



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS COORDINACIÓN DE POSGRADO

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por éste conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló el pasante de Maestría en el Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, MVZ Jose Luis de la Torre Covarrubias, cuyo titulo es:

"Evaluación de la eficacia diagnostica de tuberculosis bovina por la prueba de tuberculina, mediante la identificación de las lesiones histológicas, usando como referente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estudio prospectivo".

Trabajo dirigido por: Dr. Leopoldo Portillo Gómez.

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 21 Agosto del 2001

REVISOR

Dr. Hugo Castañeda Vázquez

M. en C. Angélica Luis Juan Morales

M en C. Ricardo Alaniz de la O

Dr. Jacinto Bañuelos Pineda

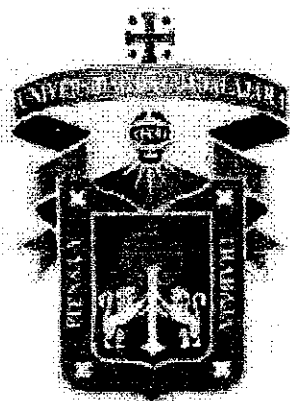
Dr. Leopoldo Portillo Gómez

c.c.p. Archivo

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS

POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS

División de Ciencias Veterinarias
Departamento de Medicina Veterinaria



**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE TUBERCULOSIS BOVINA
POR LA PRUEBA DE TUBERCULINA, MEDIANTE LA IDENTIFICACIÓN DE LAS
LESIONES HISTOLÓGICAS, USANDO COMO REFERENTE LA REACCIÓN EN
CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), ESTUDIO PROSPECTIVO”.**

**TESIS
PRESENTADA POR:**

JOSÉ LUIS DE LA TORRE COVARRUBIAS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS**

Tutor:

Dr. Leopoldo Portillo Gómez

Asesores:

M. C. Luis Villa Manzanares

Dr. Efraín Pérez Torres

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Agosto del 2001

DEDICATORIA

A mi esposa: María de Lourdes Macias Pérez

A mis hijos: Luis Alejandro

Alan Eduardo

Que siempre me apoyaron en todo momento en especial en aquellos donde los escollos a los que me enfrente parecían infranqueables, a mi esposa por su cariño y entereza la cual me dio fortaleza y deseos de continuar hasta finalizar el posgrado, a mis hijos, los que cada vez que contemplaba sus caritas inocentes, me proporcionaron la tranquilidad necesaria para reconocer que las dificultades con las que me encontré tenían solución, a ellos todo mi cariño y agradecimiento.

A mi mamá: Eulogia Covarrubias Monroy

A mis hermanos: Beto, Paco y Miguel

A mis sobrinos: Beto, Edgar y Omar

Por su cariño y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor de Tesis: Dr. Leopoldo Portillo Gómez

Por la ayuda y colaboración sin condiciones que me otorgó e hicieron posible la culminación de esta tesis, pero principalmente por su amistad y consejos siempre oportunos.

A los MVZ: Alejandro Lupercio A.
 Y
 Javier Borja Contreras

Mis amigos los cuales sin su ayuda, este trabajo de investigación no habría sido posible de realizar.

A todos los que intervinieron e hicieron posible la culminación de este trabajo de investigación.

A las Instituciones colaboradoras:

Asociación Ganadera de Tepatitlán de Morelos

Laboratorio de Salud Animal de Tlaquepaque

Sección de Laboratorio de Tuberculosis

de la

Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

S. A. G. A. R. P. A.

Comisión Estatal para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina

C. O. E. E. T. B.

Laboratorio de Investigación en Microbiología Médica

del Laboratorio de Microbiología y Parasitología

del Departamento de Patología

C. U. C. S.

Universidad de Guadalajara

Departamento de Medicina Veterinaria

de la División de Ciencias Veterinarias

C. U. C. B. A.

Universidad de Guadalajara

Fe de erratas:

En la pagina 51 se presenta un cuadro con el número 9

Debería de ser el número 3

CONTENIDO

	páginas
Lista de Abreviaturas.....	iii
1.0 Resumen.....	iv
2.0. Introducción.....	1
2.1 Antecedentes.....	1
2.2 Características del microorganismo.....	1
2.3 Inmunología y Patogénia.....	3
2.4 Epidemiología.....	5
2.5 Diagnóstico y Control.....	14
3.0. Planteamiento del Problema.....	20
4.0. Justificación	21
5.0. Hipótesis.....	23
6.0. Objetivos.....	24
6.1 General.....	24
6.2 Particulares.....	24
7.0. Material y Métodos.....	25
7.1. Recursos.....	25
7.2. Procedimiento.....	25
7.2.1. Prueba de Intradermoreacción.....	26
7.2.2. Inspección al Sacrificio.....	27
7.2.3. Estudio Histopatológico.....	28

7.2.4. Estudio Bacteriológico.....	29
7.2.4.1. Descontaminación.....	29
7.2.4.2. Cultivo Bacteriológico e Identificación.....	31
7.2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	32
7.2.5.1. Extracción de DNA.....	32
7.2.5.2. Identificación de <i>M. bovis</i> por PCR.....	32
7.2.6. Estudio Estadístico.....	34
8.0. Resultados.....	35
8.1. Prueba de Intradermoreacción.....	35
8.2 Estudio Histopatológico.....	39
8.3 Estudio Bacteriológico. Aislamiento e Identificación.....	46
8.4 Identificación de <i>M. bovis</i> por PCR.....	48
9.0. Discusión.....	52
10.0. Conclusiones.....	55
11.0. Bibliografía.....	57
12.0. Anexos.....	64
12.0.1. Descontaminación.....	64
12.0.2. Bacteriológico.....	66
12.0.3. Tipificación Bioquímica.....	70
12.0.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calment Guérin
CANETB	Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina
cDNA	secuencia de Ácido Desoxiribonucleico
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTPs	deoxinucleótido trifosfato
dsDNA	hélice doble de Ácido Desoxiribonucleico
H y E	Hematoxilina y Eosina
MCF	Factor Quimiotáctico de Macrófagos
MDRTB	Tuberculosis Multirresistente a las Drogas
MF	Factor Mitógeno
MIF	Factor Inhibidor de Migración
N\$	Nuevos pesos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPD	Derivado Proteico Purificado
PRONABIVE	Productora Nacional de Biológicos Veterinarios
RFLP	Polimorfismo de extension de fragmentos por restricción
SAGARPA	Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
ssDNA	hélice sencilla de Ácido Desoxiribonucleico
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculosis

1.0. RESUMEN

La Tuberculosis, es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, y es la primer causa de muerte debido a un solo agente infeccioso en la mayoría de los adultos en el mundo, esta enfermedad es producida en humanos por el *M. tuberculosis* y en bovinos así como en otros mamíferos por el *M. bovis*. El género *Mycobacterium* está formado por bacterias de forma bacilar difícil de colorear, pero ya que se tiñen resisten la decoloración por los ácidos o por el alcohol, por lo que reciben el nombre de “bacilos alcohol ácido resistentes” (BAAR). El género comprende a organismos patógenos obligados como al *M. tuberculosis* y *M. bovis* que causan enfermedades crónicas con lesiones del tipo granulomatoso. Los objetivos del presente trabajo fueron los de evaluar la eficacia diagnóstica de tuberculosis por *M. bovis* mediante la conjunción de las pruebas de tuberculina en el pliegue caudal, el estudio histológico en bovinos sin antecedentes previos a este padecimiento y el estudio bacteriológico en cultivo Stonebrink y su certificación por pruebas bioquímicas y por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Las pruebas de tuberculina e histopatológica en su conjunto presentaron una sensibilidad del 89% y una especificidad del 98%, mientras que la prevalencia obtenida fue del 0.12. Los corrimientos de PCR realizados en 60 muestras, 55 de ellos presentaron un producto de 270 pbs por lo que se les califico como positivos, y en los 5 restantes no y se consideraron negativos, obteniéndose una frecuencia de 92% y de 8% respectivamente. El análisis estadístico utilizando X^2 demostró una asociación significativa entre la prueba de tuberculina y el estudio histológico de las muestras ($p > 0.05$), sin embargo, no hubo asociación estadística entre la prueba de intradermorreacción caudal o de tuberculina y la de PCR ($p < 0.05$).

2.0. INTRODUCCIÓN

2.1. Antecedentes:

La tuberculosis, es una de las enfermedades infecciosas con mayor distribución mundial, es la primer causa de muerte debido a un sólo agente infeccioso, *Mycobacterium tuberculosis* es la causa más común de tuberculosis en humanos, pero una proporción de casos desconocida es debido a *M. bovis* (13).

Cuando Roberto Koch descubrió el bacilo de la tuberculosis en el año de 1882, pensó que la tuberculosis bovina y humana era causada por el mismo organismo, declarando que "una de las vías de transmisión, y ciertamente la más importante, es la inhalación de aerosoles con el bacilo tuberculoso; otro es la tuberculosis en animales domésticos, principalmente en los bovinos." Esta aseveración provocó un incremento en el interés de la prevención de la infección por medio de la inspección de carnes y tratamientos por calor (pasteurización) de la leche, y varios artículos fueron escritos al respecto, además, diversas consideraciones fueron hechas para la posibilidad de la eliminación de las vías de transmisión de la enfermedad, principalmente por Bang en Dinamarca y Von Ostertag en Alemania. Posteriormente, Koch cambia su opinión después de detalladas descripciones de pequeñas, pero importantes diferencias entre el bacilo de origen humano y el bovino (13).

2.2. Características del microorganismo:

La nomenclatura de los agentes causales de tuberculosis en humanos y mamíferos, a seguido un camino de confusión, por más de un siglo hasta nuestros días, tomando como base las características bacteriológicas de las bacterias para su diferenciación en 1970 se propuso la separación taxonomónica de los agentes causales del padecimiento en humanos al *Mycobacterium tuberculoso* y en los bovinos y algunos mamíferos al complejo del *Mycobacterium bovis* que incluye al

BCG y al *M. africanum* (14, 17), sin embargo otra propuesta taxonómica a partir de la tipificación molecular reemplazaría esta última clasificación y alteraría la definición de *M. bovis* y otras cepas, denominando por lo tanto un solo complejo el del *Mycobacterium tuberculosis* que incluiría al *M. tuberculosis* clásica, a su variación asiática, *M. africanum* tipo I y II, al *M. bovis* clásico y al BCG (14).

Las especies del género *Mycobacterium* son de forma bacilar y difícil de colorear, pero ya que se tiñen resisten la decoloración por los ácidos o por el alcohol, por lo que reciben el nombre de "bacilos alcohol ácido resistentes" (BAAR). Además de muchas formas saprofitas, el grupo comprende a organismos patógenos como el *M. tuberculosis* y *M. bovis* que causan enfermedades crónicas con lesiones del tipo granulomatoso. El *M. bovis* se presenta en forma de bacilos rectos y delgados, midiendo entre 0.2–0.6 μm de ancho y 1.0–10 μm de largo, es un bacilo relativamente corto cuando se observa en frotis de tejidos y moderadamente largo, delgado y formando cordones en preparaciones de medios de cultivo (18, 31, 35).

Las paredes de dichos bacilos pueden inducir hipersensibilidad retardada principalmente en animales previamente sensibilizados, ya que su contenido de lípidos de cerca del 60% del peso total de la pared, es responsable de propiedades como la ácido resistencia, hidrofobicidad en medio líquido, crecimiento lento, resistencia a desinfectantes, y a la desecación. Las fracciones de fosfátidos que contiene son capaces de inducir respuestas granulomatosas y necrosis caseificantes, intervienen directamente en la virulencia y en la respuesta inmune a la infección, aseguran la supervivencia del microorganismo y garantizan su fagocitosis por los neutrófilos y macrófagos, posee propiedades leucotóxicas e inhibe el quimiotaxis de leucocitos, afecta al retículo endoplásmico rugoso provocando daño mitocondrial a la célula (18, 31, 35).

Los ácidos grasos que constituyen parte de la envoltura celular son clasificados como; saturados normales, insaturados, con cadenas ramificadas, micólicos, entre los que se encuentra el 6,6-dimicolato de trehalosa o factor de

cordón, este se localiza en la capa externa de la pared bacteriana, otros ácidos grasos que posee son la cera D, los aciloaminoácidos, el ftiocerol, como el dimicosato de ftiocerol, el cual tiene un papel básico en la protección bacteriana, los fosfolípidos y sulfátidos, de estos dos grupos destacan el difosfatidil glicerol o cardiolipina y el fosfatidil inositol manósido, el cual impide la digestión de las micobacterias dentro del macrófago. Los polisacáridos que muestran una capacidad antigénica son el D-arabino-D-galactano, el D-arabino-D-manano y D-glucano los cuales son componentes de la pared celular, las proteínas que presenta esta estructura tienen un papel más importante como inmunogénicos, destacando los siguientes antígenos; 5, 6 a y b, y la proteína MPB70 (10,31, 35).

2.3. Inmunología y Patogénia:

Las micobacterias son capaces de inducir en el organismo afectado respuestas inmunes humorales y celulares, los antígenos que las producen son del tipo soluble, principalmente de origen citoplasmático, los que se clasifican en cuatro grupos; 1) Antígenos comunes a todas las micobacterias y géneros bacterianos afines; 2) Antígenos restringidos a las micobacterias de crecimiento lento; 3) Antígenos presentes en micobacterias de crecimiento rápido y en los géneros de *Nocardia* y *Corynebacterium*; 4) Antígenos específicos de especie. La función de cada componente de la pared celular en la patogénesis todavía no se ha definido, la pared celular está compuesta de tres moléculas covalentes adheridas, peptidoglicano, arabinoglicano y ácido micólico (31,35).

Complejos de glicolípidos y lípidos en la pared del bacilo de la tuberculosis, y otros componentes de la pared celular de especies de *Mycobacterium* virulentas o atenuadas, intervienen en la formación del granuloma. La trehalosa -6,6'dimicolato inhibe la quimiotaxis, induce la desintegración del retículo endoplasmico rugoso y la separación de los ribosomas de las células. Además de ser leucotóxicos, los glicolípidos que contienen sulfuros promueven la supervivencia de los bacilos virulentos dentro de los macrófagos inhibiendo la formación de fago-lisosomas y

evitan la exposición de enzimas hidrolíticas presentes en el lisosoma. Los sulfolípidos inducen también cambios en la función fagocítica de la célula ocasionando una disminución en la habilidad de los fagocitos para responder eficientemente contra el *M. bovis* (31,35).

El ganado bovino se infecta con más frecuencia por vía aerógena que por la vía digestiva (12,31), considerándose que cerca del 90% de los bovinos afectados por tuberculosis fueron por la vía respiratoria. El bacilo es comúnmente excretado en la atmósfera por los aerosoles de secreciones pulmonares de animales que sufren la tuberculosis pulmonar, las gotitas de aerosol se secan rápidamente, dejando los núcleos de las mismas, algunos conteniendo bacilos, las gotas grandes caen al suelo, pero aquellas que se encuentran en un rango de 1 a 10 μm permanecen flotando en el aire por un período considerable de tiempo, dependiendo de las condiciones ambientales, el núcleo de la gota de los aerosoles del rango antes mencionado al ser inhalado puede alcanzar los bronquios terminales y alvéolos considerando que su tamaño es de 20 μm cuando es inhalado, las partículas mayores a las 10 μm son atrapadas en el aparato respiratorio superior por la acción combinada de distintas barreras mecánicas, como en el caso de los cilios epiteliales, el cual en cooperación con el moco que tapiza todo el árbol bronquial, impide el ingreso de los bacilos (10, 31, 38, 39).

Al diseminarse en el organismo, el *Mycobacterium bovis* a partir de una primoinfección, puede ocasionar enfermedad en cualquier tipo de tejido del bovino, pero con especial predilección por el tejido pulmonar ya que hay una relación directa de requerimiento de oxígeno molecular para su crecimiento, además de que la multiplicación de los organismos en tejido pulmonar es más rápido que en otros tejidos, cuando hay un número significativo de bacilos aparece un proceso exudativo celular inflamatorio (10, 31, 38, 39).

La destrucción celular y la necrosis son bastante reducidas, la lesión elemental consiste en una pequeña zona de material necrótico que contiene microorganismos

vivos y muertos, en esta ubicación inicial y debida a la incapacidad para detener la infección, las micobacterias fagocitadas por los macrófagos en los alvéolos son drenadas hasta los nódulos linfáticos mediastínicos y torácicos, donde se desarrollará la adenopatía y la lesión satélite adoptará la misma característica que la desarrollada en el pulmón (10, 31, 38, 39).

Paralelamente a este proceso, una vez transcurridos de 10 a 15 días desde la infección, se produce un fenómeno de hipersensibilidad de tipo IV, los macrófagos que eran incapaces de destruir a los bacilos, experimentan transformaciones tanto funcionales como morfológicas evolucionando hasta células epitelioides y de Langhans, siendo entonces capaces de producir una intensa acción fagocítica e hidrolítica (10, 31, 38, 39).

Esta respuesta inmune es mediada por los linfocitos que al liberar las linfocinas, atraen, inmovilizan y activan a las células mononucleares en los lugares donde se encuentran las micobacterias o sus productos, mediante la liberación del "Factor Quimiotáctico de Macrófagos" (MCF), el "Factor Inhibidor de Migración" (MIF), y el "Factor Mitógeno" (MF), los cuales determinan la infiltración, activación y división celular respectivamente (10, 31, 38, 39).

Dando como resultado la formación del granuloma, que una vez desarrollado estará formado por una zona necrótica central con o sin presencia de caseificación, rodeada por células epitelioides alternadas con células gigantes, rodeados a su vez por linfocitos así como de un importante encapsulamiento conectivo, formando así la estructura típica nodulogranulomatosa de la tuberculosis, la cual alcanza un tamaño macroscópico distintivo y se le llama tubérculo (10, 31, 38, 39).

2.4. Epidemiología:

Los humanos son infectados por los animales, especialmente los bovinos, pero también por otros animales domésticos por medio de los productos de leche y carne, incluyendo en ellos a las cabras, venados, búfalos, ovejas y camellos (6, 21).

En países donde la tuberculosis bovina no está controlada, la mayoría de los casos de tuberculosis en humanos, ocurren en personas jóvenes y es el resultado de beber o manipular leche contaminada; linfadenopatías cervicales, lesiones intestinales, tuberculosis epitelial crónica y otras formas no pulmonares son particularmente comunes (6, 21).

Poco se sabe de la frecuencia por la cual *M. bovis* causa tuberculosis no pulmonar en las naciones en desarrollo, esto se debe a las limitaciones de los laboratorios para cultivar y tipificar al bacilo de la tuberculosis (6, 13).

En estudios de información sanitaria de los años de 1935 a 1945, efectuados en Suecia buscando la relación entre la tuberculosis animal y la tuberculosis humana, vinculando la infección animal con la morbilidad y mortalidad humanas, la correlación con la mortalidad fue negativa y altamente significativa, o sea condados con poca tuberculosis animal tenían una mortalidad humana elevada (34).

Se ha encontrado que el nivel del riesgo de infección en el hombre estaba relacionado con la prevalencia de infección tuberculosa en el ganado por TB bovina, variando desde 3.4 % en 1935, a los 15 años de edad, en condados con menos del 2 % de ganado infectado hasta el 5.8% en condados con el 20% de bovinos afectados o aun más, sin embargo, la tendencia descendente del riesgo de infección en el tiempo no se le encontró asociada con la prevalencia de la infección en el hombre. Cuando se tomaron en cuenta en los condados las variaciones de factores ambientales de la capital, zonas urbanas y zonas superpobladas, se observó una correlación fuertemente positiva entre la prevalencia del ganado infectado y el riesgo de la infección tuberculosa en el hombre, pero las correlaciones con la morbilidad y mortalidad tuberculosas, aunque negativas, eran más débiles (34).

La proporción de casos de la enfermedad en humanos causada por *M. bovis* presenta considerables variaciones regionales las que dependen de la presencia y extensión de la enfermedad en la población bovina, la situación económica y social, la higiene de los alimentos y la aplicación de medidas preventivas. En los Estados Unidos sólo el 0.1% de la tuberculosis humana es debido a *M. bovis*, un nivel similar al de otros países donde la tuberculosis bovina a sido virtualmente erradicada, pero la proporción se incrementa hasta un 3% cerca de la frontera con México donde los casos del padecimiento en los bovinos continua ampliamente distribuido (21).

En general, la incidencia de infección por *M. bovis* en humanos es alta en áreas rurales donde los hatos bovinos están infectados. Investigaciones de veterinarios trabajando con hatos que presentan altos niveles de positividad a la tuberculina 45.4% y tuberculosis publica 4.1%, las diferencias en la presentación clínica de la enfermedad en humanos debido a *M. bovis* esta relacionada a la ruta de transmisión por los animales, la cual puede ser por exposición directa, o indirectamente por ingestión de leche contaminada o productos carnicos (21).

En regiones donde la TB bovina fue hace mucho eliminada, unos pocos casos residuales ocurrieron en su mayoría en personas como resultado de la reactivación de lesiones dérmicas, estos fueron poco menos del 1% de todos los casos, la vigilancia sanitaria en los Estados Unidos, Scandinavia y el Sur de Inglaterra detectaron aproximadamente a la mitad de estos casos de infección postprimaria los que tuvieron presentación pulmonar, una cuarta parte de ellos involucró el tracto gastrointestinal y el resto a sitios no pulmonares, principalmente nódulos linfáticos, en algunas regiones, aproximadamente el 10% de los casos causados por *M. tuberculosis* presentan lesiones extrapulmonares (6).

La información de la enfermedad en humanos debido a *M. bovis* en países desarrollados y en vías de desarrollo es escasa, de la revisión de un número de estudios de casos de zoonosis de tuberculosis, publicados entre 1954 a 1970 y

obtenidos en varios países alrededor del mundo, se estimó que la proporción de casos humanos debido a *M. bovis* fue del 3.1% de todas las formas de tuberculosis; 2.1% de las formas pulmonares y 9.4% de las formas extrapulmonares (6).

En 1995, 3.3 millones de casos fueron reportados al Programa Global de Tuberculosis de la Organización Mundial de la Salud, donde el número fue mayor a los 8.8 millones. De los casos reportados, el 62% ocurrió en el Sureste Asiático y en las regiones del Pacífico Occidental, el 16% en el sur del Sahara Africano, y del 7 al 8% en las regiones de América, Mediterráneo Oriental y Europa, en diversos países, especialmente aquellos con escasos recursos, presentan limitaciones para reportar todos los casos de tuberculosis, debido a dificultades en la identificación de los casos sospechosos, al establecimiento de un diagnóstico certero y a la notificación de los mismos (5).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la incidencia mundial de tuberculosis se incrementará hasta 10.2 millones de casos para el presente año, un incremento del 36% con respecto a 1990. El Sureste Asiático, las regiones del Pacífico Occidental y el sur del Sahara Africano contaron con el 81% de los casos, de 1990 a 1999 debido a la ausencia de controles efectivos, la incidencia mundial y las muertes alcanzaron los 88 millones y 30 millones respectivamente, el 70% de los casos nuevos ocurrió en pacientes de entre 15 a 59 años de edad, el segmento de la población más productiva económicamente (5).

Para el año 2000, se ha estimado que 3.5 millones de personas morirán por tuberculosis anualmente, representando un incremento del 39% con respecto a 1990, sólo en el Sureste Asiático, se estima que ocurrirán 1.4 millones de muertes cada año (5).

La situación de la tuberculosis en la población de bovinos en 37 países de América Latina y el Caribe se presenta en la tabla 1 (45)

Tabla 1. Distribución de TB bovina en América y el Caribe.

Sub. Región o País	Países		Población bovina (en miles)			
	No. Total	*No. (%) o muy baja prevalencia	Libres	Total	Libre o muy baja prevalencia	%
El Caribe	17	15 ¹	(88.2)	9139	5449	(59.6)
América Central	7	5 ²	(71.4)	10557	7305	(69.2)
México	1	-	-	32054	26300**	(82.0)
América del Sur	12	4 ³	(33.3)	270000	44485	(16.5)
Total	37	24	(64.9)	321750	83569	(26.0)

* Menos del 0.5% de reactores en los bovinos tuberculizados

** Bovinos de Carne en los estados del norte de México.

¹ Antigua, Bahamas, Barbados, Bermudas, Islas Vírgenes Británicas, Cuba, Dominicana, Granada, Guadalupe, Jamaica, Montserrat, Santa Lucía, San Vicente, Granadinas y Trinidad y Tobago.

² Belice, Costa Rica, Honduras, Nicaragua y Panamá.

³ Colombia, Surinam, Uruguay y Venezuela.

México tiene 26.3 millones de cabezas de ganado de carne, 2.2 millones de doble propósito y 925 000 cabezas de bovinos especializados en la producción de leche, con un total de 7 250 millones de litros de leche producidos en 1993, donde el 41% del total fue vendido a través de canales informales (leche bronca), sólo el 20% fue pasteurizada y el 39% restante fue convertido en productos lácteos, a pesar de esto, México presenta un déficit de 12 millones de litros de leche por día, con la consecuente importación de leche a un alto costo de 371 millones de dólares en

1992. La industria de la ganadería estabulada representa para el país, el 33% de la producción agropecuaria nacional y el 2.5% del producto nacional bruto (45).

La exportación de bovinos representa un ingreso de 450 millones de dólares, en donde la presencia de tuberculosis bovina tendría diferentes consecuencias, principalmente para los estados exportadores, por lo que la tuberculosis bovina puede provocar una disminución en la producción animal superior al 17%. Sin embargo, las pérdidas serían más significantes en los términos de pérdida de peso de los animales y en la producción de carne y leche, el consumidor en el país debería de hervir la leche antes de su consumo, desafortunadamente, el consumo en la población humana de quesos frescos es muy común, durante los años de 1991 y 1992, 15,210 casos de tuberculosis humana fueron reportados y es posible que la cifra real fuera mayor del 30%, se ha estimado que del 5% al 8% de los casos de tuberculosis humana son debido a *M. bovis* y el resto a *M. tuberculosis* (45).

En México, la campaña nacional para la erradicación de la tuberculosis bovina se inició en 1971. Durante 1971 a 1994, la vigilancia de TB en ganado bovino se llevó a cabo principalmente mediante la aplicación de la prueba de intradermoreacción (tuberculinización) utilizando como antígeno el derivado proteico purificado bovino (PPD bovino) e inspección *post mortem* en rastros, en ese período, sin embargo, los laboratorios veterinarios en los estados de la República Mexicana no estaban preparados para llevar a cabo el diagnóstico de *M. bovis*, la falta de instalaciones de bioseguridad y presupuesto restringido fueron algunos factores que limitaron el diagnóstico por los laboratorios de salud animal de la TB bovina como un procedimiento de rutina (42).

La exportación de novillos en pie a Estados Unidos por México, a preocupado a las autoridades de salud en ambas naciones, y se ha enfatizado a partir del año de 1982 cuando el porcentaje de casos de TB detectado en rastros en el primero de los países citados, asociados al ganado bovino de origen mexicano y se incrementó de 32% en 1978 a 96% en 1982. El estado de Texas es el mercado de exportación

principal de ganado bovino de México, desde 1990, más de un millón de cabezas de dichos animales han sido exportadas anualmente al citado país, de las cuales el 80% tienen como destino final este estado (42).

Durante 1992 y 1993 el costo del programa de erradicación fue de 15 millones de dólares; sin embargo, durante el mismo período 1.3 millones de cabezas fueron exportadas con un valor de 578 millones de dólares, esto representó el noveno lugar de las exportaciones no petroleras (45).

A excepción de algunos estados del norte de la república, México es considerado por la OMS como un país endémico de tuberculosis, con una prevalencia superior al 0.5%, lo que implica un riesgo alto de animales enfermos si se considera que la población bovina productora de leche y de doble propósito es de aproximadamente de 3 millones de cabezas (45). Las pérdidas económicas ocasionadas por la tuberculosis son muy altas, ya que tan sólo en cuanto a la producción de leche en el año de 1993 fueron de 73'214,641 N\$, en la producción de carne 33'592,420 N\$ y por decomiso de canal fue de 24'231,683 N\$ (40).

La Comisión Mexicana para el Control y Erradicación de la Tuberculosis bovina y Brucelosis bovina fue establecida en septiembre de 1993 y principalmente opera en los estados del norte fronterizos con Estados Unidos, en México a partir de ese año se adoptó un sistema nacional de identificación animal mediante el uso de un arete azul con una serie numérica que identifica el estado de origen en ganado bovino exportado a los Estados Unidos. Además, autoridades sanitarias de ambos países prohibieron la exportación de ganado Holstein al vecino país del norte, porque aproximadamente el 67% de los animales importados e infectados eran de la raza antes citada. Desde 1992, la prevalencia de TB por cada 1,000 animales importados en el mencionado país ha bajado significativamente desde 0.5 en 1992 a 0.1 en 1996, en Texas, el número de casos de TB en novillos gordos ha disminuido desde 347 casos en 1993 a 112 en 1996 (42).

En México durante 1994, se realizaron 2.4 millones de pruebas de tuberculina y 4,259 (0.17%) se encontraron positivos a la misma, la prevalencia de tuberculosis bovina fue de 0.5% (148,196 cabezas muestreadas), de acuerdo al mismo reporte, de todos los bovinos sacrificados con lesiones de tuberculosis encontradas en rastros de Estados Unidos, el porcentaje de bovinos de origen mexicano fue de 62% en 1989, 66% en 1990, 77% en 1991, 81% en 1992, 84% en 1993 y el 57% en 1994, además en este último año, 1,848 explotaciones fueron declaradas libres de tuberculosis bovina, con un total de 468,293 cabezas de ganado, lo que representó un incremento del 452% en explotaciones certificadas con respecto al año de 1993 (42, 45).

Una vez que el gobierno mexicano creó la Comisión Nacional para la Erradicación de Tuberculosis Bovina y Brucelosis, inició la integración de laboratorios regionales dirigidos al diagnóstico de ambas enfermedades en Sonora, Durango, Nuevo León, Jalisco, Yucatán y Baja California. En este último estado, en 1995 se efectuó un estudio de detección de lesiones tuberculosas en los bovinos sacrificados en 5 rastros que contaban con inspección federal o municipal en el estado, del cual, un total de 335 bovinos lecheros y 170 bovinos de carne fueron detectados con lesiones tuberculosas durante el examen *post mortem*, la proporción de TB bovina fue significativamente mayor en ganado lechero que en ganado de carne; 202 (2.02%) de 10,000 bovinos lecheros y 46 (0.02%) de 190,000 bovinos de carne fueron clasificados positivos a tuberculosis, dichos casos fueron detectados más frecuentemente en nódulos linfáticos de la cabeza en ganado lechero (62%) y ganado de carne (49%) (20).

La prevalencia de casos de TB bovina por envío de muestras para su diagnóstico en laboratorio se incrementó de 49% en 1995 a 76% en 1996 por lo que la tasa de envíos de muestras con lesiones granulomatosas (rastro-laboratorio) fue 2.4 veces mayor en 1996 que en 1995 (16, 20).

En 1996 un total de 65,233 animales fueron exportados al estado de Texas y examinados en rastro para la detección de lesiones granulomatosas y diagnóstico de *M. bovis*, la prevalencia encontrada en estos bovinos fue de 0.5 por 1000 (42).

En ese mismo año (1996), en Jalisco se diagnosticaron un total de 61 bovinos positivos a tuberculosis bovina, ocupando un primer lugar a escala nacional en la emisión de dicho diagnóstico, el cual fue compartido con el estado de Sinaloa (32).

En México el esfuerzo para controlar y erradicar la tuberculosis bovina se basan en la prueba de intradermorreacción ó de tuberculina, esta prueba se caracteriza por tener una alta especificidad y una baja sensibilidad, dicha prueba tiene como limitante el no poder detectar animales positivos si se encuentran con afecciones que causen inmunosupresión o si el número de linfocitos capacitados contra la infección por *M. bovis* son escasos, lo que ocasiona una anergia, obteniéndose por lo tanto diagnósticos negativos a la interpretación de la prueba (21).

La sensibilidad y especificidad de las pruebas de tuberculina reconocidas por la OMS se puede apreciar en la tabla 2 (45).

Tabla 2. Sensibilidad y Especificidad de las pruebas de Tuberculina

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
CAUDAL	0.75 – 0.82	0.96 – 0.99
CERVICAL SIMPLE	0.86 – 0.96	0.70 – 0.76
COMPARATIVA	0.72 – 0.78	0.92 – 0.99

Los animales positivos a la prueba de intradermorreacción son enviados a sacrificio y en el rastro se confirma el diagnóstico mediante la identificación de las lesiones anatomopatológicas características de TB bovina, la cual resulta en ocasiones ser una medida poco efectiva. En Australia, en 1990, con un promedio de 20 a 22 canales de bovinos sacrificados e inspeccionados por hora, se revisaron un total de 245 canales, y se encontraron con que el 8.9% de ellas fueron positivas por presentar lesiones microscópicas sugerentes a TB bovina, al hacer un muestreo a la totalidad de las canales inspeccionadas (245) y confirmarse el diagnóstico en el laboratorio por medio de la histopatología se obtuvo un 47% de bovinos con lesiones tuberculosas microscópicas que no fueron detectadas por el inspector en el rastro (4, 41).

En nuestro país no hay antecedentes similares que puedan probar la eficacia del diagnóstico de tuberculosis post-mortem en los rastros de bovinos, pero el número de bovinos que son sacrificados y al ser inspeccionados por el médico veterinario en el mismo lapso de tiempo anteriormente mencionado es mucho más elevado, lo que puede ocasionar una mayor deficiencia en el diagnóstico en la canal de la tuberculosis bovina en animales de abasto.

2.5. Diagnóstico y Control:

En los esfuerzos por controlar el padecimiento, se a utilizado incluso los recursos de la medicina natural, estudios de la capacidad antimicobacteriana de los compuestos de la planta *Oplopanax horridus*, presentaron actividad contra *M. tuberculosis* y *M. avium* resistentes a isoniacida usando un disco de difusión "in vitro". Se encontró que el extracto metabólico MeOH, el CH₂Cl₂ y todos los compuestos aislados fueron activos en concentraciones de 10µg/disco, pero solo dos compuestos de ellos fueron capaces de inhibir el crecimiento del *Mycobacterium* en discos con concentraciones de 20µg /disco (15). Sin embargo, futuras complicaciones se presentaran en el esfuerzo por controlar la emergencia de la amplia distribución de tuberculosis resistente a múltiples drogas (MDRTB), especialmente en el escenario

institucional, recientes brotes de MDRTB se caracterizan por niveles de mortalidad del 50 al 80% y con periodos de solo 4–16 semanas del diagnóstico a la muerte (33).

En un estudio efectuado en 68 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de Estados Unidos, Corea y México se obtuvo el siguiente resultado; los mecanismos moleculares de resistencia a la estreptomina, rifampicina y isoniazida en 53 aislamientos clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* fueron examinadas, 25 de 44 cepas resistentes a estreptomina tuvieron mutaciones en el gen *rpsL* y 5 de estos tuvieron alteraciones en el gen *rrs*, la región del gen *rpoB*, el cual está asociado con la resistencia a la rifampicina, fue alterado en 28 de 29 cepas resistentes a dicha droga. Mutaciones en marcadores genéticos de resistencia a isoniazida fueron detectadas en 25 de 42 aislamientos resistentes a isoniazida; 20 cepas tuvieron alteraciones en el gen *katG* y 5 tuvieron alteraciones en el operon *inhA*, de las 20 cepas multiresistentes con sensibilidad reducida a estreptomina, rifampicina y isoniazida, 11 tuvieron mutaciones en marcadores asociados con resistencia a cada uno de estas tres drogas (33).

Ante el problema de tener un adecuado diagnóstico de TB bovina en el animal en pie en las explotaciones pecuarias, así como en el rastro y evitar o disminuir el riesgo existente de contaminación de la citada enfermedad en las poblaciones animales antes mencionados y en los alimentos producidos o obtenidos de ellos, los cuales implicarían un potencial mecanismo de diseminación a la población humana, se ha desarrollado una gran cantidad de pruebas para su diagnóstico, desde la clásica prueba de tuberculina, que en los bovinos es fácil de aplicar en gran escala en animales estabulados, pero con el inconveniente de tener un amplio intervalo de sensibilidad y especificidad, nuevas pruebas diagnósticas se han desarrollado. Sin embargo, esta simple y clásica prueba continua siendo de primera elección (44).

Otro método diagnóstico de elección es la inspección post-mortem; la confirmación del diagnóstico es por medio de un cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas, considerando el hecho de que el mencionado cultivo es altamente

específico, pero en la mayoría de los casos es realizado después de que el animal fue sacrificado, el bacteriológico necesita de medios de cultivo específicos para el crecimiento de dichas bacterias, así como de personal especializado y adecuadas condiciones de laboratorio, su desventaja principal es la gran cantidad de tiempo que requiere para su aislamiento e identificación (44).

Las prueba de proliferación de linfocitos, las cuales no son usadas como de rutina para el diagnóstico ya que necesitan mucho tiempo con complicados procedimientos logísticos y laboratoriales (44).

Las pruebas serológicas como es el ensayo inmuno enzimático (ELISA), esta prueba parece ser más bien un complemento que una alternativa ya que esta basada en la inmunidad celular, pero puede ser muy útil en bovinos anérgicos, sin embargo su sensibilidad y especificidad necesitan ser probadas (44).

La prueba de interferón gama, mide la liberación de linfocinas en medios de sangre completa, la ventaja sobre las pruebas epiteliales es que el animal sólo necesita ser muestreada una vez, pero su desventaja principal es su alto costo y el hecho de que las muestras deben ser procesadas antes de las ocho horas de su colección (44).

Los métodos de biología molecular para la detección de secuencias blanco de DNA específicas como lo es la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), estas pueden ser usada para detectar ó diferenciar especies del género *Mycobacterium*. La prueba de polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) puede ser una herramienta epidemiológica muy útil en los estudios de transmisión de *M. tuberculosis* y *M. bovis* entre animales y humanos, sin embargo la importancia de estas pruebas de PCR y RFLP, es su capacidad de diferenciar entre las cepas del complejo *M. tuberculosis*, por lo que se reconoce la importancia de la contribución de las técnicas moleculares en los estudios epidemiológicos y de investigación de las rutas de infección (44).

La técnica de PCR puede ser eficientemente aplicada para el diagnóstico de tuberculosis, la aplicación rutinaria de la PCR requiere que la secuencia blanco sea altamente específica para el microorganismo y que este presente en todas las cepas aisladas. (43).

Las pruebas de PCR se basa en la detección de secuencias específicas del ácido desoxiribonucleico (ADN), en 1953, Watson y Crick describieron la estructura del ADN y el papel de esta molécula en contener la información de la reproducción y función celular, este compuesto está formado por cuatro nucleótidos repetidos (algunas veces llamados bases de nucleótidos o simplemente bases); adenina, guanina, citosina y timina, tiene una forma de doble hélice o doble banda (dsDNA) compuesto de dos bandas unidas por enlaces hidrogenados que pueden romperse por calor o por pH altos. Las bandas sencillas de este ácido desoxiribonucleico (ssDNA) son relativamente estables, pero su remoción puede efectuarse por calor o por pH extremo, la molécula de ADN se realinea en la configuración de doble banda, cuando ssDNA están de forma diferente, el proceso de realineación es llamada hibridación (43).

En 1983, un procedimiento simple de amplificar, o incrementar, el número de fragmentos de ácidos nucleicos específicos presentes en una muestra fue desarrollado por Mullis. En 1989 este proceso fue considerado como el "mayor desarrollo científico" del año, este proceso fue llamado como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en pocos años y después de algunos refinamientos, la PCR vino a ser el método más frecuentemente usado para la amplificación de ácidos nucleicos, especialmente DNA (43).

La técnica de PCR esta basado en la reiteración de un proceso de tres pasos; desnaturalización en una banda de DNA, iniciadores de alineación (oligonucleotidos sintéticos específicos) a la ssDNA, y extensión enzimática de los iniciadores complementarios o las placas de ssDNA, después estos se realinean al ADN desnaturalizado, los segmentos de ssDNA se localizaran en las placas para la

reacción de extensión, los nucleótidos, presentes en exceso en la solución, son enzimáticamente unidos para formar la secuencia de cDNA, durante el segundo y subsecuentes ciclos, el segmento original y los cDNA recientemente generados estarán en un sólo template, cada ciclo de PCR, por consiguiente duplicará la cantidad de DNA específico presente (43).

Una amplificación típica de ADN es de 20 a 40 ciclos y resulta con una amplificación de 10^6 veces, el uso de enzimas termoestables como la Taq ADN polimerasa la cual simplifica el proceso antes descrito, es ampliamente aceptada por los laboratorios de investigación (43).

A partir de entonces se empezaron a efectuar diversos estudios utilizando la técnica de PCR, como el realizado por Otal y cols (1991), en el que usaron la secuencia mycobacteriana de inserción *IS6110*, la que demostró estar presente en múltiples copias en el cromosoma de *Mycobacterium tuberculosis*, el análisis *RFLP IS6110* de cepas aisladas de pacientes quienes desarrollaron tuberculosis mostrando una idéntica presentación en un período de 2 a 3 años, en contraste, un alto grado de polimorfismo fue observado entre cepas del complejo de *M. tuberculosis* aislado de diferentes pacientes, este estudio confirmó el uso del *IS6110* como un valioso marcador epidemiológico en tuberculosis (25).

La utilización del *IS6110* no sólo fue con cepas bacteriológicas, sino también se aplicó en muestras biológicas como el esputo, tal es el caso de lo reportado por Nolte y cols (1993), donde el PCR es aplicado como un método de diagnóstico rápido de tuberculosis pulmonar, utilizando como iniciadores los oligonucleotidos TB41 y el TB42, la secuencia *IS6110* fue bien caracterizada y se encontró sólo en el complejo *M. tuberculosis*, mostrando el producto específico de 317 pbs después de la amplificación, y no lo encontraron en cepas de *M. bovis*, *M. africanum*, complejo de *M. avium*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, y *M. gordonae* (23).

Estudios de PCR realizados por investigadores en Argentina para los que utilizaron los amplificadores de pares de bases JB21–JB22, obtuvieron un producto de 500 pb correspondiente al *Mycobacterium bovis*, logrando así su identificación, en 121 cepas bacteriológicas de *M. bovis* identificadas por el uso de pruebas bioquímicas, de dichas muestras, 112 eran originarias de Argentina de diferentes regiones del país, 2 provenían de México y 7 de Colombia, además se incluyeron 4 más aisladas de leones marinos aisladas en Argentina y que fueron identificadas como cepas del grupo de *M. tuberculosis*, este estudio mostró una correlación del 100% (28).

Otros investigadores en España, realizaron trabajos en identificación de *M. tuberculosis* en cepas aisladas de pacientes del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, México D. F. (80 cepas), del Hospital Ramón y Cajal, Madrid, España (31 cepas), de la Universidad de Zaragoza (10 cepas) y las de *M. bovis* provenían de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (10 cepas) y del Hospital Ramón y Cajal (1 cepa), estos aislamientos se realizaron de humanos, bovinos y cabras, el estudio molecular utilizó el iniciador Oxy RMB-1 para la identificación de *M. bovis*, las cuales presentaron un polimorfismo característico con una amplificación de 270 pb, identificándose como cepas de *M. bovis* a través del PCR (22).

Dichas pruebas han demostrado tener una mayor sensibilidad y especificidad, pero a pesar de ello, por sí solas las pruebas no han demostrado ser herramientas eficaces para el diagnóstico, control y posterior erradicación de la TB bovina.

3.0. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México el diagnóstico de la tuberculosis bovina se basa en la prueba de intradermorreacción, lo cual es cuestionable por su eficacia ya que puede presentar reacción falso positiva o falso negativa e incluso anergia; otro método utilizado es la identificación de las lesiones macroscópicas a partir de la inspección en los rastros, actividad que se ve limitada por que sólo podrá detectar las lesiones tuberculosas visibles, y por último el aislamiento bacteriológico del *Mycobacterium bovis*, el cual requiere de personal altamente especializado para seleccionar adecuadamente la muestra y realizar un aislamiento bacteriológico que llevará más de cuatro semanas para obtener el primer crecimiento de las colonias bacterianas y un poco más de tiempo para poder clasificar a esta como *M. bovis*, retardando por lo tanto el inicio de un adecuado programa epidemiológico, ya que no se cuenta actualmente con una serie de técnicas diagnósticas que se conjuguen entre sí para realizar el diagnóstico de la tuberculosis bovina de una manera eficiente, rápida y confiable.

4.0. JUSTIFICACION

La tuberculosis, es una de las enfermedades infecciosas con mayor distribución en el mundo, el *Mycobacterium tuberculosis* es la causa más común de tuberculosis en humanos, pero una proporción de casos desconocida es debido a *M. bovis*. Los humanos son infectados por los animales, especialmente los bovinos, pero también por otros animales domésticos por medio del consumo de los productos de leche y carne, además esta afección presenta considerables pérdidas económicas las que dependen de la presencia y extensión de la enfermedad en la población bovina, la situación económica y social, la higiene de los alimentos y la aplicación de medidas preventivas (3,5,15).

La industria de la ganadería estabulada representa para el país, el 33% de la producción agropecuaria nacional y el 2.5% del producto nacional bruto, con un total de 7,250 millones de litros de leche producidos en 1993, donde el 41% del total es vendido a través de canales informales (leche bronca), el consumo de quesos frescos es muy común, durante los años de 1991 y 1992, 15,210 casos de tuberculosis humana fueron reportados y es posible que la cifra real fuera mayor del 30%, y podría estimarse que del 5% al 8% de los casos de tuberculosis humana son debido a *M. bovis* y el resto a *M. tuberculosis* (34).

En las naciones en desarrollo el diagnóstico de tuberculosis presenta limitaciones en los laboratorios para cultivar y tipificar al bacilo, en México el programa de control de la TB bovina se basa en la prueba de intradermorreacción, la prueba de tuberculina en los bovinos es fácil de aplicar en gran escala en animales estabulados, pero tiene el inconveniente de tener un amplio rango de sensibilidad y especificidad, la confirmación del diagnóstico se realiza por cultivo bacteriológico y pruebas bioquímicas, descontando el hecho de que el citado cultivo es altamente específico, el aislamiento bacteriológico requiere de un gran período de tiempo y en la mayoría de los casos es realizado después de que el animal fue sacrificado. Sin embargo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede ser eficientemente

aplicada para el diagnóstico de tuberculosis, así como para la identificación molecular rápida de las cepas aisladas.

5.0. HIPÓTESIS

La eficacia de la prueba de tuberculina en el diagnóstico de tuberculosis bovina es de una confiabilidad discreta, por lo que el uso de las pruebas combinadas de intradermoreacción e histopatológica, así como en bacteriología y molecular, podrían establecer una asociación diagnóstica confiable de TB bovina en el ganado afectado.

6.0. OBJETIVOS

6.1 GENERAL:

Evaluar la eficacia diagnóstica de la tuberculosis bovina mediante la conjunción de las pruebas de intrademorreacción en el pliegue caudal, estudio histopatológico, bacteriológico y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Identificar los bovinos sospechosos de tuberculosis por medio de la prueba de intradermoreacción en el pliegue anocaudal.
2. Confirmar la positividad de los animales tuberculinizados y sacrificados, por medio de la observación de las lesiones histológicas.
3. Aislar el *Mycobacterium bovis* a partir de muestras obtenidas de bovinos sacrificados en rastro con lesiones sospechosas de tuberculosis.
4. Identificar al *Mycobacterium bovis* a partir de las cepas aisladas, por medio de la utilización de pruebas Bioquímicas.
5. Identificar a nivel molecular al *Mycobacterium bovis* utilizando PCR.

7.0 MATERIAL Y METODOS

7.1 Recursos:

El estudio realizado fue del tipo tecnológico prospectivo, ya que se utilizaron diferentes técnicas diagnósticas establecidas con la finalidad de identificar su eficiencia en conjunto, dicho estudio se realizó en el municipio de Tepatitlán de Morelos del estado de Jalisco donde la población bovina se estima en alrededor de 300,000 semovientes.

Para la realización del muestreo en las explotaciones pecuarias, se contó con el apoyo del equipo de médicos veterinarios de la Asociación Ganadera del municipio arriba citado. El sacrificio de los bovinos reactores positivos se realizó en los rastros municipales de Tepatitlán de Morelos y de Guadalajara.

El aislamiento bacteriológico y el histopatológico se efectuaron en el Laboratorio de Salud Animal de la Secretaría de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en Tlaquepaque, Jalisco, en la sección de tuberculosis. La identificación del *Mycobacterium bovis* a partir de cepas aisladas se realizó en la sección de Biología Molecular del Laboratorio de Microbiología del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) de la Universidad de Guadalajara.

7.2 Procedimiento:

Se muestreo una población de 150 bovinos hembras con características morfológicas similares, las que tuvieron como principal elemento de selección el de ser hembras de raza Holstein o de apariencia externa similar a las hembras de la raza antes mencionada que fueran vacas de primer parto o que contaran con más de 24 meses de edad, lo que las hizo más propicias para tener por lo menos algún encuentro previo con *M. bovis*, no deberían de tener antecedentes previos de

evaluación sanitaria en cuanto a tuberculosis bovina, la selección de animales para este estudio se hizo sobre la base de los criterios antes citados y se contó con la autorización previa de los propietarios, se seleccionaron los animales de manera aleatoria, con lo que se reunió la población de animales necesaria. A esta población se le aplicó la prueba de tuberculina de intradermorreacción en el pliegue caudal, utilizando para ello tuberculina bovina (PPD Bovino, elaborada por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios PRONABIVE), para su interpretación se aplicó el criterio estipulado por la Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina (CANETB) (24).

7.2.1 Prueba de Intradermorreacción:

La tuberculina empleada fue la PPD bovina, elaborada con *M. bovis* cepa AN5, que se utiliza en la prueba caudal como objeto de campaña, dicha tuberculina se conservó y transportó en frío de 4 a 8° C, y protegidas de la luz directa, para su aplicación se utilizan jeringas desechables nuevas de 1 ml con graduación de 0.1 ml y se inoculó haciendo un ángulo de 45°.

La interpretación de la prueba caudal se ajustó a lo siguiente: La lectura se hizo mediante la observación y palpación del sitio donde se practicó la inoculación, realizándose a las 72 (+/- 6) horas posteriores a la aplicación del biológico.

Las reacciones se clasificaron como sigue:

Negativa: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación.

Reactor: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de la inoculación (24).

Se formaron sólo dos grupos, el primero fue de los reactores positivos los que se enviaron a su sacrificio una vez terminada su etapa productiva (gestación o

producción de leche), y el segundo que estuvo formado por los reactores negativos a ella, se reintegraron al hato.

7.2.2 Inspección al Sacrificio:

Los bovinos reactores positivos sacrificados fueron muestreados en todas aquellas estructuras que presentaron lesiones sospechosas a tuberculosis, y en los que no tenían este tipo de lesión se muestrearon los nódulos linfoides cervicales, cefálicos, mediastínicos y bronquiales. Además se obtuvieron muestras de otros bovinos con características de ganado Holstein y que presentaron lesiones sugerentes a tuberculosis bovina hasta completar un total de 60 muestras.

Se tomaron un total de 60 muestras de tejido granulomatoso sospechoso de tuberculosis bovina, de igual número de bovinos sacrificados, se consideró también la procedencia de dichos semovientes, las muestras recolectadas se conservaron en formol al 10% para su estudio histológico y en borato de sodio para el bacteriológico y fueron enviadas al Laboratorio Regional de Tuberculosis de la S. A. G. A. R. P. A, posteriormente se les sometió a la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la procedencia de las muestras obtenidas se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Procedencia de las Muestras

Procedencia	Número de muestras	%
Jalisco	50	83.3
Zacatecas	1	01.7
Colima	2	03.3
Nayarit (Tepic)	1	01.7
Aguascalientes	6	10.0
Total	60	100

7.2.3 Estudio Histopatológico:

El estudio histopatológico para el diagnóstico de la tuberculosis bovina se realizó por las técnicas que se señalan a continuación:

- a) Se fijaron las muestras por medio de la utilización de formaldehído en una solución amortiguada al 10% en agua, esta solución reacciona con los grupos amino de las proteínas y, por lo tanto, las fija para preservar la estructura general del citoplasma y del núcleo debido a su contenido proteico, la proporción de solución de formalina y de tejido a fijar es de 10 ml /1gr de tejido.
- b) 24 horas después de iniciarse el procedimiento antes descrito, se eliminó el fijador y se deshidrató el tejido para que pudiera ser incluido en una sustancia dura, como la parafina, y se procedió a seccionar en cortes finos, la deshidratación se realizó haciendo pasar la muestra por una serie de soluciones alcohólicas de graduación creciente hasta llegar al 100%. Eliminando así el agua de los tejidos

para agregarle un líquido no acuoso como el xileno, que es miscible en parafina fundida, luego se infiltró la parafina líquida en el tejido y se dejó enfriar y endurecer, en un molde para formar un bloque más o menos cuboideo.

- c) Posteriormente el cubo se colocó en un micrótopo rotatorio y allí se obtuvieron los cortes del tejido de 5 micras de grosor, estos cortes se depositaron en una solución de baño maría con albúmina el cual actuó como adhesivo, y se depositaron los mismos en un porta objeto.

- d) La parafina se eliminó con un solvente orgánico, como el xileno, y la muestra se rehidrató haciéndola pasar por una serie de soluciones alcohólicas de graduación decreciente hasta llegar al agua, luego la muestra se colorea con hematoxilina y eosina, en el caso de los tejidos sospechosos a tuberculosis se utilizó la tinción de Ziehl Neelsen para la observación de BAAR. La muestra se deshidrató nuevamente y se le agregó un fijador como la resina, enseguida se le colocó un cubreobjetos, cuando se seco la muestra esta se observó al microscopio (30).

Para la interpretación de este estudio se considero la población celular presente, la presencia de células gigantes, plasmáticas y macrófagos, así como también la identificación de las zonas de necrosis, de tejido de granulación y la capa de fibrosis, esto de acuerdo a lo publicado por otros autores (10, 27, 36, 41).

7.2.4 Estudio Bacteriológico:

7.2.4.1 Descontaminación de la muestra:

La descontaminación de las muestras se hizo por medio del siguiente procedimiento:

- 1) La limpieza de la muestra se realizó colocándola en un frasco estéril con una solución de hipoclorito de sodio 1: 1000 durante 30 minutos.
- 2) Se efectuó una disección del órgano o tejido y se seleccionó la parte con lesiones, necrosis o exudado caseoso y el resto del tejido se desecho, eliminando la grasa y el tejido conectivo.
- 3) La porción seleccionada se macero en un mortero de porcelana estéril cubierto en papel, con una capacidad de tres a cuatro veces el tamaño de la muestra.
- 4) Se agregó una pequeña cantidad de arena y de agua destilada estériles y se trituró con la mano del mortero.
- 5) Ya macerado el tejido se pasa a un tubo de ensaye estéril.
- 6) En una campana de flujo laminar se destapo el tubo y se le añadió 5 partes de ácido clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen del material y de 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1%, hasta que adquirió un color naranja, se agito ligeramente el tubo para mezclar el contenido y se dejo en reposo durante 20 minutos.
- 7) Posteriormente se le agregó gota a gota una solución de NaOH 2N agitando el tubo hasta que el indicador cambió a un color entre morado y lila.

- 8) Se centrifugo la muestra a 3000 rpm durante 20 minutos y se decanto el tubo, eliminando el sobrenadante, el sedimento del tubo se utilizó para ser sembrado (1).

El procedimiento completo de descontaminación se describe en el Anexo 1.

7.2.4.2. Cultivo Bacteriológico e identificación:

Después de realizarse la descontaminación, se procedió a sembrar en medio de cultivo de acuerdo al siguiente procedimiento:

- 1) Cada muestra se sembró en dos tubos de medio Lowenstein-Jensen y dos de medio Stonebrink, colocando en cada tubo una o dos asadas del sedimento del tubo de la muestra.
- 2) Ya sembrados los tubos se colocaron en una bandeja de fondo inclinado, para que el líquido sembrado cubriera toda la superficie del medio y se incubó a una temperatura de 37°C.
- 3) La primera revisión del cultivo se hizo a las 48 horas y posteriormente cada semana hasta las 9 semanas para los tubos de Lowenstein Jensen y hasta 12 para los tubos de Stonebrink. (1)

La técnica completa de cultivo se describe en el Anexo 2.

La tipificación de las cepas de *Mycobacterium*, aisladas se realizo a cabo utilizando las pruebas bioquímicas convencionales para dicho proceso, con especial énfasis en aquellas útiles para identificar al *M. bovis*, como son la reducción de telurito, Hidracida ácida thiopheno 2 carboxílico y ureasa, el proceso empleado se describe en el Anexo 3.

7.2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

7.2.5.1. Extracción de DNA.

Para la identificación molecular rápida a partir de cultivos positivos se realizó como sigue:

- a) Se depositaron 100 μ l de amortiguador de lisis (TE – TRITON X – 100) a un tubo Eppendorff.
- b) En condiciones de bioseguridad se tomó una asada de masa bacilar y se mezcló en el amortiguador TE.
- c) Se incubó a 95°C por 30 minutos en un bloque de calentamiento.
- d) Se agregó Fenol – Cloroformo – Alcohol Isoamilico (25:24:1) y se mezcló utilizando un vortex por 5 segundos.
- e) Se centrífugo a 14000 rpm a 5°C por un minuto.
- f) Se recuperó la fase acuosa que contenía el DNA en un tubo nuevo con cuidado de no romper la capa intermedia de detritus celulares.

7.2.5.2 Identificación de *M. bovis* por PCR:

La identificación se realizó a través de la amplificación de un fragmento específico de la secuencia blanco, el cual es el gen OxyR por medio del empleo de los iniciadores oxyRMB-1 y el oxyRTB-2.1 para *M. bovis*, que amplifican 270 pares de bases.

Para llevar a cabo la amplificación de DNA de estas muestras se reformuló la mezcla de amplificación, la cual se describe en la tabla 4:

Tabla 4. Mezcla para la Amplificación

Reactivo	Volumen para 1 prueba	Concentración
H ₂ O	37.4 μ l	
Amortiguador para PCR	5 μ l	10mM de Tris Hydrocloro (pH 8.3) y 50mM de KCl
DNtps (mezcla)	0.4 μ l	200 μ M
Oxy RMB – 1	1.4 μ l	25 pmol
Oxy RTB 2.1	1.4 μ l	25 pmol
TAQ Polimerasa	0.4 μ l	1 U
Mg. Cl.	2 μ l	2 mM
ADN	2 μ l	100 ng

La cual corresponde a la propuesta por Monteros y cols. (22).

La replicación de OxyR se realizó por medio del uso de un termociclador (Bio-Rad) con el procedimiento siguiente, 1 ciclo de 95°C por 12 minutos, seguido de 30 ciclos de 2 pasos cada uno, el primer paso fue la desnaturalización la cual se hizo a 94°C por 45 segundos y en el segundo paso correspondió a la alineación más la extensión a 70°C por 1 minuto 30 segundos.

La observación del producto amplificado se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en amortiguador TAE 1X, después se llevo a la ebullición en una platina caliente mezclándolo continuamente, después se agregó 4 μ l de Bromuro de

Etidio y se homogenizo agitándolo, posteriormente se vertió en el molde de la cámara de electroforesis, se colocó el peine y se esperó a que gelificara, una vez que se enfrió el gel, se le añadió el producto de amplificación con el amortiguador de carga (por cada 10 μ l de producto de amplificación, añadir 2 μ l de amortiguador de carga), y colocó este en cada uno de los pozos correspondientes en el gel, en el primer pozo se colocaron los marcadores, en el segundo un control negativo, en el tercero el control positivo (*M. bovis* BCG), y en los restantes se depositaron las muestras problemas, para su observación se utilizó un transluminador y se consideró una prueba positiva a PCR cuando el producto obtenido correspondía a una amplificación de 270pb, Anexo 4 (22).

7.2.6. Estudio Estadístico:

La determinación de sensibilidad, especificidad, prevalencia y frecuencia de cada una de las pruebas con respecto a otra se realizó mediante la aplicación del método propuesto por Michael Thrusfield y por Zeferino García Vázquez Tabla 5 (9, 37).

Tabla 5. Método para obtener la Sensibilidad y la Especificidad

Resultado de la prueba	Estado Verdadero		Total
	Enfermos	No enfermos	
Enfermos	A	b	a+b
No enfermos	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d

$$\text{Sensibilidad} = a/(a+c)$$

$$\text{Especificidad} = d/(b+d)$$

Además se realizó el análisis estadístico por la prueba de X^2 (12).

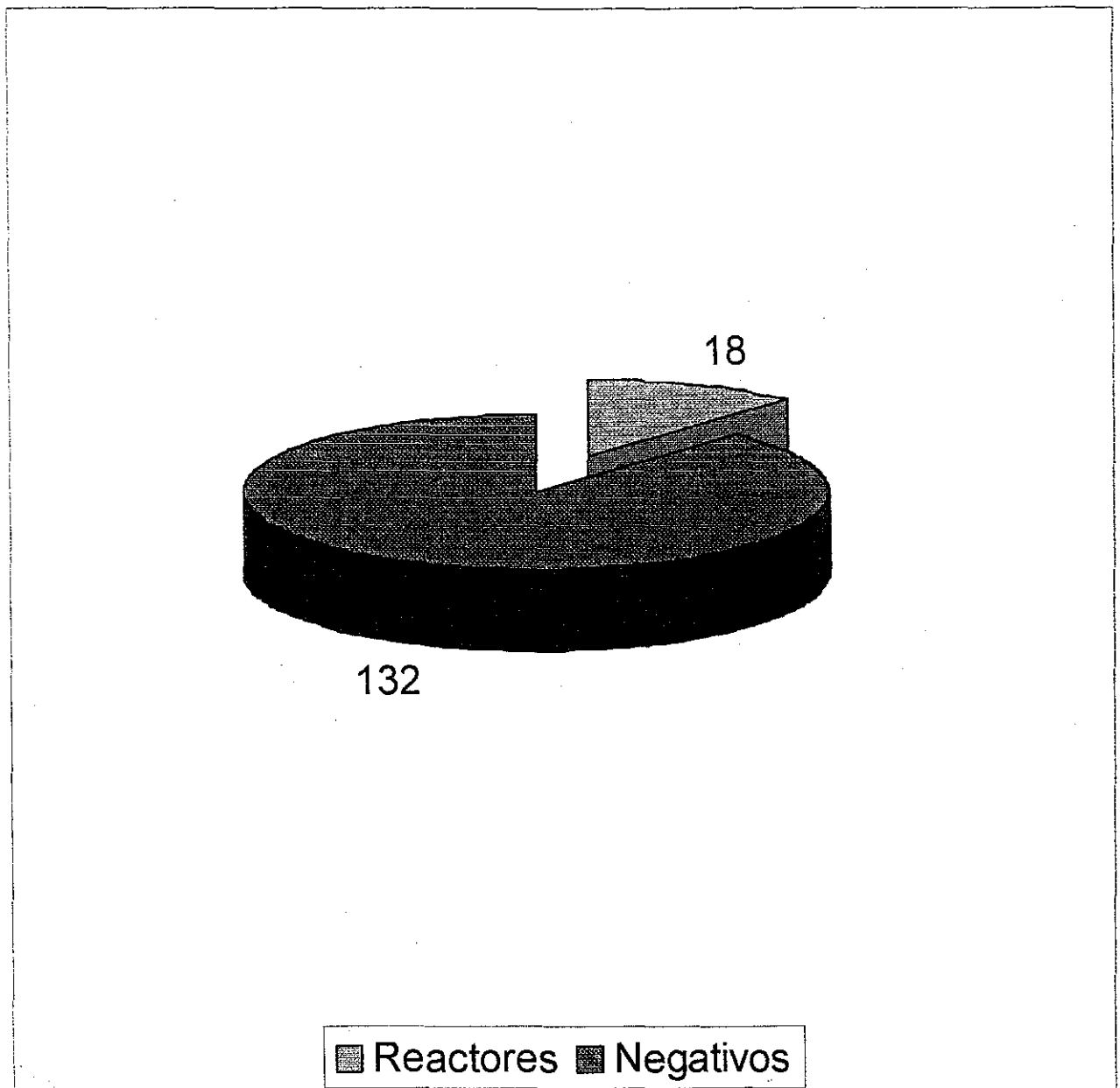
8.0. Resultados

8.1. Prueba de Intradermorreacción:

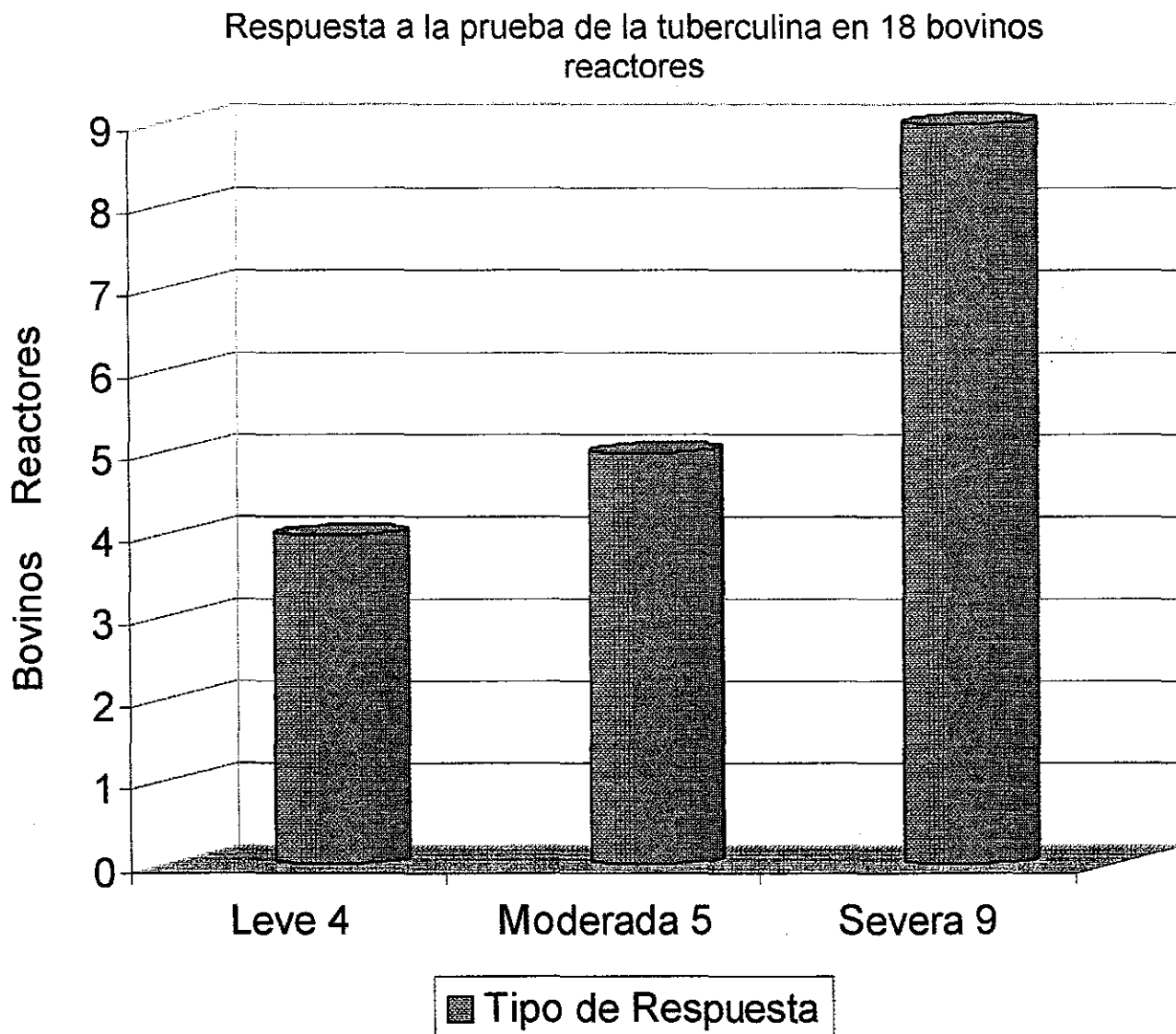
A los 150 bovinos hembras que se tuberculinizaron se les tomó la lectura de la prueba a las 72 horas +/- 6 horas resultando dieciocho con una respuesta cutánea positiva, por lo que se le considero como "reactor" de acuerdo a la metodología propuesta. Los 132 bovinos restantes no manifestaron respuesta alguna en el período de tiempo señalado y se les denominó "negativos", la frecuencia obtenida en esta etapa diagnóstica fue del 12 % de positividad (Gráfica 1).

La respuesta de los "reactores" a la tuberculina no fue homogénea, ya que mostraban diferente intensidad, en algunos de ellos fue ligeramente perceptible por lo que se le considero como "leve", en otros fue un poco más intensa por lo que se les denominó como "moderada", y en algunos fue muy evidente además de prominente, por lo que se les calificó como "severa", esta última característica fue presentada en 9 de los dieciocho bovinos, y representó la mayoría del grupo "reactor", obteniendo una proporción del 50 % de los mismos (Gráfica 2).

Positividad a la tuberculina en 150 bovinos del municipio de
Tepatitlán de Morelos, Jalisco



Gráfica 1. Se representa a los bovinos reactores los que alcanzan una positividad del 12%.



Gráfica 2. La mayor respuesta fue la considerada como severa con una proporción del 50%.

Las hembras muestreadas fueron de diferente edad, la cual comprendía desde los 24 meses hasta los 72, así mismo en ese período de vida habían presentado desde uno o más partos, el grupo que mayor positividad presentó y contó con 11 animales fue aquel que estaba formado por las vacas de 24 a 36 meses y de uno o más partos, obteniendo una frecuencia del 61 % (Cuadro 1).

Cuadro 1. Edades de los bovinos positivos a la prueba de tuberculina

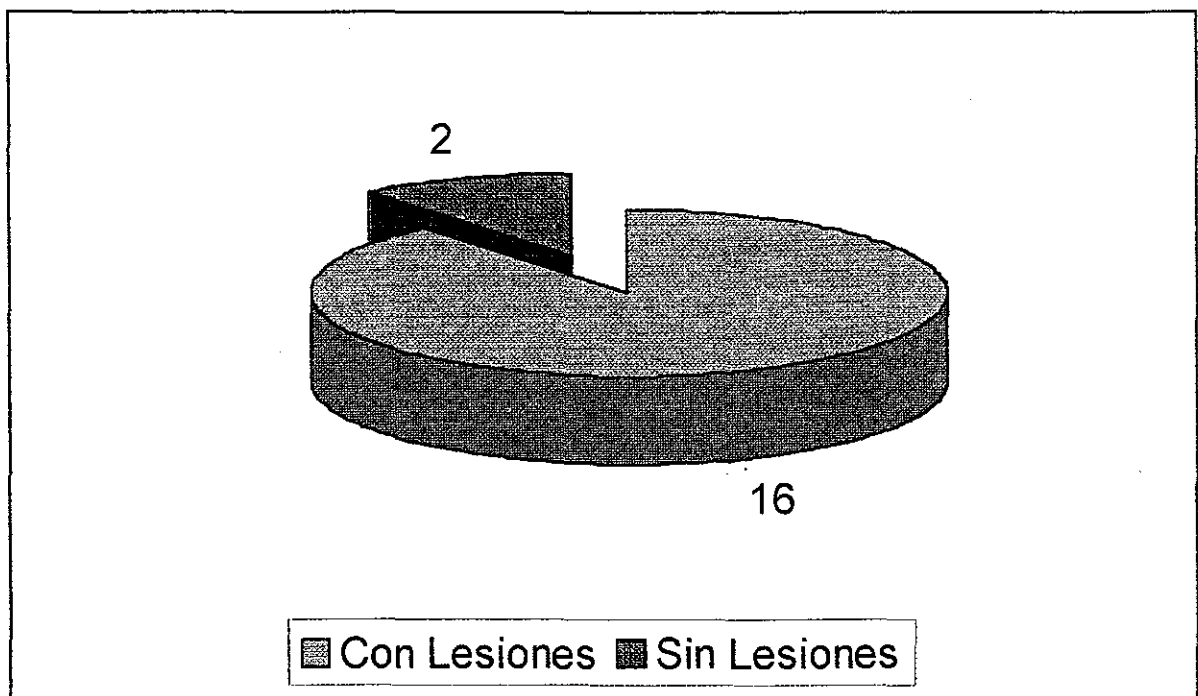
GRUPO	RANGO DE EDAD	FRECUENCIA	NÚMERO DE PARTOS
1	24 – 36 meses	61.1 %	1 – 2 partos
2	36 – 48 meses	22.2 %	3 – 4 partos
3	48 – 60 meses	5.5 %	5 – 6 partos
4	60 – 72 meses	11.1%	6 o más partos

8.2 Estudio Histopatológico:

Los "reactores" a la prueba de la tuberculina fueron identificados y enviados al rastro para su sacrificio al término de su etapa productiva, la cual se extendió a través de los años de 1997, '98 y '99, una vez sacrificados los animales, se procedió a la observación de la canal y poder identificar las probables lesiones granulomatosas sugerentes a tuberculosis que presentaran los mismos, de tal forma se muestrearon los nódulos linfáticos submaxilares, retrofaringeos, mediastínicos y bronquiales, las lesiones observadas en su mayoría fueron de un leve aumento linfonodular en los nódulos mediastínicos y bronquiales.

Del total de las muestras estudiadas histológicamente, sólo las laminillas de 16 bovinos presentaron un patrón celular sugerente a tuberculosis, lo que representó una frecuencia del 89 %, y los dos restantes no presentaron el mencionado comportamiento celular, estos últimos mostraron un panorama histológico que fue compatible con una presentación neoplásica en uno de ellos y en el otro sugería un proceso inflamatorio sin la presencia de células epiteloideas y de células gigantes o de langhans, la frecuencia de negatividad identificada en ellos fue del 11 % (Gráfica 3).

Tejidos con lesiones histológicas en 18 bovinos
compatibles a Tuberculosis bovina



Gráfica 3. Las muestras que presentaron un patrón histológico sugerente a tuberculosis obtuvieron una frecuencia del 89%.

Las muestras de tejido de los "reactores" que si presentaron un comportamiento histológico que sugirió la presencia de tuberculosis, en su totalidad mostraron la formación granulomatosa característica a la afección antes citada en la tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E), así como la presencia de bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR) en la tinción de Ziehl Neelsen (Figuras 1, 2, 3 y 4).

Las pruebas de tuberculina e histopatología en su conjunto presentaron una sensibilidad del 89% y una especificidad del 98%, mientras que la prevalencia obtenida fue del 12%, la prueba estadística de X^2 que se utilizo para comprobar la positividad a la intradermoreacción y la presencia de las lesiones histológicas demostró una asociación significativa entre ellas, $X^2= 49.79$ ($p > 0.05$).

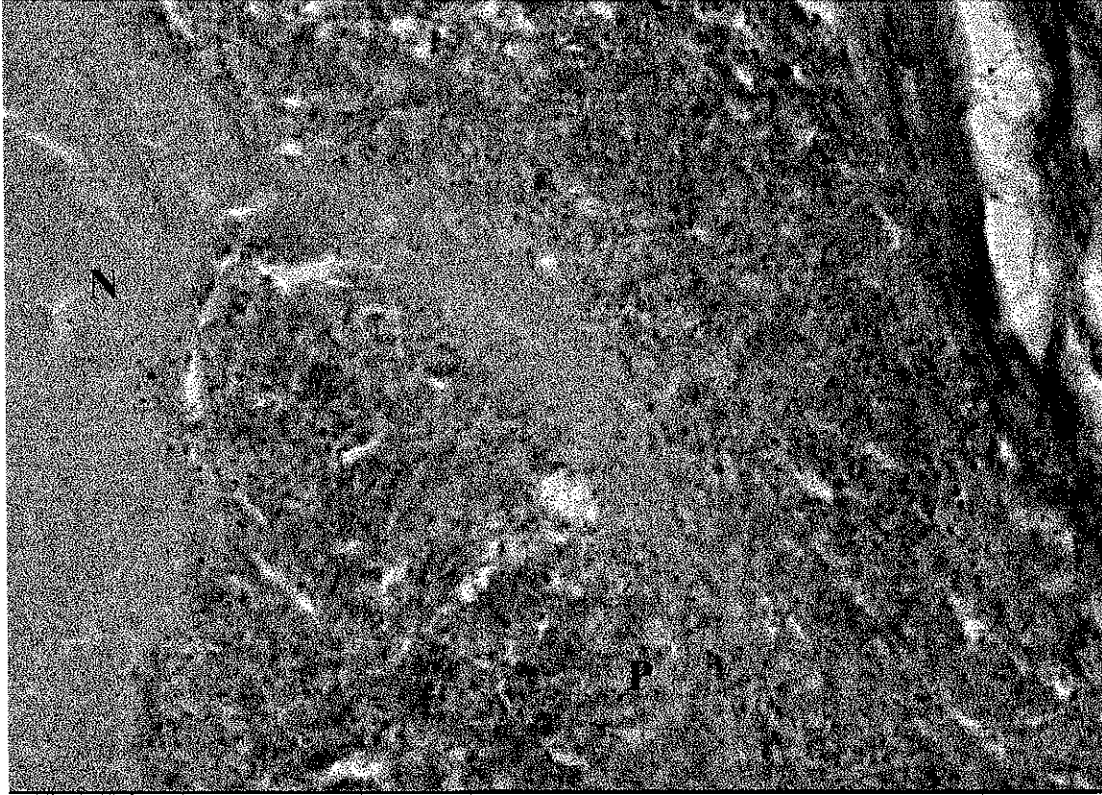


Figura 1. Granuloma Tuberculoso de un bovino reactor, donde se puede apreciar la pared del granuloma (P), y la zona central de necrosis (N), tinción de H y E, objetivo de 10 X.

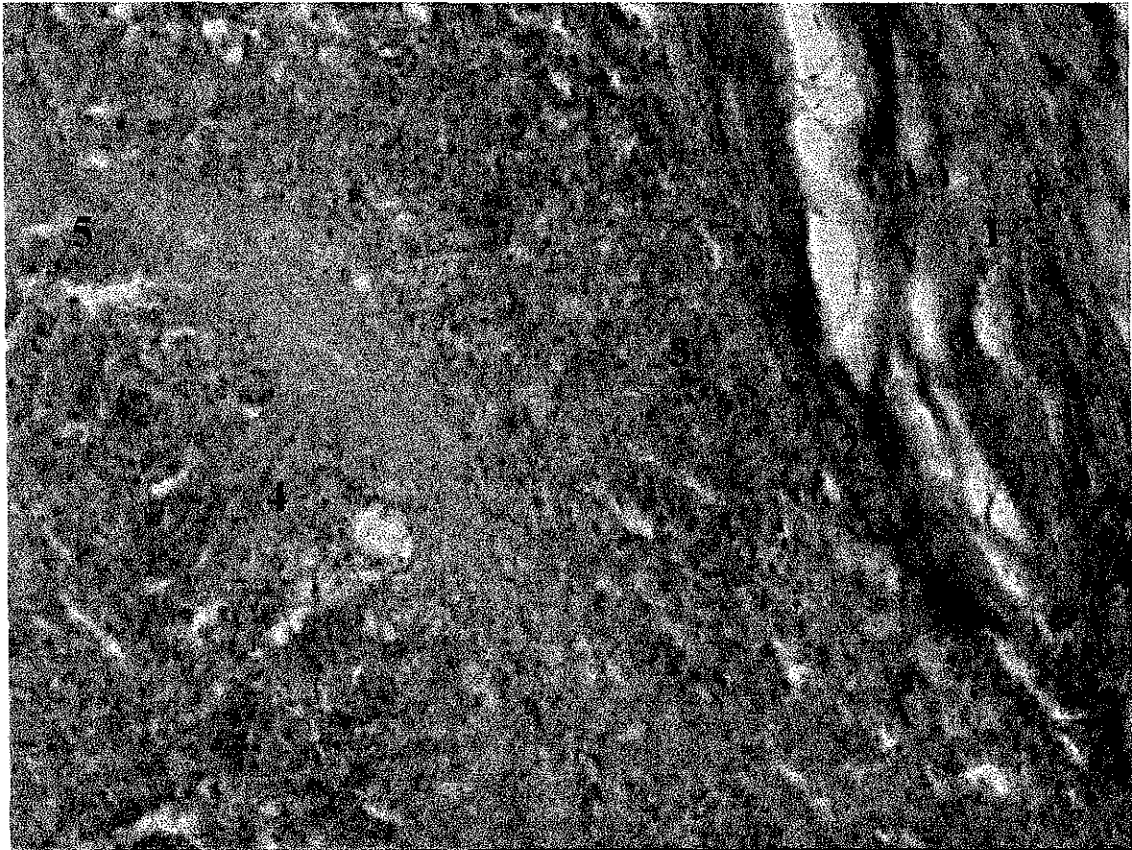


Figura 2. En esta fotografía, se puede apreciar las diversas estructuras histológicas del granuloma tuberculoso, del exterior al interior, la capa de tejido de granulación (1), la cápsula fibroconectiva (2), anillo de linfocitos (3), células epiteloideas y de cuerpo extraño o de Langhans (4), zona central de necrosis (5), tinción de H y E, objetivo de 25 X.

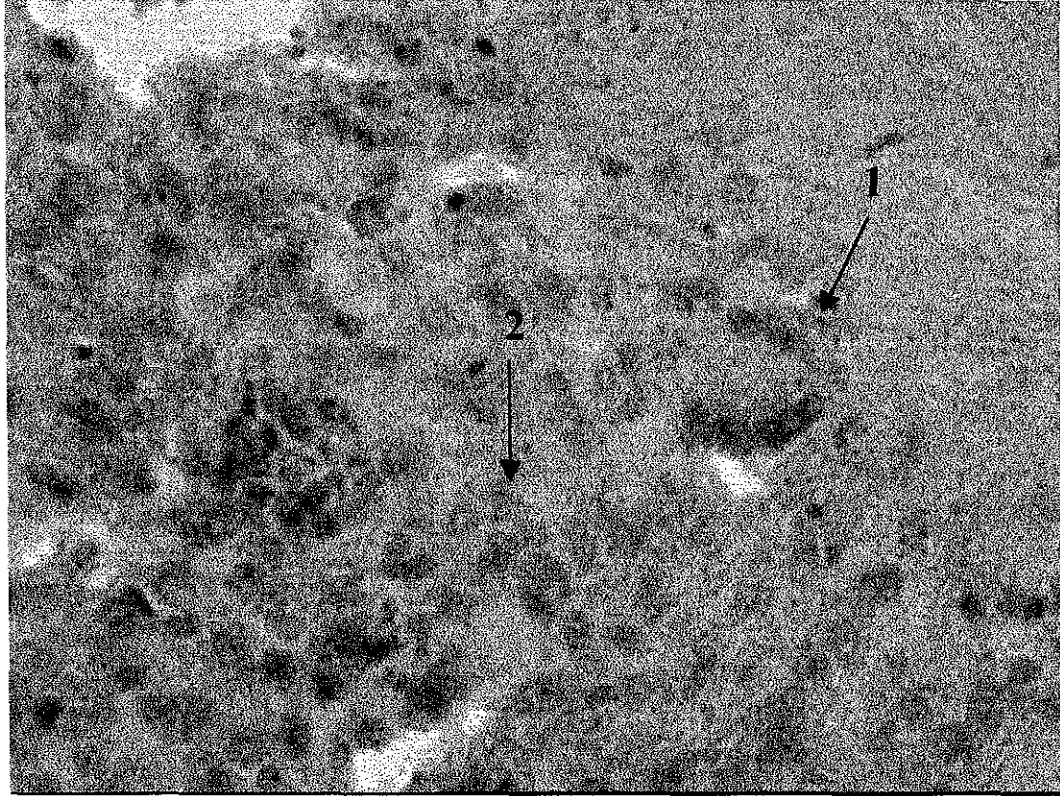


Figura 3. En esta se aprecia las células gigantes de cuerpo extraño o Langhans (1) y las epiteliales (2), tinción de H y E, objetivo de 40 X.

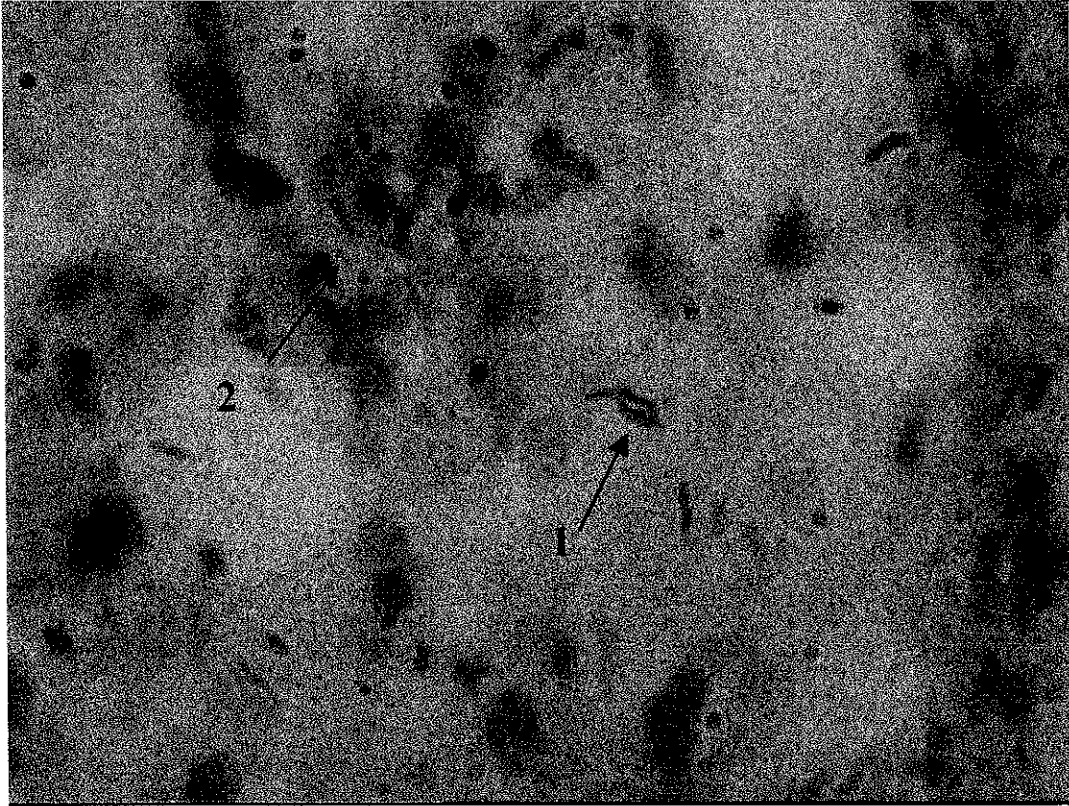


Figura 4. Fotografía microscópica que muestra los bacilos ácido alcohol resistente (1) así como a los macrófagos los cuales han fagocitado a estas bacterias (2), tinción de Ziehl-Neelsen, objetivo de 100 X.

8.3 Aislamiento e identificación de *M. bovis*:

Las 16 muestras positivas a la prueba de histopatología, más 44 muestras biológicas obtenidas de bovinos sacrificados que presentaron lesiones sugerentes a tuberculosis, fueron sometidas a aislamiento bacteriológico en los medios de cultivo de Stonebrink y Lowestein-Jensen, los que en su totalidad manifestaron un crecimiento bacteriano de bacilos alcohol ácido resistentes, dicho crecimiento fue objeto de pruebas bioquímicas por las cuales se pudo tipificar a 56 cepas de 60 como *Mycobacterium bovis* y las 4 restantes fueron identificadas como especies diferentes a *M. bovis*, por lo que se obtuvo una frecuencia del 93 % para la identificación de *M. bovis* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Identificación de *Mycobacterium* de cepas aisladas de tejidos bovinos sospechosos a tuberculosis

Muestras por año	Número de muestras*	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Mycobacterium</i> sp.
1997	20	19	1
1998	20	18	2
1999	20	19	1
Total	60	56	4

* sp. = sin identificar

8.4 Identificación de *M. bovis* por PCR:

Una vez que se obtuvo crecimiento bacteriológico en los cultivos anteriormente citados, se les practicó la prueba de PCR para identificar una secuencia blanco en el DNA del *M. bovis* en los mismos, el citado procedimiento diagnóstico comprendió en su primera etapa a la obtención del DNA de las 60 cepas de micobacterias aisladas, seguida de la amplificación por PCR, y finalmente se observó el producto de 270 pb por medio de la electroforesis, las muestras se consideraron como positivas al coincidir la banda en el espacio 12 o 13 de la banda testigo, y se clasificó como positiva para *M. bovis* de acuerdo al procedimiento usado por Montero y colaboradores (Figuras 5).

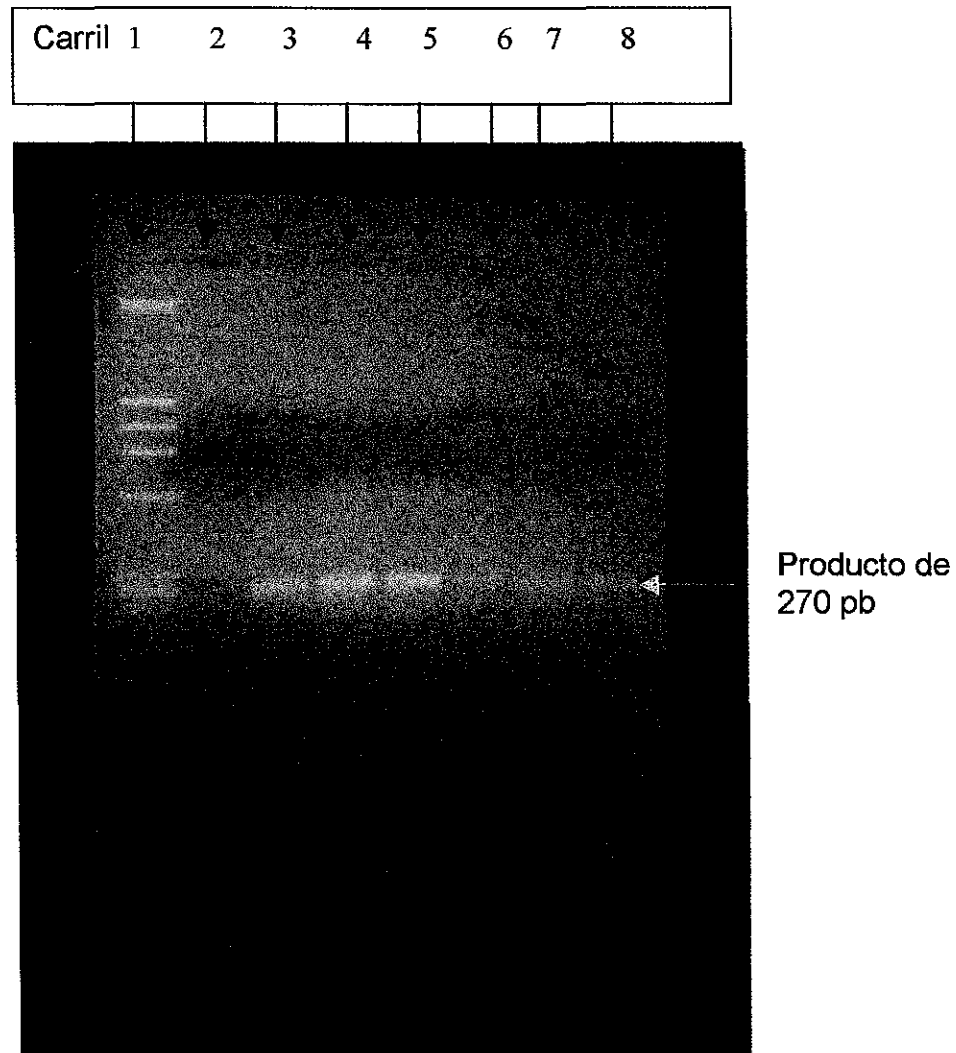


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2% para la observación del producto de amplificación por PCR, carril 1 de marcadores de PCR 2(DNA / Hind III, ϕ X 174 RF DNA / HaeI III), carril 2 de testigo negativo, carril 3 de testigo positivo (*M. bovis* BCG), carriles 4 – 8 cepas identificadas como *M. bovis*, las cuales se alinearon en la posición de 270 pares de bases.

De los corrimientos realizados en las 60 muestras, los resultados obtenidos fueron los siguientes, 55 de ellos presentaron un producto de 270 pbs. por lo que se les calificó como positivos, y en los 5 restantes no presentaron producto alguno y se consideraron negativos. Por lo anterior, se observó una frecuencia de 92 % del PCR para identificar a *M. bovis*. El resultado final con relación a la identificación bioquímica y PCR para *M. bovis* puede apreciarse en el cuadro 3.

El análisis estadístico efectuado por X^2 en ambas estudios, bacteriológico y de PCR, demostró una asociación significativa $X^2=10.50$ ($p>0.05$), la sensibilidad obtenida en dichas técnicas diagnósticas en su conjunto fue de 98 %, mientras que la especificidad fue de 100 %.

Cuadro 9. Identificación de *M. bovis* en 60 cepas de *Mycobacterium sp.* por pruebas Bioquímicas y de PCR.

Año de muestreo	Bioquímicas		PCR	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
1997	19	1	18	2
1998	18	2	18	2
1999	19	1	19	1
Total	56	4	55	5

9.0. DISCUSIÓN

La intradermorreacción para el diagnóstico de tuberculosis, constituye una respuesta inmune mediada por la actividad celular y considerada como tardía o de tipo IV, esta prueba utiliza al PPD como antígeno, pero tiene una eficacia limitada por su incapacidad de distinguir entre la enfermedad activa o animales previamente sensibilizados en etapas anteriores, por reacción cruzada por infección con otras micobacterias, pero también falla en detectar animales en estados avanzados de la enfermedad debido a la anérgia, esto por sí mismo explicaría las diferentes respuestas mostradas en las explotaciones pecuarias, por lo cual no todos los tuberculinos positivos muestran lesiones macroscópicas y se falla en aislar al *M. bovis* (8).

La positividad encontrada en este estudio, mostró una frecuencia del 12 % que corresponde a 18 bovinos "reactores" de 150 muestreados, el cual esta comprendido dentro de los parámetros nacionales de TB bovino referido por la Organización Mundial de la Salud, la SAGAR y otras investigaciones, las cuales señalan que México tiene un alto porcentaje de tuberculosis en ganado bovino lechero, con una prevalencia a nivel nacional del 11.1% (26).

En el grupo de animales reactivos la respuesta epitelial no fue homogénea. Sin embargo, las diferencias encontradas en las mismas pueden ser explicadas debido a que el PPD empleado provoca una respuesta celular mediada por células de la respuesta inmunológica sensibilizadas previas a la inoculación del PPD, pero esta actividad celular puede o no presentarse bajo diferentes condiciones, como la presencia de enfermedades inmunosupresoras las cuales ocasionan una anérgia o por la actividad neoplásica e infecciones agudas que estimulan la migración celular por factores quimiotácticos, lo anterior explicaría que dos de los 18 bovinos reactivos no presentaran un patrón histológico sugerente a tuberculosis (2, 8, 16, 26).

En el presente trabajo se hizo un muestreo sólo de hembras, si bien la tuberculosis es una afección que no distingue sexos, las hembras son más proclives a padecerla por las diferentes utilidades productivas como son la gestación y lactación, la cual favorece su presentación (12). Los bovinos productores de leche están más expuestos al agente etiológico de los diversos padecimientos por el hacinamiento al que son obligados, facilitando la diseminación de los mismos (12); el mayor número de bovinos afectados que fueron once comprendía el estrato de edad de entre los 24 y los 36 meses y de uno o dos partos, esto es ocasionado por que en las explotaciones pecuarias es generalmente el grupo más extenso.

La especificidad de la prueba de tuberculina en el pliegue caudal encontrada fue del 89%, menor a lo reportado por organismos internacionales como la OMS para esta técnica diagnóstica (96 – 99%), dicha efectividad es moderadamente inferior a la encontrada por la histopatología, que contrastada con el estudio bacteriológico fue del 100 %, pero en su conjunto dichas pruebas mostraron una sensibilidad del 89% y especificidad de 98%, las que en el caso de la sensibilidad esta por encima de lo reportado por la OMS (75 – 82%), (11, 45).

Al considerar las características propias de las pruebas de aislamiento bacteriológico, identificación bioquímica y por PCR, a pesar de ser distintas, comparten las mismas dificultades técnicas, el alto costo de operación, los equipos, reactivos, así como laboratoristas y la necesidad de una infraestructura altamente especializadas. Sin embargo la prueba de PCR cuenta con dos ventajas primordiales sobre las otras técnicas; la primera, es el tiempo que se requiere para la identificación del *Mycobacterium bovis* el que es muy corto, entre las 24 a 48 horas a partir de la obtención del cultivo, a diferencia del bacteriológico que requiere de 6 a 8 semanas para el aislamiento y entre 1 y 2 semanas más para la identificación de la micobacteria; y la segunda es su alta especificidad de identificación y tipificación del agente antes citado (8).

De las 60 cepas sometidas para identificación bacteriológica, sólo 56 fueron tipificadas como *M. bovis* y las 4 cepas restantes se clasificaron como otras micobacterias, con una frecuencia de positividad de 93 % y de negatividad de 7 %, mientras que las trabajadas por PCR fueron 55 diagnosticadas como *M. bovis* con una positividad de 92 % y 5 negativas con un 8 %, sin embargo la capacidad de identificación por PCR encontrada en este trabajo coincide con lo reportado por Rodríguez y col., quienes utilizaron el estudio de PCR en 121 aislamientos de *M. bovis* usando los iniciadores JB21 y JB22, amplificó un fragmento de 500 pb, este fragmento estuvo presente en todas las muestras de *M. bovis* utilizadas en el estudio, dando una correlación del 100% con la identificación microbiológica, y la utilización de marcadores moleculares como el Oxy R. (22).

La diferencia en la positividad entre la tipificación bioquímica y PCR es muy baja (1 animal), lo que bien podría ser atribuible a una falla técnica de la tipificación, ya que por las características de la prueba de ADN, bien puede tratarse de otra micobacteria, no obstante lo anterior, la sensibilidad y la especificidad de las citadas técnicas en su conjunto de 90 % y 100% respectivamente, son muy favorables, similar a lo reportado por Montero y col., los que obtuvieron una alta sensibilidad de la prueba de PCR al utilizar el iniciador Oxy R con una alta amplificación ya que se obtuvieron de 185 a 274 pb realizada en una pequeña cantidad de ADN cromosomal de cerca de 20 pg. (22).

10.0. CONCLUSIONES

1. La frecuencia de positividad en la prueba de tuberculina aplicada en el pliegue anocaudal fue del 12 %, la cual corresponde a la considerada para el estado de Jalisco y en particular para el municipio de Tepatitlán de Morelos.
2. La frecuencia de observación de lesiones histológicas compatibles a una afección de tuberculosis en los tejidos observados, y de las cuales se pudo obtener un aislamiento bacteriológico fue del 100 %.
3. La prueba de tuberculina, la cual es usada como prueba tamiz en la campaña contra la tuberculosis bovina tiene el inconveniente de tener un amplio rango de especificidad y sensibilidad, mientras que las pruebas de PCR son más específicas y sensibles para detectar la infección asociada con *M. bovis*.
4. La eficacia diagnóstica de TB bovina por las pruebas de intradermoreacción e histopatológica es demostrada por una sensibilidad de 89 % y una especificidad de 98 %.
5. La frecuencia de aislamiento y de identificación bioquímica de *Mycobacterium bovis* en las muestras biológicas fue del 93 %.
6. La frecuencia en la capacidad de identificación del *Mycobacterium bovis* por la Reacción en Cadena de la Polimerasa fue del 92 %.
7. EL presente estudio demostró que existe una asociación estadística significativa entre la prueba de tuberculina y el histopatológico $X^2=49.79$ ($p>0.05$), así como también la hay entre el estudio bacteriológico y PCR $X^2=10.50$ ($p<0.05$)

8. El trabajo realizado demostró que la asociación entre el bacteriológico y el de PCR tiene una especificidad del 100 %.
9. En el presente trabajo no se encontró una asociación estadística significativa entre las pruebas de intradermorreacción, el estudio histológico y la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa ($p < 0.05$).
10. Por los resultados obtenidos, se sugiere que la prueba de PCR puede ser utilizada como herramienta eficiente en la caracterización epidemiológica de esta afección principalmente en las zonas de alto riesgo de contaminación o de certificación de zonas libres.

11.0. BIBLIOGRAFÍA

1. Balandro, C. S., Anzaldo, F. G.; Peña, F. G., Betancourt, M X. Tuberculosis 18, Manual de Procedimientos de Laboratorio. INDRE/SAGAR. México. 1996: 45 – 49
2. Chamorro, P. E. G., Hernández, A. J. Diagnóstico histopatológico de casos sugestivos de tuberculosis en ganado bovino sacrificado en el rastro TIF No. 54 en Mexicali, Baja California, México. Universidad Autónoma de Baja California. Memorias del PANVET. Acapulco, México, 1994. (134): 192
3. Chávez, G. G. Uso de la Biología molecular en el diagnóstico y control de la tuberculosis bovina. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM; Memorias del PANVET, Acapulco, México, 1994: 498
4. Corner, L., Melville, L., McCubbin, K. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculosis in cattle. CSIRO. Division of Animal Health, Parkville, Victoria. Aust. Vet. J. 1990; 67 (11): 359 – 92.
5. Cosivi, O., Grange, J. M., Daborn, C. J., Raviglione, M. C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R. A., Huchzrmeyer, H. F. A. K., Meslin, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. WHO. Emerg. Infect. Dis. 1998. 4 (1): 59-60.
6. Cosivi, O., Grange, J. M., Daborn, C. J., Raviglione, M. C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R. A., Huchzrmeyer, H. F. A. K., Meslin, F. X. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. WHO. Emerg. Infect. Dis. 1998. 4 (1): 63.

7. Cousins, D. V., Roberts J. L.; Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis; the battle for freedom and beyond: Tuberculosis (2001) 81 Numbers 1 & 2, Harcourt Publishers Ltd. 2001: 5 – 15.
8. Díaz, O. F. Avances en la tecnología para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Memoria de la 5ª Reunión Anual del Consejo Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Consejo Consultivo Nacional de Sanidad Animal CONASA. México: 1996: 156 – 157.
9. García, V. Z. Epidemiología veterinaria y salud animal. Primera edición. Editorial Limusa, Noriega Editores, México, D. F. 1990: 129 – 135.
10. Gázquez, O., A. Patología veterinaria. Primera edición en español. Editorial Interamericana · McGraw-Hill. España. 1991: 406-408.
11. Gilot, P., Cocito, C. Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in Cattle. Microbiology and Genetics Unit, University of Louvain, Medical School, Brussels, Belgium, FEMS. Microbiol. Lett. 1993. (1), Medline 1993.
12. Goodchild, A. V., Clifton – Hadley, R. S.: Cattle – to – cattle transmission of *Mycobacterium bovis*: Tuberculosis (2001) 81, Numbers 1 & 2, Harcourt Publishers Ltd.: 23 – 41.
13. Grange, J. M. Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection. IOWA STATE UNIVERSITY PRESS / AMES. 1995: 29 – 30.
14. Grange, J. M.: *Mycobacterium bovis* Infestation in human begins: Tuberculosis (2001) 81, Numbers 1& 2, Harcourt Publishers Ltd.: 71 - 72.

15. Hayslett, H. T.. Estadística simplificada. Ediciones Minerva S.A. tercera edición en español. México, D. F. 1976: 93, 95, 154.
16. Hernández de Anda, J., Rentería E., T., López V., G., Montaña H., M. An abattoir monitoring system for diagnosis of tuberculosis in cattle in Baja California, México. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998. (211): 709-711, 1576.
17. Holt, J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Stanley J. T., Williams S. T. Bergey's Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. Williams & Wilkins. Ninth Edition, Baltimore, Maryland, USA. 1994: 597- 599.
18. Jawetz, E., Melnick, J., L., Adelberg, E., A. Manual de microbiología médica, 9ª Edición. Editorial Manual Moderno. México, D. F. 1981: 211-213.
19. Kobaisy, M., Abramowsky, Z., Lermer, L., Saxena, G., Hancock, R. E. W., Towers, G. H. N., Doxsee, D., Stokes, R. W. Antimycobacterial polyynes of devil's club (*Oplopanax horridus*), a North American Native Medicinal Plant. J. Nat. Prod. 1997, (60): 1210 – 1213.
20. López, V.G., Hernández de Anda, J., Sierra, L.E. Diagnóstico *post mortem* en decomisos sugestivos a tuberculosis en ganado bovino sacrificado en rastros en Baja California. Vet. Méx. 1997, 28 (3): 236 – 237.
21. Moda, G., Darbon, C., J., Grange, J., M., Cosivi, O. The Zoonotic Importance of *Mycobacterium bovis*. Tubercle and Lung Diseases 1996. (77): 103 – 108.
22. Monteros, L., E., E., Galán, J., C., Gutiérrez, M., Samper, S., García, M., J., F., Martín, C., Domínguez, L., Rafael, L., Baquero, F., Gómez-Mampaso, E., Blázquez, J. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR*

7. Cousins, D. V., Roberts J. L.; Australia's campaign to eradicate bovine tuberculosis; the battle for freedom and beyond: Tuberculosis (2001) 81 Numbers 1 & 2, Harcourt Publishers Ltd. 2001: 5 – 15.
8. Díaz, O. F. Avances en la tecnología para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Memoria de la 5ª Reunión Anual del Consejo Consultivo Nacional de Sanidad Animal. Consejo Consultivo Nacional de Sanidad Animal CONASA. México: 1996: 156 – 157.
9. García, V. Z. Epidemiología veterinaria y salud animal. Primera edición. Editorial Limusa, Noriega Editores, México, D. F.1990: 129 – 135.
10. Gázquez, O., A. Patología veterinaria. Primera edición en español. Editorial Interamericana · McGraw-Hill. España.1991: 406-408.
11. Gilot, P., Cocito, C. Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in Cattle. Microbiology and Genetics Unit, University of Louvain, Medical School, Brussels, Belgium, FEMS. Microbiol. Lett. 1993. (1), Medline 1993.
12. Goodchild, A. V., Clifton – Hadley, R. S.: Cattle – to – cattle transmission of *Mycobacterium bovis*: Tuberculosis (2001) 81, Numbers 1 & 2, Harcourt Publishers Ltd.: 23 – 41.
13. Grange, J. M. Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection. IOWA STATE UNIVERSITY PRESS / AMES. 1995: 29 – 30.
14. Grange, J. M.: *Mycobacterium bovis* Infestation in human begins: Tuberculosis (2001) 81, Numbers 1& 2, Harcourt Publishers Ltd.: 71 - 72.

29. Romero, R. E., Garzon, D. L., Mejia, G. A., Monroy, W., Patarroyo, M. E., Murillo, L. A.; Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species – specific primers. Can, J. Vet. Res. 1999, Apr.; 63 (2): 101 – 106.
30. Ross, M. H.; Romrell, L. J.; Histología, texto y atlas a color. Segunda edición en español. Editorial Medica Panamericana, México, D. F.1992: 17 – 19.
31. SAGAR, FedMVZ. Manual de actualización técnica para la aprobación del médico veterinario como unidades de verificación en tuberculosis bovina y brucelosis. Programa de Aprobación de Médicos Veterinarios. México, 1996: 20-24.
32. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria; Dirección General de Salud Animal. Reporte mensual de salud animal, monthly animal health report, diciembre / december 1996.
33. Sheldon, M., Han, B. G., Suffys, P., Portillo, G., L., FairchoK, M., Rouse, D., Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Dis. 1995. 171: 954 – 960.
34. Sjörgen, I., Sutherland, I. Estudios of tuberculosis in man in relation to infection in cattle. Tubercle. 1974. 56:113 – 127.
35. Sommers, H., M., Good, R., C. *Mycobacterium*. Manual of Clinical Microbiology, Fourth Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985: 216-218.

36. Thoen, Ch. O. Infección en bovinos por *Mycobacterium bovis*, patogénesis. PANVET Acapulco, México 1994: 492
37. Thrusfield, M. Epidemiología veterinaria. Primera edición en español. Editorial Acribia, S.A. España, 1990: 129, 131, 228, 229.
38. Trigo, F., Mateos, A, Patología sistémica veterinaria, 3ª Edición. Ed. MacGraw-Hill · Interamericana. México, 1998: 72-73.
39. Trigo, T., F., J., Mateos, P., A. Patología general veterinaria. Segunda edición, Editorial Interamericana · McGraw-Hill, México, 1993: 184-185.
40. Valdespino, O. J. R. Impacto económico de la brucelosis y tuberculosis bovina, durante 1992 en México. Administración, INIFAP-SARH. C. E. Querétaro, México. Memorias del PANVET. Acapulco, México. 1994. (858): 48
41. Valero, G. Diagnóstico histopatológico de tuberculosis bovina. CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SARH, México, DF. Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Memorias del PANVET. Acapulco, México. 1994: 108
42. William, H. B., Hernández de Anda, J. Tuberculosis in adult beef cattle of Mexican origin shipped direct-to-slaughter into Texas; J. Am. Vet. Med. Assoc. 212, 1998: 557 – 559.
43. Wolcott, M. J. Advances in nucleic acid-based detection methods. Clini. Microbiol. Rev. Oct. 1992: 370 – 386.

44. World Health Organization. Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) with the participation of FAO. Geneva, 15 November 1993: 9, 10, 14.

45. World Health Organization. Report of the WHO working group on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*), with the participation of FAO: Veterinary Public Health Unit. WHO/CDS/VPH/94. 1994. 137: 16 - 19.

12.0. Anexos

12. 1. Descontaminación.

Se realizo la descontaminación de las muestras por medio del siguiente procedimiento:

1. Se utiliza un método de tratamiento ácido-álcali, por el cual la muestra se colocará en una solución antiséptica de hipoclorito de sodio, se transfiere a una solución de ácido clorhídrico, se neutraliza con hidróxido de sodio y se siembra en el medio.
2. Las muestras de órganos o de tejidos generalmente se encuentran en la solución de borato de sodio empleada para su transporte. Antes de sembrar, la muestra debe ser limpiada y seleccionar la pieza o área más representativa para homogenizarla.
3. La limpieza de la muestra puede o no realizarse, pero ayuda en el caso de muestras muy contaminadas. Para esto, la muestra íntegra se coloca en un frasco estéril con una solución de hipoclorito de sodio 1: 1,000 durante 30 minutos.
4. Para la selección, el órgano tejido se disecciona con ayuda de instrumental quirúrgico estéril (bisturí, tijeras y pinzas). Según el tamaño de la muestra, se puede diseccionar sobre un mortero de porcelana, una caja de Petri o una charola metálica estéril.
5. Se selecciona la parte con lesiones, necrosis o exudado caseoso y el resto de tejido se desecha. Debe eliminarse de la muestra la grasa o el tejido conectivo. Cuando la muestra es muy pequeña, no es necesario seleccionarla.
6. Para la homogeneización, la porción seleccionada se macera en un mortero de porcelana estéril envuelto en papel, con una capacidad tres o cuatro veces mayor que el tamaño de la muestra.
7. Se agrega una pequeña cantidad de arena y de agua destilada estériles y se tritura suavemente con la mano del mortero, cuidando de mantenerlo siempre tapado con el papel.

8. Cuando esté bien macerado el tejido, se agrega agua estéril para hacer una suspensión y se trasvasa la suspensión a dos tubos de ensaye estériles con ayuda de una pequeña pipeta Pasteur o de un embudo de vidrio estéril.
9. Se rotula uno de los dos tubos con los datos de la muestra o el número de caso, se cierra bien y se guarda a -20° o -70°C hasta la conclusión del estudio.
10. El segundo tubo de ensayo que contiene la muestra se utiliza para descontaminación.
11. En ambiente estéril, se destapa el segundo tubo.
12. Se añaden 5 partes de ácido clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen del material y de 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1% (hasta que adquiera un color naranja).
13. Se agita ligeramente el tubo para que se mezcle su contenido y se deja en reposo durante 20 minutos.
14. Se añade gota a gota una solución de NaOH 2N agitando el tubo, hasta que el indicador vire a un color entre morado y lila.
15. Se centrifuga la muestra a 3,000 rpm durante 20 minutos, se decanta el tubo y el sobrenadante se desecha. El sedimento del tubo está listo par ser sembrado.

12.2. Bacteriológico.

Después de realizarse la descontaminación como se describió se realizó la siembra en medio de cultivo de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Sobre la mesa de trabajo o en el interior de la cabina de seguridad se coloca un par de gradillas, una con los tubos de las muestras neutralizadas y centrifugadas con el número de caso del laboratorio en cada tubo. En la otra gradilla se colocan los tubos con medios de cultivo identificados con los números de casos correspondientes. Es importante que el primer espacio de la izquierda de cada gradilla esté vacío, para que durante la siembra se coloque en él el tubo ya utilizado; así, el espacio vacío se va desplazando hacia la derecha, sirviendo como punto de separación entre los tubos ya sembrados y los que están por sembrar.
2. Se toman dos o tres gotas del sedimento de los tubos para realizar un frotis en una laminilla identificada con el número de caso correspondiente. Se deja secar al ambiente y se fija con pases rápidos por la llama teniendo cuidado de no producir aerosoles. Posteriormente se tiñe por la coloración de Ziehl-Neelsen.
3. Si algún tubo con medio contiene agua de condensación, ésta deberá ser eliminada invirtiéndolo cerca del área estéril de un mechero hasta que no escurra agua.
4. Para cada muestra se recomienda sembrar en dos tubos de medio Lowenstein Jensen y dos de medio Stonebrink. Para obtener un cultivo positivo, la muestra deberá contener por lo menos 10 bacilos viables por ml
5. La técnica de siembra debe ser meticulosa por la seguridad del operador, para no confundir las muestras y evitar la contaminación con gérmenes del ambiente.
6. Las pipetas Pasteur deben flamearse, lo mismo que los tubos después de abiertos y antes de cerrarse. Los tubos con el medio de cultivo, mientras estén abiertos, deben mantenerse en posición inclinada cerca de la llama del mechero.
7. Una vez sembrados, los tubos se colocan en una bandeja con fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Se lleva a la

estufa de cultivo con la tapa floja para que se evapore la parte líquida de la siembra.

8. Después de 48 horas se revisan los tubos y si se ha evaporado el líquido, ajustar la tapa de rosca o colocar un tapón de hule, quemando e introduciendo el tapón de algodón dentro del tubo. Otra alternativa es emplear en lugar de tapón de hule, uno de plástico fino (polietileno o similar) y ajustarlo al cuello del tubo con una liga de hule.
9. Los tubos se mantienen inclinados hasta el término del periodo de observación. Esto es mejor cuando se dispone de una estufa de cultivo amplia y se recomienda usar cajas de fondo inclinado con perforaciones que permitan la circulación uniforme del calor.
10. Si solo se dispone de una pequeña estufa de cultivo puede ser más útil la posición vertical de los tubos en cestos de malla metálica, pues significa ocupar menos espacio.
11. La incubación de los tubos sembrados debe hacerse entre 35 y 37°C. Es necesario por lo tanto controlar regularmente la temperatura de la cámara, realizando lecturas a la primera hora por la mañana y al final de la jornada, ambas lecturas serán anotadas diariamente en una hoja de registro mensual que al efecto debe fijarse en la pared externa de la puerta de la cámara.
12. Este sistema permite conocer con suficiente exactitud las fluctuaciones de la temperatura de la estufa y en caso de que estén más allá de los límites aceptables, revisar el termorregulador; si fueran debidas a variaciones muy grandes en la tensión de la red de corriente eléctrica podrán obligar a instalar un regulador de voltaje.

Revisión de los tubos de cultivo

1. Los tubos con el medio de cultivo se examinan por primera vez a las 48 horas de realizada la siembra, con el objeto de verificar que la parte líquida de la siembra se haya evaporado completamente, lo que permite el desarrollo adecuado del bacilo.

2. Las tapas deben ajustarse firmemente para impedir la desecación del medio durante el tiempo de incubación y para saber si alguno está contaminado o alterado por mala neutralización de la muestra.
3. En los tubos alcalinizados el medio adquiere un color blanco amarillento; en los acidificados toma un color verde azulado oscuro. Si hay contaminación por flora secundaria se aprecia el desarrollo de colonias. En ocasiones el medio puede estar licuado por la acción de gérmenes proteolíticos.
4. Después de la primera revisión a las 48 horas, las revisiones deberán realizarse semanalmente hasta transcurridas 9 semanas para los tubos con medio de Lowenstein Jensen y 12 semanas par el tubo con medio de Stonebrink.
5. En caso de que la muestra se observe contaminada a las 48 horas o a la semana de haber sido sembrado, deberá ser descartada inmediatamente y realizar de nuevo el procedimiento de descontaminación y cultivo con el segundo tubo de la misma muestra que se conserve en congelación, tomando la mitad del contenido y almacenando la otra mitad en congelación, hasta que termine el estudio.
6. Con muestras en donde se observen colonias de crecimiento lento (a partir de la cuarta semana) es recomendable realizar un frotis y teñir con Ziehl-Neelsen, anotando en el formato si son bacilos ácido alcohol resistente o no. Cuando el frotis resulte positivo a BAAR se permitirá el crecimiento de la bacteria, dejando incubar hasta que las colonias sean suficientemente grandes, resembrar en otro medio igual al precedente para su posterior identificación.
7. Si en las revisiones aparecen cultivos contaminados tardíamente, sólo deben eliminarse aquellos en los que la contaminación ha cubierto la mayor parte de la superficie del medio, dejando para nueva observación los que conservan la mayor parte del medio sin contaminación. La contaminación tardía no excluye la presencia de *M tuberculosis* o *M bovis*, por lo que siempre es conveniente realizar la tinción de un frotis con Ziehl-Neelsen a partir de los tubos que se desecharon por esta causa.
8. El informe del cultivo como de la baciloscopía no deberá de ser sólo cualitativo sino semicuantitativo, para lo cual se recomienda la siguiente escala:

Negativo (-)

No se observan colonias

Positivo 1 a 19 cuando	El número total de colonias en los tubos sembrados hay menos de 20.
Positivo (+)	Presencia de 20 a 100 colonias
Positivo (++)	Colonias separadas (más de 100)
Positivo (+++)	Colonias confluentes
Contaminado	Cultivo contaminado.

(Balandro, C. S.; Anzaldo, F. G.; Peña, F. G.; Betancourt, M. X.: TUBERCULOSIS
18, Manual de Procedimientos de Laboratorio; INDRE/SAGAR, 1996, pp. 45 – 49)

12.3. Identificación bioquímica.

La tipificación de las cepas de *Mycobacterium*, aisladas se realizó utilizando las pruebas químicas convencionales para dicho proceso, poniendo especial énfasis en aquellas a las que son susceptible las bacterias antes mencionadas, como son:

- Reducción de Telurito

Cultivos;

Se usaron cultivos de 7 días de crecimiento en 5ml del medio líquido de Middlebrook 7H9 en tubos de tapón de rosca. El medio líquido deberá enturbiarse como una indicación de un crecimiento activo.

Reactivo;

Se utilizó una solución acuosa al 0.2% (0.1g en 50ml de agua destilada) de telurito de potasio. Después la sal es disuelta en agua, distribuyendo la solución en cantidades de 2 a 5ml, y esterilizando los tubos en una autoclave a 121°C por 10min. Para evitar la contaminación, use solo un tubo de solución de telurito para una serie de pruebas realizadas en 1 día, y elimine el remanente de la solución.

Procedimiento;

Se agregaron dos gotas de la solución de telurito a cada cultivo, y se regresaron los cultivos a la incubadora. Se examinaron los cultivos diariamente por 4 días o más. Una prueba positiva es reflejada por un precipitado negro.

- Hydrazida Ácida Thiopheno 2 Carboxilico

Substrato:

Se uso el medio de Middlebrook 7H11. Incorporando 5 µg de T2H (Aldrich Chemical Co. , Inc. , Milwaukee, Wis.) por ml en el agar. Distribuyendo el substrato en cantidades de 5ml en placas cuadradas de plástico inclinadas, alternando con el mismo medio sin T2H.

Procedimiento:

Preparar una solución turbia del organismo a ser examinado en agua estéril. Diluir esta suspensión a una relación de 1:1000 con H₂O estéril. Inocular 3 gotas de la suspensión preparada en el recipiente de T2H y en el medio de control, y incubar

el medio a 37°C. Anotar el tiempo que tardo en observarse el crecimiento en el medio de control. Mantener el medio de T2H por cerca de tres semanas, sino a aparecido el crecimiento bacteriano de manera definitiva. Clasificar el organismo como resistente si el crecimiento en el medio T2H es mayor de 1% que el crecimiento del control. Si el crecimiento en la caja de control fue confluyente, considere que fue igual a 10^4 organismos.

- Ureasa

Inoculo:

Use Colonias con crecimiento activo obtenidas de un medio sólido.

Reactivo:

Mezcle 1 parte de agar-base urea concentrada (Difco o un producto equivalente) con 9 partes de agua estéril. No agregue agar. Distribuya la mezcla en tubos de rosca en una cantidad de 4 ml (16 por 125mm), y almacene los tubos a 4°C.

Procedimiento:

Emulsifique el equivalente de una asa de 3mm del crecimiento en un tubo de substrato. Incubar el cultivo de 35 a 37°C, y observe el cambio de color del cultivo de ámbar a rosa o rojo. Deseche el cultivo después de 3 días.

Interpretación:

Un cambio en el color del medio a rosa o rojo dentro de los tres días siguientes es clasificado como una reacción positiva.

12.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

La extracción de ADN a partir de las cepas de *M. bovis*, se realiza con el siguiente procedimiento:

1. Adicionar de 100 μ l de amortiguador de lisis (TE – TRITON X – 100) a un tubo Eppendorff.
2. Incubar a 95°C por 30 minutos en un bloque de calentamiento. Nota; hasta este paso el ADN obtenido es útil para estudios moleculares, o se puede continuar para realizar una extracción mas fina.
3. Adicionar Fenol-Cloroformo-Isoamil Alcohol (25:24:1) y mezclar en vortex por 5 segundos.
4. Centrifugar a 14,000 r.p.m. a 5°C por 1 minuto.
5. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo con cuidado de no romper la capa intermedia de detritus celulares.

Reacción en Cadena de la Polimerasa:

Material y Reactivos

Termociclador Gene cycler (BIO-RAD)

Micropipetas (10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)

Puntillas anticontaminantes

Tubos Eppendorff

H₂O desionizada y estéril

Amortiguador para PCR (TRIS-HCL pH 8.4, KCL)

Desoxinucleotidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Taq Polimerasa

Iniciador oxyRMB-1 para *M. bovis*

Iniciador oxy RTB- 2.1

MgCl₂

ADN (*Mycobacterium bovis*)

Detección Rápida de *Mycobacterium bovis* por "PCR"

La detección de *M. bovis* por PCR se realizó a través de la amplificación de un fragmento específico de la secuencia blanco es el gen *OxyR* mediante el uso del iniciador *oxyRMB-1* y el *oxyRTB - 2.1* para *M. bovis*, que amplifica 270 pares de bases.

Para la obtención de volumen se utilizó, 38.82µl de H₂O desionizada, Amortiguador para PCR 5µl a una concentración de 10mM de Tris hidrócloro (pH 8.3) y KCl 50mM, dNTPs (mezcla) 0.4µl a una concentración de 200µM, 0.68 µl de iniciador *Oxy RMB - 1* a una concentración de 25 pmol, 0.7µl de iniciador *Oxy RTB 2.1* a una concentración de 25 pmol, 2µl de MgCl₂, 0.4µl de Taq-Gold Polimerasa a una concentración de 1U, 2µl de ADN de *Mycobacterium bovis* cerca de 100ng, para obtener un volumen final de 50µl.

La replicación de *Oxy R* se realizó mediante el uso de un termociclador mediante el procedimiento siguiente, 1 ciclo de 95°C por 12 minutos, seguido de 30 ciclos de 2 pasos cada uno, 1 la desnaturalización se hizo a 94°C por 45 segundos y el 2 realiza la alineación más la extensión a 70°C por 1 minuto 30 segundos.

(Allele-Specific PCR Method Based on *pncA* and *oxyR* Sequence for Distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraespecific *M. bovis pncA* Sequence Polymorphism, Monteros, L., E., E., Galán, J., C., Gutiérrez, M., Samper, S., García, M., J., F., Martín, C., Domínguez, L., Rafael, L., Baquero, F., Gómez-Mampaso, E., Blázquez, J., Journal of Clinical Microbiology, Jan. 1998 p. 239-242, Vol. 36, No. 1)

La observación del producto amplificado se realizó por Electroforesis en Gel de Agarosa.

Material y Reactivos:

Cámara de electroforesis

Fuente de poder

Amortiguador de carga

Producto amplificado

Micropipetas (10 μ l, 100 μ l)

Puntillas

Amortiguador TAE IX

Agarosa

Marcadores de pb

Bromuro de etidio 10mg/ml

Transluminador

Procedimiento:

1. Preparación del gel al 2% en amortiguador TAE 1X, utilizar agarosa ultrapura en el volumen deseado de amortiguador y llevar a ebullición mezclando continuamente, después añadir 4 μ l de bromuro de etidio y mezclar, verter la agarosa en el molde de la cámara de electroforesis, colocar el peine y esperar a que gelifique.
2. Remover el peine y añadir el volumen necesario de amortiguador TAE IX en la cámara de electroforesis.
3. Preparar el producto de amplificación con el amortiguador de carga (por cada 10 μ l de producto de amplificación añadir 2 μ l de amortiguador de carga).
4. Colocar el producto de amplificación en amortiguador de carga en los pozos correspondientes del gel, incluyendo los controles y el marcador de pb.
5. Conectar la fuente de poder y prenderla empleando un voltaje inicial de 70 el cual puede incrementarse.
6. El corrimiento se realizara en aproximadamente 40 minutos. Vigilar el frente de corrimiento.

7. Al terminar el corrimiento de la electroforesis, retirar el gel de la cámara con guantes y colocarlo en un transluminador para observar las bandas del producto amplificado de 270 pb, los controles y el marcador de pb.
8. Lavar adecuadamente la cámara de electroforesis y secarla. Realizar el manejo adecuado del gel y del material contaminado con bromuro de etidio.

La obtención del DNA a partir de las muestras de tejido, se realizó mediante el siguiente proceso:

- Se obtienen 100µl de tejido homogeneizado.
- Se somete a digestión con 5µl de Proteinasa K., a 60°C durante 1.5 a 2 hrs.
- Se añade 900µl de PBS con Tween 80 a 0.05%.
- Se Centrifuga a 1400g durante 10 minutos.
- Se decanta el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 100µl de solución TES.
- Se añaden 5µl de Dodecyl Sulphato de Sodio y se incuba en 1 hrs a 60°C y se le añade 2µl de Proteinasa K (10mg/ml)
- Se enfría y se extrae con PCL (fenol, cloroformo) 1/1 V.
- La precipitación del DNA será con adición de RNA 1µg + 3 volúmenes de alcohol absoluto frío.
- Se almacena a -70°C X 30 minutos, centrifugando a alta velocidad por 20 minutos.
- Se lava con alcohol al 70% en 500µl, recentrifugando X 10 minutos.
- Se decanta y se resuspende en agua destilada en 50µl.

La obtención del DNA concentrado se realizó por medio de la utilización de un concentrador de DNA marca, CENTRIUAP Concentrator, LABCONCO, Modelo 78100-00 B, de 115 Volts A.C., Phase 1, Cycle 60, 3.5 AMP. LabConco Corporation, Kansas City, Missouri 64132.

La amplificación de DNA y su presentación fue por medio de la utilización de electroforesis como se explicó anteriormente.