecto se presenta la cantidad de DNA sintetizado es suficiente para su posterior utilización (Rodríguez y Barrera, 2004).

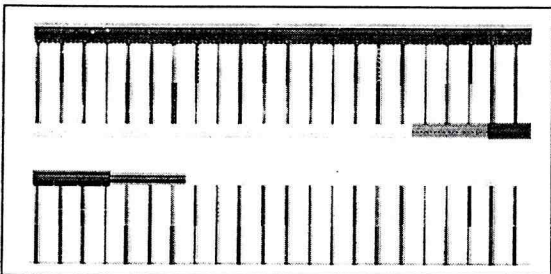


Figura 4.13.- Naturaleza Exponencial de los ciclos Teóricamente entre mas ciclos de reacción integren el programa de amplificación más productos idénticos se generan. Pero al aumentar los ciclos también se aumenta proporcionalmente la posibilidad de agregar errores en las nuevas secuencias (Rodríguez y Barrera, 2004).

#### **4.4.6.-Visualización de los productos de la PCR.**

Los productos pueden ser visualizados por hibridación del producto amplificado con una sonda específica de ácido nucleico y detección calorimétrica, por electroforesis en gel de poliacrilamida y electroforesis en gel de agarosa teñida con bromuro de etidio, entre otros (Rodríguez y Col., 2000).

#### **4.4.7.- Límites de la PCR**

Se han reconocido dos grandes obstáculos al éxito de la técnica: La dificultad relacionada con la ruptura de la pared celular microbacteriana, la extracción del DNA y la presencia de inhibidores de la PCR. Otros factores que pueden influir en la sensibilidad y especificidad de la técnica son la variabilidad biológica y la amplificación inespecífica. La sensibilidad de la PCR en muestras pulmonares se ha reportado entre 74 y 100%. Una variante de la PCR es la PCR “nested” o “anidada” que consiste en dos reacciones de PCR con el fin de hacer más específica la amplificación y aumentar el rendimiento (Loera-Castañeda y Col., 2003).

#### **4.5.- CARACTERÍSTICAS MOLECULARES.**

La habilidad para la clasificación bacteriana dentro de las especies correctas y la distinción de diferentes cepas es de vital importancia en la microbiología clínica y en el estudio de la epidemiología. Los métodos clásicos de identificación usados son los rasgos fenotípicos tales como la morfología y el metabolismo, junto con las características fisiológicas. No todas las cepas de una especie pueden ser positivas para características

comunes y algunas cepas pueden exhibir variaciones bioquímicas (Hedegaard y Col., 1999).

Por otra parte, pequeñas alteraciones en la realización de una prueba puede variar y dar falsos resultados. Consecuentemente las técnicas basadas en las pruebas fenotípicas pueden dar una identificación ambigua de ciertas especies. Las técnicas basadas en los ácidos nucleicos tales como la hibridación DNA-DNA, el análisis RFLP, diferentes técnicas basadas en la PCR y la secuenciación, han sido desarrollada para mejorar la identificación bacteriana (Hedegaard y Col., 1999).

#### 4.5.1.-Características molecular de *A. lignieresii*

##### 4.5.1.1.-Gene 16S ARNr

Las pequeñas unidades de rARNs (16S ARNr en procariotas) son las moléculas más comúnmente utilizadas para el rastreo evolutivo y para la eficiente identificación del género y especie. El tamaño de la 16S ARNr (al rededor de 1550 pb ) la hacen más consistente y menos errática que las pequeñas moléculas. El problema al utilizar el 16S ARNr, es el que el operon multigénico del ARNr se encuentra en varias copias. Por lo tanto la secuenciación del 16S ARNr es inútil para una rápida y confiable identificación entre especies estrechamente relacionadas (Hedegaard y Col., 1999; Murcia y Col., 1999 ).

##### 4.5.1.2.-Factor 2 de Iniciación.

La traducción del factor dos de iniciación (IF2), es una proteína esencial involucrada en el inicio de la síntesis de proteínas en procariotas (Nørskov-Lauritsen y Col., 2004). Solo se localizó una única copia dentro del gene localizada en 685' o en el



genoma de *E. coli* como una parte de un operón *nus-A infB* polisistriónico (Hedegaard y Col., 1999), Una comparación de las secuencias disponibles de la *infB* de la literatura y de los trabajos previos, indican que la parte que codifica los dominios de la unión GTP de la IF2 son los segmentos mas conservados y que contienen suficiente variación para ser utilizados como un marcador filogenético. (Hedegaard y Col., 1999).

#### 4.5.1.3 gene *GyrB*.

Debido a que tanto el gene 16S rRNA como el IF2 no son lo suficientemente específicos para ser utilizados en la detección de DNA de *A. lignieresii*, por presentar similitud con otros miembros del género *Actinobacillus*, se eligió el gene *GyrB*.

Este gen es utilizado para realizar trabajos con el fin de determinar las relaciones filogenéticas en *Pasteurellaceae*, aunque aun no hay artículos publicados sobre este gen. Se realizó una búsqueda BLAST, en la cual los resultados obtenidos presentaron un 80 % de similitud con otros organismos no presentes de forma natural en los animales (*Haemophilus ducrety*, arroz, etc). Se diseñando unos iniciadores específicos para *A. lignieresii* con el programa Primer3. Se volvió a realizar una búsqueda BLAST para determinar su especificidad hacia otros organismos.

#### 4.5.2.-Características molecular de *M. bovis*. (complejo *M. tuberculosis*)

Los métodos moleculares basados en el gene 16S rRNA son comúnmente usados en la identificación molecular. Dentro del genero *Mycobacterium*, la similitud presente entre especies para la secuencia del gene 16S rRNA es relativamente alta de hasta un 100% entre *M. kansasii* y *M. gastris* (Blackwood y Col., 2000). Existen elementos repetitivos de DNA que han sido utilizados para el tipado molecular. El análisis de fragmentos de restricción o

enzimas de restricción han sido aplicados ampliamente en la epidemiología molecular (Skuce y Col., 2002). Varios locis polimorficos y multicopias de elementos de inserción que se han descubierto en el genoma micobacteriano tales como la secuencia repetida rica en G-C (Polymorphic G+C rich séquense, PGRS), otro son la secuencias repetidas directa (Direct repeats, DR), que son secuencias de DNA que se repiten varias veces y se distribuyen el genoma por transposición (O'Brien y Col., 2000).

#### 4.5.2.1.-Secuencia de inserción IS6110.

*M. tuberculosis* contiene una secuencia de inserción en el cromosoma IS6110 el cual pertenece a la familia móvil IS3 (Vera-Cabrera y Col., 2001) del elemento de secuencia de inserción (IS) (Park y Col., 2000). Esta inserción esta presente en otras especies del complejo *M. tuberculosis* pero ausente en micobacterias que no están tan estrechamente relacionadas. Los elementos IS, son elementos genéticos transpuestos presentes en múltiples copias en un genoma y son capaces de moverse a una nueva localización (Fang y Col., 2001). Los IS tienen un amplio rango de aplicaciones en el estudio de la evolución del genoma bacterial, genética bacterial y la resistencia a antibióticos. Estos elementos exhiben gran variabilidad en la especificidad de la selección del sitio de inserción en el genoma, en algunos sitios hay afinidad y en otros es totalmente al azar (Fang y Col., 2001). La IS6110 se encuentra presente por arriba de 20 copias en *M tuberculosis*. En *M bovis* la IS6110 se encuentra generalmente de una a cinco copias (O'Brien y Col., 2000). La mayoría de los laboratorios que desarrollan sistemas de detección de TB por amplificación de ácidos nucleicos, amplifican la secuencia de inserción IS6110, debido a que existen múltiples copias y es fácil de estandarizar (Zenteno, 2003).

#### **4.6.-CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA TB.**

La norma oficial mexicana "NOM-031-ZOO-1995" se refiere a la Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina. Fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 8 de marzo de 1996 y Modificada el 27 de agosto de 1998. Tiene como objetivo el controlar y erradicar la TBb del territorio nacional (DOF, 1993).

La estrategia en zonas de baja prevalencia (ganado de carne) son: el diagnóstico y sacrificio de animales positivos, la cuarentena de los hatos infectados, la vigilancia epidemiológica en rastros y mataderos y la constatación de hatos libres. En zonas de mediana y alta prevalencia (ganado lechero y doble propósito) son: el diagnóstico, sacrificio o segregación de reactores, cuarentena de predios positivos, vigilancia en rastros, aplicación de medidas de bioseguridad y el manejo de hatos infectados (DOF, 1993).

En el ganado bovino no se practica la vacunación, los animales reactores de un hato serán sacrificados en un rastro autorizado por la Secretaría, en un periodo no mayor de 10 días naturales posteriores a la notificación del resultado. La prevención y control de la tuberculosis también se podrá enfocar a reservorios y en la identificación de las fuentes de infección (DOF, 1993).

La prevención humana por vacunación podría ser la única manera que lograría el control global de la tuberculosis. La vacuna viva atenuada BCG comenzó a ser utilizada en humanos a partir de 1992. La BCG ha demostrado una variabilidad que va de 0 a un 80%. Pero se acepta que la vacuna puede prevenir la reinfección endógena, de este modo, puede romperse la cadena de transmisión, además de que los niños presentan frecuencias menores de formas meníngeas y miliares (Carrada, 2002).

## **V.- MATERIALES Y METODOS**

La primera etapa del trabajo se realizó en el Centro de Análisis e Investigaciones Pecuarias de la Laguna (CAIPEL). Gómez Palacio, Durango; la cual consistió en la toma y procesamiento de muestras. La segunda etapa se realizó en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en Monterrey Nuevo León, donde se realizó la extracción del DNA y los ensayos de PCR.

### **5.1.- Toma de muestras.**

Las muestras procedieron de los rastros ubicados en los estados de Coahuila, Durango, Nayarit, Sinaloa y Zacatecas. Las muestras fueron tomadas de los tejidos que son normalmente enviados a CAIPEL para el diagnóstico de rutina de TB, dicho diagnóstico se lleva a cabo por medio de las tinciones de Hematoxilina y Eosina (HyE), Zhiel-Neelsen (ZN) para detección de bacilos ácido-resistentes y por cultivo en medio Lowenstein-Jensen.

Los tipos de tejidos seleccionados para este estudio fueron; nódulos linfáticos (parotídeos, retrofaríngeos, mandibulares, traquiobronquiales y mediastínicos), muestras de tejido de pulmones, hígado y glándulas adrenales. El tejido de donde se tomó la lesión sospechosa a tuberculosis se dividió por la mitad, una mitad se sumergió en una solución de borato de sodio al 6 % para estudios de bacteriología y la otra mitad en una solución de formalina al 10% para estudios de histopatología utilizando los paquetes elaboradas para este fin por la CANETB (Campaña Nacional para la Erradicación de Brucelosis y Tuberculosis). Los tejidos fijados en formalina se procesaron y se incluyeron en parafina.

Las 60 muestras de tejidos incluidos en parafina tomadas para el presente trabajo fueron analizadas en CAIPEL donde se les realizó el diagnóstico de rutina para TBb. Los resultados obtenidos fueron de acuerdo a los parámetros mencionados anteriormente (HyE y ZN). Para el presente estudio las muestras de tejido incluidos en parafina se dividieron en dos grupos. El primer grupo (Grupo-A) constó de 30 muestras obtenidas en el periodo de Enero-Noviembre del 2003 el cual constó de 10 muestras negativas a TBb (tejido sin cambios patológicos aparentes), 10 muestras sospechosas a TBb (tejido con lesiones granulomatosas pero sin la observación de bacilos alcohol-ácido resistente) y 10 muestras positivas a TBb (tejido con lesiones granulomatosas típicas a TBb). El segundo grupo (Grupo-B) se integró de 30 muestras obtenidas en el periodo de Enero-Abril del 2005; 10 muestras positivas a TBb (tejido con lesiones granulomatosas típicas a TBb), 10 muestras sospechosas a TBb (tejido con lesiones granulomatosas pero sin la observación de bacilos ácido alcohol resistente) y 10 muestras sospechosas a actinobacilosis (tejido con lesiones piogranulomatosas).

## **5.2.- Preparación y acondicionamiento de la muestra para histopatología.**

Los tejidos seleccionados fueron fijados en formalina al 10%, posteriormente se lavaron en agua corriente, se cortaron a 0.5 cm de grosor y se incluyeron en cápsulas para su procesamiento en histoquímica donde se sumergían en alcohol a diferentes concentraciones con una duración de 24 horas para lograr la desecación. Una vez que las muestras de tejido fueron incluidas en los bloques de parafina, se realizaron cortes de 4  $\mu$ m de espesor en un microtomo, con portacuchillas y cuchillas desechables. Para evitar contaminación cruzada de las muestras, las cuchillas se cambiaron para cada muestra. Las

muestras fueron recogidas con portaobjetos impregnados de albúmina glicerina de Mayer, para teñirlas con las tinciones de HyE y ZN.

### **5.3.- Extracción de DNA a partir de tejidos incluidos en parafina.**

#### **5.3.1.- Desparafinación de los tejidos.**

Se cortaron 6 secciones de los tejidos incluidos en parafina de 5µm cada uno, y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml. Para remover la parafina se agregó a los tubos 1ml de xilol y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 12000 xg. (Centrífuga, Hermble Z160M, Labortechnik, Germany). El sobre-nadante fue removido cuidadosamente con una pipeta. La extracción de la parafina con xilol se repitió en dos ocasiones. Para eliminar completamente el xilol se agregó a los tubos 1ml de etanol al 100 % enfriado a -20°C y se dejó incubar a -20 °C por una hora con lo que también se precipitó el DNA presente y se aseguró el no perderlo en el proceso. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 12000 xg. (Centrífuga, Hermble Z160M, Labortechnik, Germany). Finalmente las muestras se secaron al aire por 10 minutos.

#### **5.3.2.- Extracción del DNA.**

Las muestras desparafinadas y secas, se resuspendieron en 100µl de solución de digestión (Tris-HCL 50 mM pH 8.3, EDTA 0.5 mM, Tween 20 1% y 30 µg/ml de proteinasa K). Se incubaron a 37° C por 24 horas en condiciones de oscilación hasta que el tejido se desintegró. En seguida las muestras se incubaron a 95°C/10 min. para

desnaturalizar la proteinasa K. Posteriormente se agregó 1 ml de etanol al 100% enfriado previamente a -20°C y se dejó incubar a -20 °C por una hora, esto para precipitar el DNA, luego las muestras se centrifugaron por 1 minutos a 13000 xg. (Centrífuga, Hermble Z160M, Labortechnik, Germany). Se elimino el sobre-nadante y la pastilla se dejó secar al aire por 10 minutos. Finalmente la pastilla se resuspendió en 40 µl de agua destilada.

#### 5.4.- Selección y diseño de Iniciadores.

##### 5.4.1.- Iniciadores para amplificar un fragmento de la secuencia IS6110 de *M bovis*.

El elemento de inserción IS6110 corresponde a la familia del elemento móvil IS3 (Vera-Cabrera y Col, 2001) y es uno de los numerosos elementos genéticos móviles presentes en el género *Mycobacterium*.

El IS6110 fue seleccionado para este trabajo debido a que esta presente en micobacterias del complejo *M tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*) pero ausente en micobacterias atípicas (Zenteno, 2003). Además este elemento mantiene la estabilidad necesaria para ser utilizado como herramienta en el diagnóstico de *M. bovis* mediante PCR en cortes de tejido incluidos en parafina (Cortinas y Col., 2002) y el IS6110 es utilizado por los laboratorios que desarrollan sistemas de detección de TB por amplificación de ácidos nucleicos, debido a que existen múltiples copias y es fácil de estandarizar (Zenteno, 2003). Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

IS41: 5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG 3'

IS43: 5' TCAGCCGCGTCCACGCCGCCA 3'

Estos Iniciadores amplifican una región entre los nucleótidos 568 y 883 de la secuencia dando un amplicon de 315 pb y están basados en la secuencia reportada previamente por Thierry y Col., 1993 (Cuadro 5.1)

1	CGATGAACCG	CCCCGGCATG	TCCGGAGACT	CCAGTTCTTG	GAAAGGATGG	GGTCATGTCA
61	GGTGGTTCAT	CGAGGAGGTA	CCC GCCGAG	CTGCGTGAGC	GGGCGGTGCG	GATGGTCGCA
121	GAGATCCGCG	GTCAGCACGA	TTCGGAGTGG	GCAGCGATCA	GTGAGGTGCG	CCGTCTACTT
181	GGTGTGGCT	GCGCGGAGAC	GGTGCCTAAG	TGGGTGCGCC	AGGCGCAGGT	CGATGCCGGC
241	GCACGGCCCC	GGACCACGAC	CGAAGAATCC	GCTGAGCTGA	AGCGCTTAGC	GGCGGGACAA
301	CGCCGAATTG	CGAAGGGCGA	ACGCGATTTT	AAAGACCGCG	TCGGCTTTCT	TCGCGGCCGA
361	GCTCGACCGG	CCAGCACGCT	AATTAACGGT	TCATCGCCGA	TCATCAGGGC	CACCGCGAGG
421	GCCCCGATGG	TTTGCGGTGG	GGTGTGAGT	CGATCTGCAC	ACAGCTGACC	GAGTGGGTG
481	TGCCGATCGC	CCCATCGACC	TACTACGACT	ACATCAACCG	GGAGCCGAGC	CGCCGCGAGC
541	TGCGCGATGG	CGAACTCAAG	GAGCACATCA	<u>GCCGCGTCCA</u>	<u>CGCCGCCAAC</u>	TACGGTGTTT
601	ACGGTGCCCC	CAAAGTGTGG	CTAACCTGA	ACCGTGAGGG	CATCGAGGTG	GCCAGATGCA
661	CCGTGCAACG	GCTGATGACC	AAACTCGGCC	TGTCCGGGAC	CACCCGCGGC	AAAGCCC GCA
721	GGACCACGAT	CGCTGATCCG	GCCACAGCCC	GTCCC GCGGA	TCTCGTCCAG	CGCCGCTTCG
781	GACCACCAGC	ACCTAACCGG	CTGTGGGTAG	CAGACCTCAC	CTATGTGTG	ACCTGGGCAG
841	GGTTCGCCTA	CGTGGCCTTT	<u>GTCACCGACG</u>	<u>CCTACGTCGC</u>	<u>AGGATCCTGG</u>	GCTGGCGGGT
901	CGTTCCACG	ATGGCCACCT	CCATGGTCCT	CGACGCGATC	GAGCAAGCCA	TCTGGACCG
961	CCAACAAGAA	GGCGTACTCG	ACCTGAAAGA	CGTTATCCAC	CATACGGATA	GGGGATCTCA
1021	GTACACATCG	ATCCGGTTCA	GCGAGCGGCT	CGCCGAGGCA	GGCATCCAAC	CGTCGGTCCG
1081	AGCGGTCCGA	AGCTCCTATG	ACAATGCACT	AGCCGAGACG	ATCAACGGCC	TATACAAGAC
1141	CGAGCTGATC	AAACCCGGCA	AGCCCTGGCG	GTCCATCGAG	GATGTGAGT	TGGCCACCGC
1201	GCGCTGGGTC	GACTGGTTCA	ACCATCGCCG	CCTCTACCAG	TACTGCGGCG	ACGTCCC GCG
1261	GGTCGAACTC	GAGGCTGCCT	ACTACGCTCA	ACGCCAGAGA	CCAGCCGCGC	GCTGAGGTCT
1321	CAGATCAGAG	AGTCTCCGGA	CTACCCGGGG	CGGTTACGCA		

Cuadro 5.1.- Secuencia del elemento de inserción IS6110 de *M. tuberculosis* Las secuencias subrayadas corresponden a los iniciadores utilizados y su localización (Thierry y Col., 1993).

#### 2.4.2.- Iniciadores internos de la secuencia de inserción IS6110 de *M. bovis*.

Con la finalidad de lograr una mayor sensibilidad de la prueba, se diseñó un par de iniciadores internos en base a la secuencia correspondiente al amplicon producido por los iniciadores IS41-IS43 utilizando el programa Primer3, disponible en forma gratuita en Internet ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)). Los iniciadores diseñados fueron los siguientes:

IS1 5' AACGGCTGATGACCAA ACTC 3'

IS2 5' GGTGAGGTCTGCTACCCACA 3'



Estos iniciadores producen un amplicon de 155 pb que corresponde a la secuencia localizada entre los nucleótidos 79 y 233 de la secuencia de IS6110 (Cuadro 5.2).

1	ACTACGGTGT	TTACGGTGCC	CGCAAAGTGT	GGCTAACCT	GAACCGTGAG	GGCATCGAGG
61	TGGCCAGATG	CACCGTCGAA	<u>CGGCTGATGA</u>	<u>CCAAACTCGG</u>	CCTGTCCGGG	ACCACCCGCG
121	GCAAAGCCCG	CAGGACCACG	ATCGCTGATC	CGGCCACAGC	CCGTCCCGCC	GATCTCGTCC
181	AGCGCCGCTT	CGGACCACCA	GCACCTAACC	<u>GGCTGTGGGT</u>	<u>AGCAGACCTC</u>	<u>ACCTATGTGT</u>
241	CGACCTGGGC	AGGGTTCGCC	TACGTGGCCT	TTGTCA		

Cuadro 5.2.- Localización de los iniciadores internos para IS6110. Las secuencias subrayadas corresponden a los iniciadores utilizados y su localización (Thierry y Col., 1993).

2.4.3.-Diseño de iniciadores para la amplificación del gene *GyrB* de *A. lignieresii*.

Se diseñaron un par de iniciadores específicos para *A. lignieresii* utilizando la secuencia del gene *GyrB* depositada en el GenBank con número de acceso AY258261. Este gene es utilizado para determinar las relaciones filogenéticas en *Pasteurellaceae*, aún no hay trabajos publicados sobre este gene en *A. lignieresii*. Las secuencias de los iniciadores diseñados con el programa Primer3 son:

GR-1 5' CGGTGGAAAGCTCAATGAAT 3'  
 GR-2 5' ACCTGGTAAGCCGCCTAAAT 3'

Estos iniciadores amplifican una región de 182 pb del gene *GyrB* comprendida entre las bases 729 y 901 de la secuencia del gen. (Cuadro 5.3)

```

1   CTCCTATAAA GTATCGGGCG GTTTACACGG TGTGGGTGTG TCGGTGGTAA ATGCGCTTTC
61  ATCAAAATTA CAGCTCACCA TTCGCCGTA AGGTCATGTT CACGAGCAAT TTTATAGCTT
121 AGGCGAACCG GATGCGCCAT TAACCGTTAT CGGCGATACT GATAAAACCG GTACGATGGT
181 ACGTTTCTGG CCGAGCTTAG ATATCTTCAA AAATAAAACC GAATTCCAAT ATAAAATCCT
241 GTCAAAACGT TTACGTGAGC TTTCTTTCTT AAACCTCGGGC GTATCGATTG GATTAATTGA
301 CGAACGTGAC GGCAAAGAAG AACACTTCAA ATATGAAGGC GGTATTAAGG CTTACGTTGA
361 GTATTTAAAC GAAGGTAAAA CCCATATTCA TAATACGCCG TTCTATTTTC AACCGAGAAA
421 GACGGTATCG GTGTTGAAAGT GTCAATTACA GTGGAACGAC AGCTATAACG AAAACGTTTA
481 CTGTTTTACT AACAAATATTC CGCAACGTGA TGGTGGTAAG CACTTAGCCG GTTTCGGTGG
541 TGCATTAACC CGCGCATTAA AAAACTATAT GGATAACAGC GGTGTAGTGA AGAAAGCGGA
601 ATCGAATATT GATGCGTCAG GGGATGATGC GCGTGAAGGT TTGGTTGCGG TAATTTTCGGT
661 CAAAGTACCG GATCCGAAAT TCTCATCACA AACGAAAGAT AAGTTAGTGT CATCGGAAGT
721 CCGTGGTGCG GTGGAAGCT CAATGAATGTA AGCGTTGCAG GAGTACTTAG CGGAAAATCC
781 GGACGATGCG AAAAATATCG TCACCAAAT TATTGATGCG GCGCGTGCCG GTGAAGCCGG
841 GCGTAAAGCG CGTGAAATGA CACGTCGTAA AGGTGCGCTG GATTTAGGCG GCTTACCAGG
901 TAAATTAGCG GATTGCCAAG AAAAAGACCC AGCGTTATCG GAACTTTACT TAGTGGAGGG
961 TGACTCTGCT GGTGGCTCGG CAAAACAAGG TCGTGATCGT AAAAACCAAG CGATTCTGCC
1021 GTTAAAAGGT AAAATCTTAA ATGTTGAAAA AGCACGCTTT GACAAAATGC TTTCTTACA
1081 AGAGGTCGCA ACTTTGATTA CGGCGTTAGG TACCGGTATT GGTGCTGATG ATTACAATAT
1141 TG

```

Cuadro 5.3.- Secuencia del gene *GyrB* de *A. lignieresii*. Las secuencias subrayadas corresponden a los iniciadores utilizados y su localización (GenBank número de acceso AY258261, 2005).

## 5.5.- PCR

La amplificación de la secuencia IS6110 en *M. bovis* se realizó por PCR anidada en dos pasos. El ensayo de PCR para el Grupo-A y el Grupo-B consto de las mismas condiciones de desparafinación de los tejidos, extracción del DNA, condiciones de amplificación y visualización por electroforesis, solo varió en el kit de PCR (Taq Polimerasa y reactivos)

### 5.5.1. – Amplificación de la secuencia IS6110 con los iniciadores IS41-IS43 (PCR externa).

La mezcla de reacción para el Grupo-A se basó en la sugerida para “Amplificasa 250U” (Biotecnologías Universitarias) con las modificaciones descritas en la tabla 5.4.

La mezcla de reacción para el Grupo-B se basó en la sugerida para “MasterAmp TaqDNA Polimerase” (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA). con modificaciones como se describe en la tabla 5.5

Como control positivo de la reacción de PCR para ambos grupos se utilizó DNA geonómico de *M. tuberculosis* cepa H37Rv previamente aislado en el laboratorio y probado para la amplificación de IS6110. Nuestro control negativo consistió de la mezcla de reacción de PCR sin DNA templado. Las mezclas de PCR se realizaron en una área estéril, con pipetas y puntas de uso exclusivo para la preparación de las mezclas. Una vez hechas las mezclas de PCR, las muestras a amplificar se añadieron a la mezcla, cambiando de punta para cada muestra, de esta forma evitando la contaminación cruzada de nuestras muestras.

#### **5.5.1.1.- Composición de los reactivos.**

##### **Componentes Amplificasa 250U**

La Amplificasa es una DNA-Polimerasa termoestable recombinante que proviene de *Thermus aquaticus*. Es una enzima altamente purificada expresada en *E. coli*. Amplificasa puede ser utilizada en diversos procesos de amplificación, secuenciación y marcaje de DNA. Amortiguador 10X (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM, gelatina 10 µl/ml) 1 ml Cloruro de Magnesio 20X (30 mM) 1 ml. Amplificasa (5 Unidades/µl) 50 µl. Esta enzima está incluida en un amortiguador de almacenamiento (HPEPS 20 mM pH 7, KCl 100 mM, EDTA 0.1 mM, PMSF 0.5, DTT 1 mM, glicerol 50% v/v. (EpiBio, 2005).

Reactivos	Volumen
	Para 1 reacción (μl)
Agua	14.85
Amortiguador PCR 10x	2.5
MgCl <sub>2</sub> 20x	1.25
dNTPs (1.25 mM c/u)	4
Primer 1 [5μM]	0.6
Primer 2 [5μM]	0.6
Taq Polimerasa (Amplificasa)	0.2
<b>De esta mezcla distribuir 24 μl a cada tubo para PCR y agregar a cada tubo:</b>	
AND Templado (de las muestras)	1
AND Control positivo (H37Rv)	1
Control negativo	-
Volumen final de Mezcla	25

Tabla 5.4.- Preparación de la mezcla de reacción de PCR Grupo-A.

### Componentes MasterAmp TaqDNA Polimerase

La MasterAmp *Taq* polimerasa esta incluida en una solución de glicerol mM al 50% Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM Na Cl, 0.1 mM EDTA, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40 y 1 mM dithiothreitol. La MasterAmp Taq 10x PCR buffer es una solución de 500 mM de KCl y 100 mM Tris-HCl (pH 8.3 a 22°C) y en otra solución aparte se encuentra la MasterAmp 10x PCR Enhancer al igual que el MgCl<sub>2</sub> 25 mM. Estos reactivos mejoran la optimización de la reacción individual. MasterAmp *Taq* DNA Polimerasa. Es una enzima de la cepa modificada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*. La enzima muestra una optima actividad a temperaturas comprendidas entre 70°C – 74°C, esta enzima mejora la PCR u otra actividad requerida en la actividad sintética del DNA a altas temperaturas (EpiBio, 2005)

Reactivos	Volumen
	Para 1 reacción (µl)
Agua	7.95
Amortiguador PCR 10x	2.5
Buffer MasterAmp	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.6
dNTPs (1.25 mM c/u)	4
Primer 1 [5µM]	0.6
Primer 2 [5µM]	0.6
Taq Polimerasa	0.25
<b>De esta mezcla distribuir 24 µl a cada tubo para PCR y agregar a cada tubo:</b>	
AND Templado (de las muestras)	5
AND Control positivo (H37Rv)	5
Control negativo	-
Volumen final de Mezcla	25

Tabla 5.5.- Preparación de la mezcla de reacción de PCR Grupo-B.

La amplificación se realizó en un termociclador (Termo hybrid, PCR sprint, SPRT001, Ucrania) los siguientes parámetros fueron los mismos para ambos grupos: un paso de desnaturalización inicial de 6 min a 96° C, seguidos por 35 ciclos de 30 seg a 94° C, 30 seg a 60° y 30 seg a 72° C, para terminar con un paso de extensión final de 10 min a 72° C.

#### .5.2. – Amplificación de la secuencia IS6110 con los iniciadores IS1-IS2 (PCR interna).

Para realizar el segundo paso de la PCR anidada se utilizaron los iniciadores IS1-IS2 y como templado de DNA utilizamos el amplicon producido en la PCR externa correspondiente para cada muestra o para el control positivo. Las cantidades y

concentraciones de los reactivos para la preparación de la mezcla de reacción son iguales que en el caso de la PCR externa, así como las condiciones de amplificación dadas para cada grupo (Grupo-A tabla 4.5; Grupo-B tabla 5.5)

### 5.5.3. –Amplificación del gene *GyrB* de *A. lignieresii*.

La reacción de PCR utilizó los iniciadores GR-1 y GR-2, y se corrió la prueba bajo las mismas condiciones de amplificación dadas para los genes de *M. tuberculosis* del Grupo-B, en la tabla 5.5.

## 5.6.- Visualización de los productos de la PCR por Electroforesis

Los productos amplificados se visualizaron por electroforesis en gel agarosa a 1% en solución amortiguadora TAE 0.5 X. Para la preparación del gel de agarosa al 1% se agregaron 0.3 gr de agarosa a 30 ml de solución amortiguadora TBE 0.5 X. La mezcla se calentó hasta que se disolvió la agarosa. La mezcla se vertió en el porta gel y se colocó el peine para formar los pozos de carga. Después de solidificarse el gel, este se colocó en la cámara de electroforesis (Electroforetic gel system, EC32.0, Minicell Prim,) y se añadió suficiente solución TBE 0.5 X para cubrir el gel. Las muestras se prepararon al mezclar 1µl de solución de carga 0.2 µl de bromuro de etidio y 5 µl de cada muestra. Finalmente se cargó el gel colocando 5 µl de la mezcla en cada uno de los pozos del gel. Las muestras se corrieron a 80 volts por 30 minutos en un Fotoforce 250 (Fotodyne incorporated, 7-4297, New Berlin, Wi, USA). Los geles se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta (Fotodyne incorporated, 3-3000, New Berlin, Wi, USA). Los resultados se fotografiaron con una cámara digital “Sony”,

## VI.-RESULTADOS.

### 6.1.-Ensayo de PCR – Grupo A.

La amplificación de las secuencias de DNA para *M. bovis* por medio de la PCR simple utilizando los iniciadores IS41 e IS43 que producen un amplicon de 315 pb del elemento de inserción IS6110, resultaron negativas para las 30 muestras estudiadas, por lo que fue necesario realizar la PCR anidada.

En el ensayo de la PCR anidada se observó que de las 10 muestras negativas a histopatología que no presentaban cambios patológicos aparentes en el tejido resultaron negativas para PCR (figura 6.1). De las 10 muestras sospechosas a TBb, cinco fueron positivas (+50%) y cinco no amplificaron (figura 6.1) y finalmente 6 de las 10 muestras fueron positivas para la PCR (+60%) y cuatro fueron negativas al no presentar amplificación (figura 6.2).

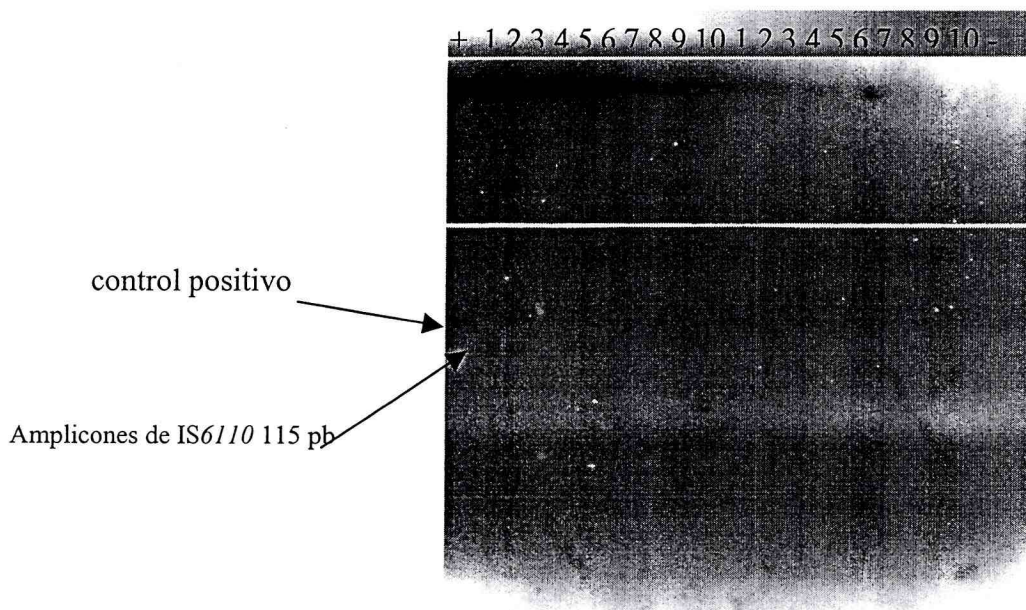


Figura 6.1.- Muestras sospechosas y negativas a TBb, Grupo A, PCR anidada. Se observa amplificación en el control positivo y en las muestras del carril 1,2,4,5,7. En las muestras negativas no hubo amplificación, ni en el control negativo.

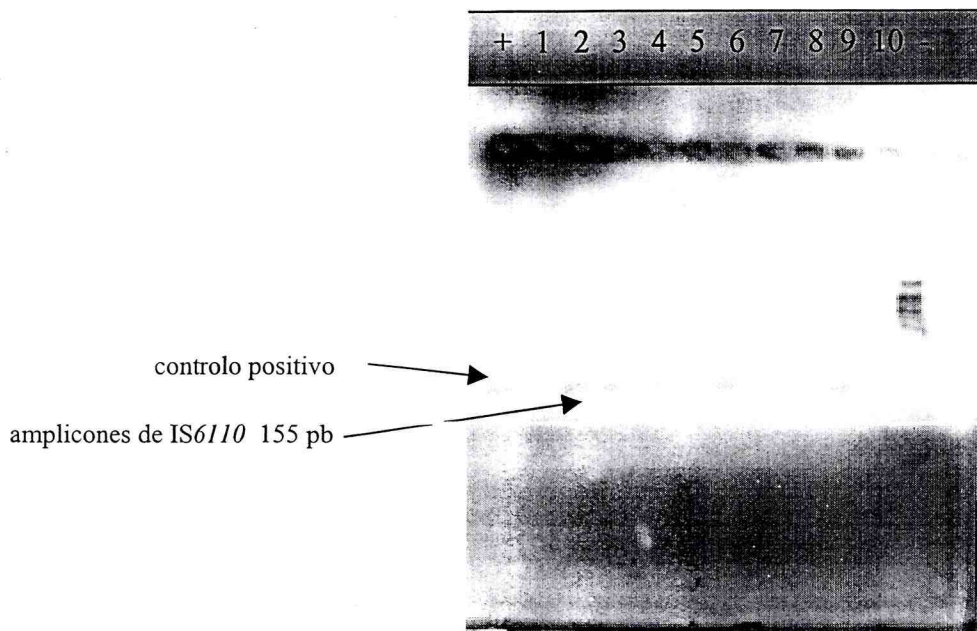


Figura 6.2.- Muestras positivas a TBb, Grupo A, PCR anidada. Se observa amplificación en el control positivo y en las muestras del carril 2,3,4,5,6 y 9.

### 6.2.-Ensayo de PCR – Grupo B.

La amplificación de la DNA micobacterial por medio del ensayo de PCR simple utilizando los iniciadores IS41 e IS43 del elemento de inserción IS6110 de las muestras de tejido incluidas en parafina, produjo resultados negativos para las 30 muestras al igual que las de la PCR del Grupo-A, por lo que también fue necesario el realizar la PCR anidada.

Los resultados para la PCR anidada, mostraron que solo 3 (+30%) de las 10 muestras positivas a TBb por histopatología lo fueron de igual forma para la PCR y 7 de ellas no tuvieron amplificación (figura 6.3). Las 10 muestras sospechosas para la PCR resultaron negativas. Las 10 muestras sospechosas a actinobacilosis fueron probadas con los iniciadores para *M. bovis* obteniendo resultados negativos.



El ensayo de PCR utilizando los iniciadores GR-1 y GR-2 que amplifican una región de 182 pb del gen *GyrB* de *A. lignieresii* comprendida entre las bases 729 y 901, fue probada tanto en las muestras sospechosas a TBb, en la cual no hubo ninguna amplificación, como en las 10 muestras sospechosas a actinobacilosis donde los resultados obtenidos fueron negativos (figura 6.4).

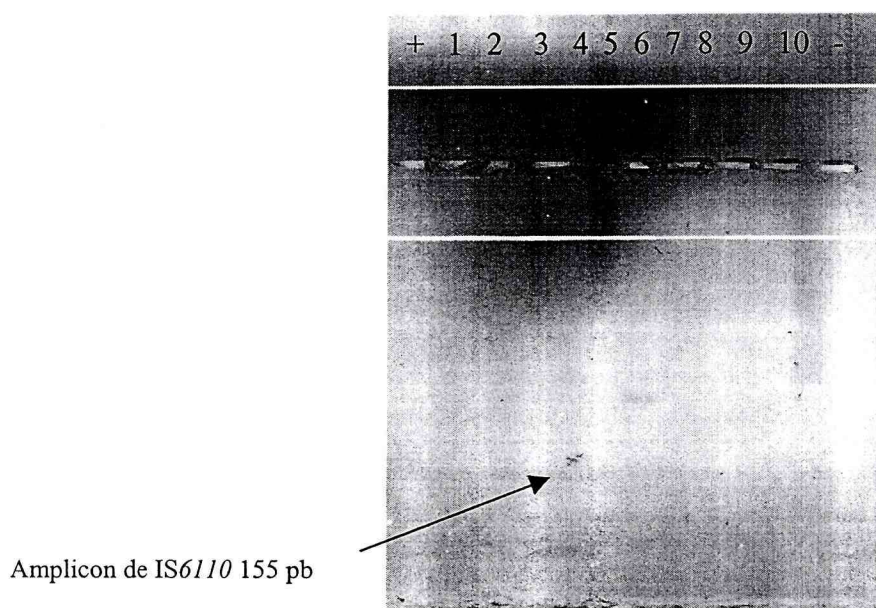


Figura 6.3.- Muestras positivas a TBb, Grupo-B, PCR anidada. Se observa amplificación en la muestra 5. Aunque al visualizar el gel en el transiluminador con luz ultravioleta (Fotodyne incorporated, 3-3000, New Berlin, Wi, USA) se observó amplificación en el control positivo, en las muestras 5, 6 y 7 (todas las bandas de amplificación fueron muy tenues) solo la muestra en el carril 5 fue detectada por la película fotográfica.

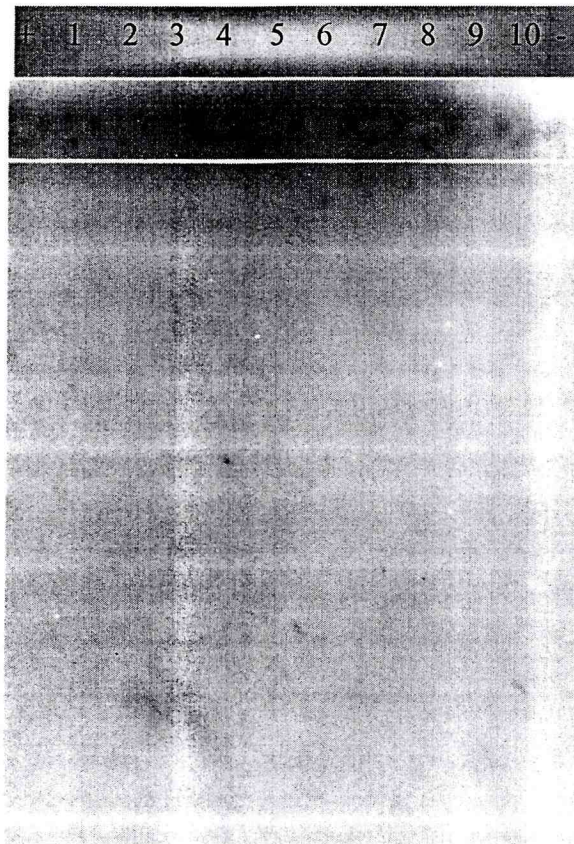


Figura 6.4 - Muestras sugestivas a actinobacilosis, Grupo-B, iniciadores GR-1 y GR-2 gen GyrB de *A. lignieresii*. No hubo amplificación.

Cuadro 6.1.- Grupo-A. Resultados comparativos de las pruebas de diagnósticos para tuberculosis bovina de las muestras de tejido incluidas en parafina.

No de Caso	Clave de Bitácora	Histopatología		PCR
		Zhiel-Neelsen (BAAR)*	Hematoxilina y Eosina	
1	<i>tb030010</i>	-	<i>SPA**</i>	-
2	<i>tb030020</i>	-	<i>SPA</i>	-
3	<i>tb030025</i>	-	<i>SPA</i>	-
4	<i>tb030028</i>	-	<i>SPA</i>	-
5	<i>tb030063</i>	-	<i>SPA</i>	-
6	<i>tb030064</i>	-	<i>SPA</i>	-
7	<i>tb030080</i>	-	<i>SPA</i>	-
8	<i>tb030093</i>	-	<i>SPA</i>	-
9	<i>tb030110</i>	-	<i>SPA</i>	-
10	<i>tb030154</i>	-	<i>SPA</i>	-
1	<i>tb030012</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	+
2	<i>tb030013</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	+
3	<i>tb030016</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
4	<i>tb030024</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	+
5	<i>tb030034</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	+
6	<i>tb030033</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
7	<i>tb030037</i>	-	Neumonía granulomatosa	+
8	<i>tb030040</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
9	<i>tb030041</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
10	<i>tb030101</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
1	<i>tb030113</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
2	<i>tb030115</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
3	<i>tb030254</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
4	<i>tb030264</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
5	<i>tb030276</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
6	<i>tb030316</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
7	<i>tb030331</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
8	<i>tb030363</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
9	<i>tb030377</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
10	<i>tb030421</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-

\* BAAR... bacilos alcohol-ácido resistente.

\*\* SPA..... sin cambios patológicos aparentes.

Cuadro 6.2.- Grupo-B. Resultados comparativos de las pruebas de diagnósticos para tuberculosis bovina de las muestras de tejido incluidas en parafina.

No de Caso	Clave de Bitácora	Histopatología		PCR
		Zhiel-Neelsen (BAAR)*	Hematoxilina y Eosina	
1	<i>Tb050298</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
2	<i>Tb051167</i>	+	Neumonía granulomatosa	-
3	<i>Tb051172</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
4	<i>Tb051184</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
5	<i>Tb051354</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
6	<i>Tb05138</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
7	<i>Tb051383</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	+
8	<i>Tb051393</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
9	<i>Tb051404</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
10	<i>Tb051406</i>	+	Linfadenitis granulomatosa	-
1	<i>Tb050315</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
2	<i>Tb050316</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
3	<i>Tb050351</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
4	<i>Tb050352</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
5	<i>Tb050368</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
6	<i>Tb050369</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
7	<i>Tb050370</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
8	<i>Tb050371</i>	-	Hepatitis y adrenalitis granulomatosa	-
9	<i>Tb050378</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
10	<i>Tb050410</i>	-	Linfadenitis granulomatosa	-
1	<i>Tb0501349</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
2	<i>Tb051169</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
3	<i>Tb051170</i>	-	Neumonía piogranulomatosa	-
4	<i>Tb051187</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
5	<i>Tb051343</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
6	<i>Tb051348</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
7	<i>Tb051350</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
8	<i>Tb051384</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
9	<i>Tb051385</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-
10	<i>Tb051391</i>	-	Linfadenitis piogranulomatosa	-

\* BAAR bacilos alcohol-ácido resistente.



\* SPA..... Sin cambios patológicos aparentes.

\*\*Z-N.... Zhiel Neelsen.

Gráfica 6.1.- porcentajes de detección. PCR (23%) y Z-N (33%) para la detección de TBb en las muestras de tejido incluidas en parafina. Los resultados para actinobacilosis no se graficaron ya que no exhibió amplificación para *A lignieresii*.

De las 60 muestras probadas 10 no presentaban cambios patológicos aparentes en el tejido (16 %). 40 de las muestras presentaron lesiones granulomatosas compatibles con TBb por medio de la tinción de H y E (66%). En 20 muestras fue detectado la presencia del bacilo ácido alcohol resistente por medio de la tinción de Z-N (33%) y solo 14 de las 60 muestras detectaron DNA micobacterial (23%) y en un 26% de los casos sospechosos a TBb no se pudo determinar la presencia de *M. bovis* por PCR o histopatología. 10 muestras prestaron lesiones compatibles con actinobacilosis por medio de la tinción de H y E, las cuales fueron negativas para PCR al no detectar DNA micobacterial ni la presencia de DNA de *A. lignieresii*.

## VII.-DISCUSIÓN.

En años recientes una gran cantidad de laboratorios clínicos micobacteriológicos han tenido acceso a técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Pero algunas situaciones en la estandarización de la técnica (resultados falsos positivos y falsos negativos) y los altos costos en las pruebas han limitado su aplicación a gran escala. La aplicación de la PCR para la detección de enfermedades es dependiente de la especificidad, sensibilidad, de la comodidad en su uso y la cantidad de muestra analizada (Taylor y Col. 2000).

Los métodos convencionales para la identificación de micobacterias involucra la evaluación de características fenotípicas, bioquímicas y de crecimiento, lo cual consume demasiado tiempo y son tediosa (Taylor y Col. 2000). El análisis molecular de los agentes infecciosos requiere de disponibilidad y un origen seguro del microorganismos de los cuales se obtendrá el DNA. Las muestras clínicas pueden ser tomadas directamente de los pacientes infectados o pueden ser protegidas utilizando sistemas *in vivo* o *in vitro* (Cataloluk y Col., 2003). Los tejido incluidos en parafina son utilizados para estudios en la identificación de cepas del complejo *M. tuberculosis* y además para el estudio de la epidemiología y evolución de tuberculosis patógena.(Zink y Nerlich, 2004).

El examen histopatológico de secciones de tejido permite la distinción entre lesiones granulomatosas y otras lesiones clínica o radiologicamente similares incluyendo el cáncer, así como también la evaluación del tipo histológico y el estado de la lesión del tubérculo, pero no puede diferenciar ente las lesiones producidas por *M. bovis* y las de otras micobacterias o agentes estrechamente relacionados por lo cual carece de especificidad y la sensibilidad es limitada. (Taylor, y Col. 2000; Fukunaga y Col, 2002)

En el presente trabajo la detección de bacilos alcohol-ácido resistentes por medio de histopatología fue baja solo del de 33%, esto puede deberse a que normalmente en la observación microscópica de tejidos con lesiones micobacteriales, la observación de pocos o de ninguno bacilo sea común, aún cuando las lesiones parezcan histológicamente activas. Fukunaga y Col., 2002; sugieren que la baja sensibilidad en la detección de bacilos alcohol-ácido resistentes es debido a la formalina y/o al xilol, los cuales son usados para hacer las preparaciones de las secciones de tejidos incluidos en parafina. Dichos solventes desestabilizan a la micobacteria en la tinción ácido resistente. Esta hipótesis se sustenta debido a que el blanco molecular del colorante para la tinción ácido resistente (carbolfuccina, rodamina o tinción de auramina) es la micolata en la superficie bacterial. La micolata es un agente orgánico soluble, el cual puede ser extraído de la superficie de la célula dentro de los solventes. De esta forma la formalina y/o el xilol alteren la propiedad de tinción de los bacilos. (Fukunaga y Col, 2002)

En los resultados obtenidos por PCR se obtuvieron 5 muestras positivas a *M. bovis* (8.3%) donde no se detecto la presencia de bacilos alcohol-ácido resistentes por histopatología, esto puede deberse a que la diferencia en la detección de bacilos entre PCR y la histopatología es el efecto de la formalina y el xilol en la tinción histopatológica ácido resistente. También pudiera tratarse de que la PCR no solo detecta DNA en bacilos vivos sino además moléculas de DNA aisladas de bacilos muertos y depositadas en el estroma o en las células fagocíticas (Fukunaga y Col, 2002). La PCR solo detectó DNA micobacterial en 14 de las 60 muestras analizadas (23%) Esto puede ser explicado por la presencia de inhibidores de la reacción de la PCR al igual que la dificultad en la extracción del DNA micobacterial debido al bajo número de bacilos (Coetsier y Col., 2000), la detección de *M. tuberculosis* en esputo y en muestras bronquiales para pacientes humanos tuberculosos se

realiza con éxito, pero no es así para tuberculosis bovina, donde la carga bacteriana es sustancialmente menor (Taylor y Col. 2000).

La detección del DNA micobacterial basada en la PCR en muestras incluidas en parafina pueden presentar poca sensibilidad bajo ciertas condiciones como lo es la degradación de ácidos nucleicos causados por la fijación de formalina usados rutinariamente (Cataloluk y Col., 2003). Los resultados de falsos positivos y falsos negativos pueden ocurrir por errores en el muestreo y la metodología utilizada al ignorar las características morfológicas del tejido, así como la cantidad de muestra, el tipo de fijación y la heterogeneidad del tejido dañado. Además durante el almacenamiento de la muestra fijadas en formalina e incluidas en parafina se lleva a cabo la alteración del DNA cromosomal (Heinmoller y Col., 2001; Cataloluk y Col., 2003) *Hirunwivatkul y Col, 2002*; reportaron que la sensibilidad de la PCR está relacionada con el tiempo de almacenamiento de los tejidos incluidos en parafina, a mayor tiempo de almacenamiento el porcentaje de sensibilidad disminuye.

La presencia de inhibidores de la PCR en tejidos incluidos en parafina es un serio problema en el diagnóstico que frecuentemente produce resultados de falsos negativos. Para remover los inhibidores de la PCR algunos investigadores han utilizado protocolos de purificación (Bascaña y Belák, 1996); La utilización del método de fijación, que mejora la sensibilidad de los métodos basados en la PCR (Sen Gupta y Col., 2003). Otros métodos de descontaminación de muestras frecuentemente utilizados son el NaOH-N-acetilcisteína y el protocolo de lauril sulfato de sodio (Rodríguez y Col., 2000). Los procesos extensivos de purificación produce un aumento en el riesgo de la contaminación de las muestras con cada paso de manipulación, además no todas las muestras contienen componentes que inhiban la PCR (Bascaña y Belák, 1996).



Las muestras sugestivas a actinobacilosis que fueron probadas para amplificar el DNA micobacterial en este trabajo, resultaron negativas al igual que el ensayo de PCR utilizando los iniciadores GR-1 y GR-2 que amplifican una región del gene *GyrB* de *A. lignieresii*. Estas muestras fueron caracterizadas por la histopatología como lesiones piogranulomatosas pero no se pudo determinar el agente etiológico. Ardeleanu y Col., 2004. reportaron una tuberculosis atípica piogranulomatosa, la cual contenía necrosis supurativa, y polimorfismo celular. Las células epiteloides mostraban mitosis frecuente, alrededor de los granulomas se encontraban pequeños linfocitos en el agregado linfoide nodular. Los linfocitos T fueron numerosos en todos los tipos de granulomas tuberculosos (Ardeleanu y Col., 2004). Además las características de inflamación granulomatosa crónica puede deberse a varias condiciones diferentes a la TBb, por lo cual es importante la diferenciación con otras etiologías que producen lesiones granulomatosas en el ganado bovino, como lo son la actinobacilosis y la actinomicosis (Estrada y Col., 2004). La baja sensibilidad en el método de PCR para la detección de actinobacilos pudo ser debido al método de extracción del DNA, al tamaño del amplicon esperado, al tipo de tejido que pudiera tener un inhibidor de la Taq Polimerasa, la fijación de formalina o el proceso de desparafinación del tejido (Mahaisavariya y Col. 2005).

Los iniciadores específicos GR-1 y GR-2 diseñados para gene *GyrB* de *A. lignieresii*, no pudieron ser probados satisfactoriamente debido a que se careció de una cepa de referencia como control positivo, por lo cual la determinación de su sensibilidad y especificidad queda pendiente para futuros trabajos.

## VIII.-CONCLUSIÓN.

El ensayo de PCR es un método de detección micobacterial rápido y sensitivo que produce resultados confiables entre 48 y 72 horas, en muestras de tejido bovinos incluidos en parafina. La detección del DNA micobacterial basadas en la PCR en muestras incluidos en parafina pueden presentar poca sensibilidad bajo ciertas condiciones. Los resultados de falsos positivos y falsos negativos pueden ocurrir por errores en el muestreo y la metodología utilizada al ignorar las características morfológicas del tejido, así como la cantidad de muestra, el tipo de fijación, la heterogenisidad del tejido dañado y condiciones presentes en el protocolo de la PCR.

En el presente trabajo, no se determinó el diagnóstico diferencial entre *M. bovis* y *A. lignieresii* debido a que no se pudo probar la sensibilidad de los iniciadores para *A. lignieresii* al no presentar amplificación del DNA y por falta de control positivo.

En el 26% de las muestras probadas por Z-N y por PCR el agente causal de lesiones granulomatosas no fue detectado, esto puede deberse a otros agentes etiológicos que producen lesiones granulomatosas y que comparten características histopatológicas con la TBb en el ganado (*Actinomyces bovis*, *Staphylococcus spp*, *Manhemia spp*, *Brucella spp.*, *M paratuberculosis* y Coccidioidomicosis) o fue debido a una baja sensibilidad de la PCR producida por algunos inhibidores de la reacción.

Los resultados obtenidos, indican que en futuros trabajos la PCR debe de ser combinada en ciertas condiciones con protocolos de purificación para remover los inhibidores de la PCR y con esto optimizar el ensayo, de esta manera se podrán obtener mejores resultados en el diagnóstico de la TBb y se podría confirmar los casos no claros para la histopatología.

## VII.-LITERATURA CITADA.

- Ardeleanu C., F Anderi, M Ceausu, D. Ene, M. Mihai, G Butur, F. Staniceanu, C. Dobrea, P. Glabenu y F. Vasilescu (2004) “Cellular immune response in atypical tuberculosis diagnosed by PCR in paraffin embedded material” Rom J Morphol Embryol. 45: 63-72
- Barrera L. (2000) “La tuberculosis vista con el lente de aproximación de la biología molecular” Medicina. 60 (1) 60:17-25
- Bascuñana R. C. and K. Belák. (1996)” Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and Restriction Enzyme Analysis”.Journal of Clinical Microbiology 34 (10) 2351-2355
- Benson D.A., M. Bouski, D.J. Lipman y J. Ostell (1996) “GenBank” Nucleic acids reserch 24 (1) 1-5
- Biberstein E.L. (1994). “Actinobacillus”. Tratado de Microbiología Veterinaria. Acriba Zaragos.: 203
- Blackwood K. S., He Cheng, J. Gugnton, C. Turenne, J. Wolfe y A. M. Kabani. (2000) “Evaluation of recA sequences for identification of *Mycobacteruim* species”. Journal of Clinical Microbiology. 38 (8): 2846-2852
- Carrada B. T. (2002) “Perspectivas en tuberculosis: Sugerencias para su eliminación en la republica Mexicana”. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. 15 (2) 102-125
- Castañeda G. R y R. Laniado-Laborín. (2002) “Coexistencia de tuberculosis y coccidioidomycosis. Presentación de dos casos clínicos” Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. 15 (2): 98-101

- Cataloluk O., E.A.Cakmak, N. Buyukberber y O. Barlas (2003) "Formalin fixing and paraffin embebbing may lead to extra band development in PCR." New Microbiol. 26 (2) :193-8
- Chávez T. C. y C. J. Lizardi (2002) "Tuberculosis" Médica Sur. 9 (4): 178-187
- Christensen H., M. Bisgaard, A. Øystein y O. J. Elmerdahl. (2002) "Final Classification of Bisgaard taxon 9 as *Actinobacillus arthritidid* sp. nov. and recognition of a novel genomospecies for equine strain of *Actinobacillus lignieresii*" International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52: 1239-1245
- Coetsier C., P. Vannuffel, N. Blondeel, J.F.Denef, C. Cocito, J.L. Gala. (2000) "Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin embedded tissue from cattle" Journal of Clinical Mycobiology. 38 (8): 3048-3054.
- Corner L.A. y D.U. Pfeiffer. (2003) "Social-network analysis of *Mycobacterium bovis* trasmission among captive brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*)" Prev Vet Med. 59 (3) 147-167
- Díaz O. F., R. V. Banda, M. L. Jaramillo, D. C. Arriaga, S. D. González, Ch. C. Estrada (2003) "Identification of *Mycobacterium bovis* infected cattle by immunological and molecular methods". Veterinaria Mexico. 34 (1) 13-26
- DOF. (1996) Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995. "Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*)". Diario Oficial de la Federación. México D.F. 8 de Marzo de 1996
- EpiBio. (2005) "MasterAmp Taq DNA Polymerase" (En línea, 2005) www.EpiBio.com
- Espinosa de los Monteros L.E., J.C.Galán, M. Gutiérrez, S. Samper, M. J.F. García, C. Martín, L. Domínguez, L. Rafael, F. Baquero, E. Gomez-Mamposo, J. Blázquez (1998) "Allele-Specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequenses for

distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intranspecific *M bovis pncA* sequence polymorphism". Journal of the Clinical Microbiology 36(1):239-242

- Estrada-Chávez C., F. O. Díaz, C. D. Arriaga, N. Villegas-Sepúlveda, R G. Pérez, S. D. González. (2004) "Agreement between PCR and conventional methods for diagnosis of bovine tuberculosis". Veterinaria México. 35 (3): 225-236
- Estrada-Chávez C, R Mancilla, C. D. Arriaga, R. G Pérez y F. O. Díaz (2001) "Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México". Veterinaria México. 32 (2) 207-211
- Fagundo S. R, S. M. A. Cerros y P. E. Herrera. (2004) "Ventajas de un cultivo en un equipo automatizado y la prueba de PCR para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*". Revista Mexicana de Patología Clínica. 51 (2):70-74
- Fang Z., D.T. Kenna, D.N, Smittipat, P. Palittapongarnpim, B. Watt, y K.J. Forbes. (2001) "Molecular evidence for independent occurrence of IS6110 insertion at the same sites of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* in different clinical isolates". Journal of Bacteriology 183 (18) 5279-5284
- Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doing, and K..J. Forbes. (1998). "IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains". J. Bacteriol. 180 (8): 2102-2109
- Freeman B.A. (1984). "Actinobacillus". Tratado de Microbiología de Burrows. 21<sup>a</sup> Edición . Interamericana.: 594.
- Fukunaga H., T. Murakami, T. Gonodo, K. Sugi y T. Ishihar. (2002) "Sensitivity of acid-fast staining for *Mycobacterium tuberculosis* in formalin fixed tissue". Am. J. Respir Crit Care Med. Vol. 166. 994-997

- GenBank/NCBI (2005) "Taxonomy Actinobacillus" (En línea, 2005)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/browser/wwwtox.cgi?id=720>
- González C. J. (2004) "Desarrollo e investigaciones clínicas: el caso de la tuberculosis". Gaceta Biomédica. 34: 36-39
- Hamid J., D. Puron, S. Asif. (2002). "Bovine tuberculosis in dairy animals at Lahore, threat to the public health". Veterinary Microbiology Metropolitan  
<http://www.nriorv.com/vet/hovineth.htm>
- Hedegaard J, S. A de A Steffensen, N. Nørskov Lauritsen, K. K. Mortensen y H. U. Sperling-Petersen (1999). "Identification of Enterobacteriaceae by partial sequencing of the gene encoding translation initiation Factor 2" International Journal of Systematic Bacteriology 49: 1531-1538
- Heinmoller E., B. Renk, K. Beyser, W. Deitmer, C. Langer y J. Ruschoff. (2001) "Pitfalls in diagnostic molecular pathology-significance of sampling error". Virchows Arch. 439 (4): 504-11.
- Hirunwiwatkul P., S. Tumwasorn, C. Chantranuwat y U. Sirichai. (2002) "A comparative study of diagnostic test for tuberculous lymphadenitis: polymerase chain reaction vs histopathology and clinical diagnosis". J Med Assoc Thai. 85 (3): 320-6.
- Jiménez M. M. del C., S. R. Báez, C. M. Linarez, S. R. Chávez., L. R. Lascrain, G. E. Zenteno (2001). "Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis". Rev. Inst. Nal. Enf. Rresp. Mex. 14 (1): 39-48
- Laniado-Laborín R., M. L. Enríquez-Rosales, N. A. Licea. (2001) "Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa". Rev. Inst. Nal. Enf. Rresp. Mex. 14 (1): 22-26

- Lentsch R. H. y Wagner J. E. (1980) "Isolation of *Actinobacillus lignieresii* and *Actinobacillus equuli* from laboratory rodents". Journal of Clinical Microbiology. 12 (3): 351-354
- Liébana, E., A. Aranaz, A. Mateos, M. Vilafranca, E. Gomez-Mampaso, J. C. Tercero, J. Alemany, G. Suarez, M. Domingo, and L. Domínguez. (1995). "Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organism in bovine tissue samples by PCR". J. Clin. Microbiol. 33 (1):33-36
- Loera-Castañeda V., J. Sánchez-Corona y M. C. Mórán-Moguel (2003) "El papel de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de la tuberculosis". Gaceta Médica de México. 139 (3): 288-290
- Mahaisavariya, P., A. Chaiprasert, J. Manonukul, S. Khemngern y N. Tingtoy (2005) "Detection and identification of *Mycobacterium* species by polymerase chain reaction (PCR) from paraffin-embedded tissue compare to AFB staining in pathological sections". J Med Assoc Thai; 88(1):108-13
- Mancilla R. (2004) "Descifran el código genético del bacilo de Koch" Gaceta Biomédicas. 34: 44-45
- Martinez-Murcia A.J., A.I Anton y F. Rodriguez-Valera. (1999) "Patterns of sequence variation in the two regions of the 16S rRNA multigene family of *Escherichia coli*". International Journal of Systematic Bacteriology 49: 601-610
- Menzies F D. and S.D.Niell (2000) "Cattle-to-Cattle transmission of bovine tuberculosis" The Veterinary Journal. 160: 92-106.
- Merchant I.A. and R.A. Pocker. (1980) "Genero *Actinobacillus*". Bacteriología y Virología Veterinaria. Acriba Zaragoza. : 381-383.

- Milián F., L.M. Sánchez, P. Toledo, C. Ramírez, M.A. Santillán (2000) “Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México”. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42: 13-19
- Moreno A. L. (2004) “Desde las fuerzas mágicas hasta Roberto Koch: Un enfoque epidemiológico de la tuberculosis”. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. 17 (2): 117-125
- Niemann S., E. Ritcher y S. Röch-Gerdes (2000) “Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: Evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *M bovis*” Journal of Clinical Microbiology. 38 (1): 152-157
- Nørskov Lauritsen N., H. Christensen, O. Henrik, M. Kilian y B. Bruun. (2004) “Delineation of the genus *Actinobacillus* by comparison of partial *infB* sequences” International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 635-644
- Park Y.D., J.Y. Kim, K. Choi. (2003) “Comparación de la PCR con las características histopatológicas de la tuberculosis en especímenes histopatológicos embebidos en parafina y fijados en formalina” Arch Pathol. 127
- Park Y.K., G.H. Bai y S.J. Kim (2000) “Restriction Fragment Polymorphism Análisis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region”. Journal of Clinical Microbiology 38 (1) 191-197
- Pedrosa J, B. M. Saunders, R. Appelberg, I. M. Orme, M. T. Silva y A. M. Cooper (2000) “Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice”. Infection and Immunity. 68 (2) 577-383
- Peel M.M., K.A.Hornidge, M. Luppino, A.M. Stacpoole y R.E. Weaver (1991) “*Actinobacillus spp.* and related bacteria in infected wounds human bitten by horses and sheep” Journal of Clinical Microbiology. 29 (11): 2535-2538



- Pollock J. M., S. D. Neill. (2001) “*Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle”. The Veterinary Journal. 163: 115-127
- Rodríguez A. J., S. Palma, J. L. Maestre, D. Saavedra, T. Reyes y M. Perovani. (2000). “Detección de micobacterias en muestras clínicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa”. Revista Biomédica 11 (4): 257-262
- Rodríguez S. I. y S. H. Barrera (2004) “La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención” Ciencia UANL. 7 (3): 323-335
- Rycroft A. N. y L. H. Garside (1999) “Actinobacillus species and their role in animal disease” The Veterinary Journal. 159 (1): 1-19
- Salazar L. M. A. (2002) “Día mundial de la tuberculosis 2002: Detener la tuberculosis, lucha contra la pobreza” Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. 15 (2): 62-63
- Sen Gupta R., D. Hilleman, T. Kubica, J. Muller-Quernheim, J. Galle , E. Vollmer y T. Goldman. (2003) “HOPE-fixation enables improved PCR-based detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues”. Pathol Res Pract. 199 (9): 619-23
- Sergeant E. (1999). “Cattle abscesses - bovine actinobasilosis”. Animal Health Surveillance Quarterly. 4 (3): 8
- Simón A. R. I. (2001) “Actinobacilosis (lengua de madera)” Manual de Clínica de Bovinos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 25-26
- Skuce R. A., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. H. Glyn, y S. D. Nelly (2002). “Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets”. Microbiology 148: 519-528.

- Taylor M. J., M. S. Hughes, R. A. Skuce, y S. D. Neill. (2000) "Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Clinical Specimens Using Real-Time Fluorescence and Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Rapid-Cycle PCR". Journal of Clinical Microbiology 39 (4); 1272-1278
- Thierry D., M. D. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, J. L. Guesdon, M. Chandler, and O. Fayet. (1993), (En línea, 2003) GenBank, accesion N. : X17348 (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Trejo y P., R. D. Díaz., M. G. Moreno, N. M. J. Palacios, A. L. Soriano y R. J. Carrasco (2003) "Guía clínica para el diagnóstico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis pulmonar". Revista Médica del IMSS. 41 (Sup1): 583-590
- Turner O. C., R. J. Basaraba y I. M. Orme. (2003) "Immunopathogenesis of pulmonary granulomas in the guinea pigs after infection with *Mycobacterium tuberculosis*" Infection and Immunity 71 (2): 864-871
- Vera-Cabrera, L., M. A. Hernandez-Vera, O. Welsh, W. M. Jonson, J. Castro-Garza (2001). "Phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis* is a preferential locus for IS6110 transposition." Journal of Clinical Microbiology. 39 (10): 3499-3504.
- Viader S. J., M. R Tijerina, G. E. Garza y O. M. Guerrero (2003) "Desarrollo de una prueba de susceptibilidad de *Mycobacterim tuberculosis* mediante el índice de ácidos micólicos". Ciencia UANL. 6 (2):226-232
- Woolcock J.B. (1984). "*Actinomices y Actinobacillus*" Infecciones Bacterianas e Inmunidad de los Animales Domésticos. Acriba.: 231-232
- Youn P.D., K.J. Yeon, K. Un CH., L. L. Sook, L. Ch. Hun, S.M. Young, S.K. Suck. (2002) "Comparison of polymerase chain reaction with histopathologic feature for diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded histologic specimens." Arch. Pathol Lab Med (127) 326-330

- Zenteno C. R. (2003) “Pasado, presente y futuro de las técnicas de diagnóstico de la tuberculosis”. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. 16 (3): 181-186
- Zink A.R. y A.G. Nerlich (2004) “Molecular stain identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in archival tissues samples”. J Clin Pathol. 57 (11): 1185-92.
- Zúñiga R. A. Joaquín, L.E. Pérez, V. Quiroz, G. Vargas-Alarcón, A. García, R. Olvera, C. Navarro, A. Camarena, A. Granados, L. M. Selmán (2000) “Aspectos inmunogenéticos de la tuberculosis pulmonar”. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de México. 13 (4):