



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**"FRECUENCIA DE IDENTIFICACIÓN DE ADN DE *M. bovis* EN MUESTRAS DE CALOSTRO, LECHE Y
LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES EN UN HATO CON ALTA PREVALENCIA DE
TUBERCULOSIS"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

BLANCA AURORA SERRANO MORENO

ASESORA: M. C. Aurora Romero Tejeda

**CO-ASESORES: Dra. Camila Arriaga Díaz
Dr. Ciro Estrada Chávez**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN
AZÚCAR MATE
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Frecuencia de identificación de ADN de M. bovis en muestras de calostro, leche y lavados bronquioalveolares en un hato con alta prevalencia de tuberculosis".
que presenta la pasante: Blanca Aurora Serrano Moreno
con número de cuenta: 094012624 para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de Mayo de 2005

PRESIDENTE	MVZ. Ruperto Javier Hernández Balderas	
VOCAL	Dra. Camila Arriaga Díaz	
SECRETARIO	MVZ. Carlos Ignacio Soto Zárate	
PRIMER SUPLENTE	QFB. Juana Alicia Alquicira Camacho	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. E. Valentino Villalobos García	

DEDICATORIA.

A TODOS AQUELLOS SERES QUE ESTUVIERON PRESENTES EN ALGUN MOMENTO DE MI VIDA QUIERO AGRADECERLES Y DEDICAR ESTE TRABAJO. MI VIDA ESTA LLENA DE EXPERIENCIAS GRACIAS A UDS.

DIOS. Gracias por la mejor oportunidad que me han dado: vivir.

MAMI. Eres mi mayor ejemplo, te amo por sobre todas las cosas, eres una mujer excepcional, trabajadora, única. ¡Lo logramos!

MARIFER. Llegaste a cambiar divinamente mi vida, mi sentir, mi existir, mi amor eres a quien con más aprecio y devoción dedico mi trabajo, es la primera parte de mi desarrollo profesional y personal, nos deseo mucho éxito.

PAPA. Siempre llevo conmigo una frase que dejó huella en mi "si vas a hacer algo, hazlo bien, sino, no lo hagas", la escuche de ti aproximadamente a los 6 años y aquí esta una prueba de que sigo tus consejos. Te quiero y te admiro profundamente.

PERLA. La hermandad es un sentimiento indescriptible, una misión, doy gracias a Dios por la oportunidad que me concedió, eres mi amiga, consejera, maestra, tus cualidades son infinitas y no podría, en unas líneas, decirte lo grandiosa que eres.

MARCO. Un Ser divino, extraordinario, aquí y ahora tu dulzura, tu sed de vivir y gozar con un sentido de causa propia me enseñó que existe la vida eterna, armoniosa.

A MIS HERMANOS. Siempre están en mi corazón. Lo quiero mucho.

A MI FAMILIA.

TIA CUCA. Mi segunda Mamá a la que Adoro y Respeto con toda mi alma, gracias por estar a mi lado, por apapacharme y escucharme cuando lo he necesitado.

TIO MIGUEL. Eres admirable, Te Quiero Muchísimo, cuidate, muchos te deseamos sano, a nuestro lado, gozando la vida como lo mereces.

TIA MARGARITA. Es fabulosa tu sed de sentir la vida, gracias por apoyarme.

A MIS HERMANOS TONY Y LALO, A MI TIO GASPAS. Siempre presentes de forma incondicional. LOS ADORO.

A LAS FAMILIAS CABALLERO CAMPOS, NUÑEZ DEL ARCO, JAUREGUI, MENDOZA BLANCO, Y RUIZ-ESPARZA VARGAS: por que pasé una gran parte de mi vida compartiendo con ustedes, me cuidaron, me enseñaron a leer, a escribir, a tantas cosas que no podría imaginar mi biografía sin ese renglón.

A LA FAMILIA AYALA OYOQUI. Por que fueron el canal de bien para conocer una de mis grandes virtudes, mi maternidad. Mi respeto y cariño por siempre para todos.

A MIS SUPER AMIGOS CCHEROS, Edgar, Selene, Edith, Alejandro, Roberto, Esteli, Enrique, Omar, Luis E. y Luis J., Héctor, Sara, Giovanni, Claudia, Cristhian, Andrés, Nahun, aquellos que solo estuvieron un tiempo en "la bola" y quizá en este momento se me olvida su nombre e incluso Karla y Verónica por que son parte esencial de mi vida, los extraño mucho, los quiero. Aprendí tanto, valoro mucho su amistad, lo saben.

A MIS AMIGOS DE TODA LA VIDA. Normis, Martha, Mónica, Paty, Adriana, Juan Carlos, Huri, Omar, Héctor, Emmanuel, Alfredo, etc. Crecimos juntos, dedicamos muchas horas a idear formas de divertirnos, gracias por existir.

A MIS COMPAÑEROS DE LA UNIVERSIDAD. Gracias por esos momentos de alegría, nerviosismo, y quizá hasta enojos. Juan Carlos mi amigochito del alma, te debo mucha de la experiencia que tengo no solo en medicina. Alejandra V. estuviste a mi lado desde el primer día, cuando nos inscribimos al inglés, desde hay me has apoyado incondicionalmente. Maribel, no continuamos juntas la carrera pero estuviste en uno de los procesos mas difíciles, gracias.

A MI ASESORA AURORA. Yo diría a mi Súper Sensei, te mereces todo Auro, eres una gran mujer trabajadora, una gran amiga, consejera, inteligente. MIL GRACIAS POR CREER EN MI

AL Dr. ALFREDO GARCIA. Tu imagen fincó un gran deseo y amor por esta profesión. gracias por apoyarme.

A LA Dra. CAMILA Y AL Dr. Ciro. Me enseñaron una nueva visión, es increíble lo que un ser humano puede lograr con empeño, Ciro es extraordinario todo lo que has logrado mis respetos a los dos

A TODOS MIS PROFESORES DE LA FESC. Juan Carlos del Río, Víctor Pérez, Ana Villalobos, Dr. Licea, Dr. Chávez, Dr. Benito López, Dr. Guevara, Víctor Quintero, Alfredo Franco, etc. me introdujeron al maravilloso mundo de la medicina veterinaria, y hasta la fecha sigo aprendiendo de ustedes.

A LOS MVZ que me recibieron en sus clínicas donde gané experiencia, profesionalismo y ética: Hector Medina, Irma Marín, Socorro Rodríguez, Litzia Moreno.

Al Dr. Vargas gracias por estar conmigo, por respetarme, que Dios nos bendiga y acompañe siempre...

A MI ESCUELA la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y por supuesto a la UNAM por ser la mejor escuela, me ha dejado no solo enseñanzas sino grandes amores, amigos y experiencias.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO. Aprendí que el compañerismo no se compra, Cecy, Ale, Martita, Maura, gracias.

AL Dr. Banda, sus opiniones, sus comentarios y su apoyo hizo amena mi estancia. Gracias.

A CONACyT por otorgarme una beca para solventar parte de mi investigación.

A MI TIA KATY, MARCO, Sr. GASPAR, TIA LUCILA, A MIS ABUELITAS LUZ Y ANGEL'INA, A MI ABUELITO. De cada uno fui aprendiendo el valor de la resistencia, el amor a vivir dejando atrás el pasado, de un buen libro, de un guiso hecho con amor, y tantas cosas que pudieran parecer sencillas pero dejan huella. Ustedes que están al lado de Dios, guíenos con su sabiduría.

A TODOS MIS PROFESORES. Aquellos que desde el preescolar recuerdo con amor, pasando por la primaria, la secundaria que fue un gran reto emocional, y el CCH.

A TODOS LOS ANIMALES DEL MUNDO. Son la imagen de lealtad, fidelidad y misericordia, a aquellos que han estado cerca y me enseñaron que el amor a los seres humanos y a la vida es incondicional, "Boli" "Güera", "Jun", "Zucky". LOS AMO.

"Me vanaglorio por mis flaquezas y errores por que de ellas me e desarrollado"

San Pablo.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	5
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
Definición y etiología	8
Importancia económica	8
Epidemiología	8
Transmisión	9
Patogenia y respuesta inmune	9
Lesiones e inspección post-mortem (IP)	10
Diagnóstico.	10
Prueba de tuberculina	10
Prueba de interferón-gamma (IFN- γ)	10
Prueba de ensayo inmunoenzimático (ELISA)	11
Pruebas moleculares	11
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	11
Antecedentes del uso de la PCR	11
2. JUSTIFICACIÓN.	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	13
Objetivo general	13
Objetivos particulares	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS	14
Prueba de tuberculina simple caudal	15
Toma de muestras de leche, calostro y lavados bronquioalveolares	15
Inspección Post-mortem	15
Extracción de ADN de las muestras	15
Cuantificación	16
Reacción en Cadena de la Polimerasa	16
Análisis estadístico	17
7. RESULTADOS	18
8. DISCUSIÓN	30
9. CONCLUSIÓN	34
10. ANEXOS.	35
Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN genómico	35
Anexo 2. Concentración de reactivos para el uso de la PCR control	36
Anexo 3. Concentración de reactivos para la PCR anidada.	37
Anexo 4. Condiciones de las PCR utilizadas	38
Anexo 5. Soluciones utilizadas para la extracción de ADN.	39
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	41

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Comparación de los resultados de la PCR anidada en las muestras de leche con la prueba de tuberculina.	23
Tabla 2. Comparación de la PCR anidada en calostro con la prueba de tuberculina.	24
Tabla 3. Características de los ocho animales que presentaron lesiones a la IP y los resultados obtenidos en la PCR anidada en muestras de leche, calostro y lavados bronquioalveolares.	25
Tabla 4. Comparación de los resultados de la IP con la PCR anidada en muestras de leche.	28
Tabla 5. Comparación de los resultados de la IP con la PCR anidada en muestras de calostro.	29

LISTA DE FIGURAS.

	Página
Figura 1. Sensibilidad de la PCR anidada	19
Figura 2. Sensibilidad de la PCR anidada.	20
Figura 3. Especificidad de la PCR anidada	21
Figura 4. PCR control	22
Figura 5. Productos de amplificación de la PCR anidada en calostro.	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Definición y Etiología.

La tuberculosis bovina (TB) es causada por *Mycobacterium bovis*, uno de los integrantes del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Es una enfermedad infecciosa y zoonótica que se caracteriza por formar granulomas principalmente en linfonodos de cabeza, tórax y pulmones (Stevens, 1995; Blood y Henderson, 1988).

Las micobacterias son bacilos que miden desde $0.2 - 0.6 \times 1 - 10 \mu\text{m}$, son inmóviles, delgados, y pertenecen al grupo de Gram (+). Son microorganismos intracelulares aerobios facultativos, crecen lentamente (3 a 6 semanas) en medios de cultivo complejos a una temperatura de 37 a 38°C, formando colonias color crema y redondas. Su pared celular tiene un alto contenido de lípidos los cuales le proveen de la característica de ácido alcohol resistencia, hidrofobicidad, resistencia a la desecación y a la acción de los anticuerpos y desinfectantes. Dentro de los lípidos más importantes se encuentran el ácido micólico, lipoarabinomano (LAM), cera D y factor cordón, los cuales juegan un papel importante en la respuesta inmune y en los mecanismos de resistencia de la bacteria (Silva, 1983; Campuzano, 1998; Fenton, 1996).

1.2 Importancia Económica.

Se ha reportado que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y se producen entre 7 y 8.8 millones de casos anuales, de los cuales 95% se presentan en países en vías de desarrollo (OPS, 200; Weedlock, 2002).

La TB es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria ganadera, es un problema que se traduce en barreras no arancelarias de tipo sanitario, causa pérdidas por decomisos, disminución de la producción animal y producción láctea (17% aproximadamente). Asimismo, ocasiona pérdidas indirectas en los costos de programas de control, que generalmente se convierte en la eliminación de animales reactivos (SAGAR, 1998; Rentería, 1996). También se considera una enfermedad zoonótica importante en México, ya que se ha estimado que el 8% de los casos de tuberculosis en humanos se deben a *M. bovis* (Kantor, 1978).

1.3 Epidemiología.

Algunos de los factores de riesgo predisponentes que juegan un papel importante en la presentación de la TB son el hacinamiento, el tamaño del hato, así como probablemente la presencia de enfermedades inmunosupresoras como diarrea viral bovina (DVB) y leucosis bovina, entre otras (Pollock, 2002). En general *M. bovis* provoca la enfermedad en el ganado bovino, cerdos, humanos y ocasionalmente en perros y gatos (Cosivi, 1998), y el humano junto con animales silvestres pueden actuar como reservorios (SAGAR, 1998).

1.4 Transmisión.

La principal vía de transmisión es la aerógena (Francis, 1958; Kantor, 1978; Dannenberg, 1993; Neill, 2001; Morris, 1994; Goodchild, 2001; Costello, 1998). Algunas investigaciones sugieren que la excreción bacteriana en el exudado nasal puede ocurrir básicamente en los estados tempranos de la infección, aumentándose el riesgo cuando los animales se encuentran hacinados y/o con una ventilación deficiente (Neill, 1992; Costello, 1998). Sin embargo, se ha demostrado que la vía digestiva con dosis altas infectivas (4×10^8 organismos) (Goodchild, 2001; Morrison, 2000) a través de ingestión de pastura, agua contaminada, leche y calostro no pasterizados puede ocasionar la enfermedad (Rentería, 1996; Menzies, 2000; Leite, 2003; Wedlock, 2002).

Se ha logrado aislar *Mycobacterium spp.*, *M. bovis* y algunas otras micobacterias de muestras de leche cruda provenientes de vacas clínicamente sanas, colectadas del tanque e incluso de leche pasteurizada (Moda, 1996; Pardo, 2001; Leite, 2003). El calostro es otra forma de eliminación y transmisión poco documentada pero al parecer de gran importancia, ya que su manejo dentro de la explotación influye de manera decisiva en una mayor prevalencia de TB en becerros (Rentería, 1996).

Durante el periodo seco, existen factores que contribuyen al aumento de susceptibilidad de una infección mamaria (Sordillo, 1997). Además existen factores como el estrés provocado por la gestación y parto que estimulan la producción de hormonas, principalmente corticosteroides los cuales tienen efecto negativo sobre el sistema inmune. Asimismo, los cambios en la concentración de progesterona, estradiol y hormona del crecimiento modifican la función de los linfocitos y neutrófilos (Doherty, 1995; Mallard, 1998; Preisler, 2000; Sordillo 1997 y 2002).

Existen otras vías menos frecuentes de transmisión como la genital, cutánea y la congénita (Neill, 1994; Goodchild, 2001). En el caso de los bovinos solo el 5% de las vacas infectadas presentan TB uterina con metritis y el 1% de los becerros se infectan de manera congénita por ruta hematogena (Francis, 1958; Pollock, 2002; Phillips, 2003).

1.5 Patogenia Y Respuesta Inmune.

La calidad de la respuesta inmune en la TB depende en gran parte del estado fisiológico del animal, la dosis infectiva, el manejo y el fin zootécnico, entre otros factores, pero la respuesta de tipo celular predomina durante la enfermedad (Pollock, 2001). Una vez que la bacteria llega a los pulmones y penetra hasta los alveolos es fagocitada por los macrófagos donde puede ser eliminada o sobrevivir gracias a factores de virulencia, tales como su capacidad de inhibición de la fusión fago-lisosoma (Fenton, 1958; Jiménez, 2001). Durante las siguientes semanas la bacteria se multiplica dentro de los macrófagos, los cuales liberan quimiocinas que inducen la migración de neutrófilos, macrófagos y linfocitos. Los antígenos de la micobacteria son procesados y presentados por el MHC II, para activar a los linfocitos T CD4⁺. Otras citocinas como la IL-12 favorecen la diferenciación de linfocitos T cooperadores a tipo 1 (Th1), induciendo además la producción de interferón-gamma (IFN- γ) en etapas tempranas que activa macrófagos y favorece la destrucción del bacilo (Jiménez, 2001; Wedlock, 2002). La formación del

granuloma constituye una de las medidas físicas y químicas de defensa del huésped para localizar y catener el proceso infeccioso (Morrison, 2000; Neill 1994 y 2001; Jiménez, 2001; Pollock, 2001; Wedlock, 2002).

1.6 Lesiones e Inspección Post-mortem (IP)

Aunque muchos de los bovinos infectados son asintomáticos, los signos clínicos dependen de la extensión y localización de las lesiones, pudiendo presentarse tos seca, emaciación y fiebre fluctuante. Generalmente del 70 al 95% de las lesiones encontradas, son localizadas en diversos nódulos linfáticos (NL) de cabeza, cavidad torácica (traqueobronquiales y mediastínicos) y pulmones (Corner, 1990; Whipple, 1996). La presencia de lesiones en la ubre o NL retromamarios es inusual, reportándose solo un 0.3% y 0.4%, respectivamente (Goodchild, 2001). Los granulomas pueden ser de tamaño variable, con una coloración amarilla a naranja, de consistencia cremosa o caseosa debido a la calcificación. Microscópicamente se componen de un centro necrótico con o sin calcificación rodeado por una zona de células como macrófagos, células epiteloides, células gigantes (Langerhans), linfocitos, células plasmáticas y en menor cantidad neutrófilos polimorfonucleares. Esta necrosis caseosa puede estar encapsulada por una capa de tejido conjuntivo fibroso, aunque en lesiones tempranas o iniciales puede no estar presente (Campuzano, 1998; Dannenberg, 1993; Stevens, 1995).

El procedimiento de IP se utiliza para detectar lesiones granulomatosas en diversos órganos de animales reactivos a la prueba de tuberculina, y durante su desarrollo se colectan tejidos para realizar pruebas confirmativas como la histopatología y el aislamiento bacteriano (Corner, 1990; Whipple, 1996).

1.7 DIAGNÓSTICO.

1.7.1 Prueba De Tuberculina.

Esta prueba mide la hipersensibilidad de tipo tardío (HT) y es actualmente usada por la Campaña Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CANETB). Se realiza inoculando un derivado proteico purificado (PPD) intradérmicamente para medir la induración de la piel en el sitio de aplicación a las 72 horas posteriores. Se ha reportado que tiene una sensibilidad del 72 al 81% y una especificidad del 78 al 96% (SAGAR, 1998; Ramirez, 1995; Francis, 1958; Morrison, 2000)

1.7.2 Prueba De Interferón Gamma (IFN- γ)

Esta es una prueba de diagnóstico alternativo para la TB que se basa en la detección de la producción de IFN- γ por los linfocitos T previamente sensibilizados con antígenos específicos de *M. bovis*. La sensibilidad y especificidad de esta prueba son del 94 y 97 al 99% respectivamente (Word, 1990 y 1991;

1.7.3 Prueba De Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)

Esta prueba mide la respuesta inmune humoral hacia *M. bovis*, pero en general se considera que la producción de anticuerpos en animales infectados con TB es baja (Nelly, 1994; Morrison, 2000). Cuenta con una sensibilidad del 30- 60% y una especificidad de 93% (Costello, 1997).

1.7.4 Pruebas Moleculares.

1.7.4.1 Reacción En Cadena De La Polimerasa (PCR)

Es un proceso *in vitro* por medio del cual las cadenas de ADN blanco se duplican con ayuda de una enzima llamada ADN polimerasa, logrando millones de copias de un segmento específico que se pueden visualizar en geles de agarosa por medio de electroforesis (Fuentes, 1998).

La PCR es un método altamente sensible y específico que se basa en la utilización de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos (oligonucleótidos) que actúan como iniciadores en la síntesis de nuevas copias del ADN.

1.7.4.2 Antecedentes Del Uso De La PCR.

Esta metodología se ha descrito para el diagnóstico de TB en diferentes tipos de muestras tanto en humanos como en bovinos, tales como sangre, exudado nasal, tejidos, aspirado bronquial, fluido pleural, etc. (Wards, 1995; Talbot, 1997; Borún, 2001; Rodríguez, 1995 y 1999).

La PCR basada en la amplificación de un fragmento del gen que codifica la proteína MPB70 es altamente sensible y específica en el diagnóstico de TB en humanos y bovinos ya que se ha demostrado la presencia de una sola copia de este gen en cepas de *M. bovis* y bacterias del complejo *M. tuberculosis*, así como su ausencia en 24 especies diferentes de micobacterias y en otros géneros bacterianos (Cousins, 1991 y 1992).

En cuanto al uso de esta técnica en muestras de leche en bovinos, se han obtenido diversos resultados, en donde la sensibilidad de la prueba varía desde 50 UFC de ADN de *M. bovis* AN5 en muestras de leche inoculadas (Pérez, 2002), hasta un 14% (Romero, 1999), un 18% (leite, 2003) y un 100% (Zanini, 1998). En cuanto a muestras de calostro y LBA en bovinos, no se tiene información sobre la identificación de ADN de *M. bovis* por medio de la PCR.

2.0 JUSTIFICACIÓN.

La TB constituye una de las enfermedades de gran importancia en el ámbito mundial debido al impacto que tiene sobre la salud pública y la economía. La principal forma de contagio tanto en el hombre como en el ganado es la vía aerógena, no obstante el consumo de leche y calostro de bovinos tuberculosos representan otra vía de transmisión poco estudiada hasta nuestros días.

Las diferencias entre las técnicas de diagnóstico muestran la necesidad de encontrar métodos más sensibles, sencillos y precisos que ayuden a un diagnóstico más rápido y eficiente como la PCR anidada

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La leche y calostro son algunas de las vías de transmisión de la enfermedad, tanto en el ganado como en el caso del humano, no obstante, son pocos los datos y sería importante analizar por un prueba que cuenta con alta especificidad y alta sensibilidad como la PCR un protocolo sobre la posible presencia de *Mycobacterium bovis* en estas muestras.

4.0 HIPOTESIS.

A mayor número de vacas positivas a la tuberculina mayor frecuencia de identificación de ADN de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en calostro, leche y lavados bronquialveolares.

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

- Estimar la frecuencia con la que se identifica ADN de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en calostro, leche y LBA en bovinos reactivos a la prueba de tuberculina.

5.2 Objetivos Particulares.

- Realizar la prueba de tuberculina a bovinos provenientes de un hato con una alta prevalencia de tuberculosis.
- Obtener muestras de calostro y leche de los bovinos evaluados.
- Obtener los LBA de los bovinos positivos a la tuberculina inmediatamente después de su sacrificio.
- Identificar la presencia de ADN de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de calostro, leche y LBA utilizando la técnica de PCR anidada para el gen MPB70 y estimar la frecuencia para cada tipo de muestra.
- Determinar la asociación de la PCR anidada con la tuberculina y/o con la existencia de lesiones sugestivas de TB a través de métodos estadísticos.

6.0 MATERIAL Y METODOS.

Con la finalidad de evaluar la excreción de *M. bovis*, se utilizaron muestras de calostro, leche y LBA de 56 hembras de la raza Holstein-Freisian, pertenecientes al Rancho Almaraz de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (UNAM) A estos animales se les practicó previamente la prueba de tuberculina como dicta la CANTEB. Asimismo se realizó la IP de los animales reactivos con la finalidad de encontrar lesiones compatibles a TB. Estos datos se relacionaron con la excreción bacteriana medida por la PCR anidada (Diagrama 1).

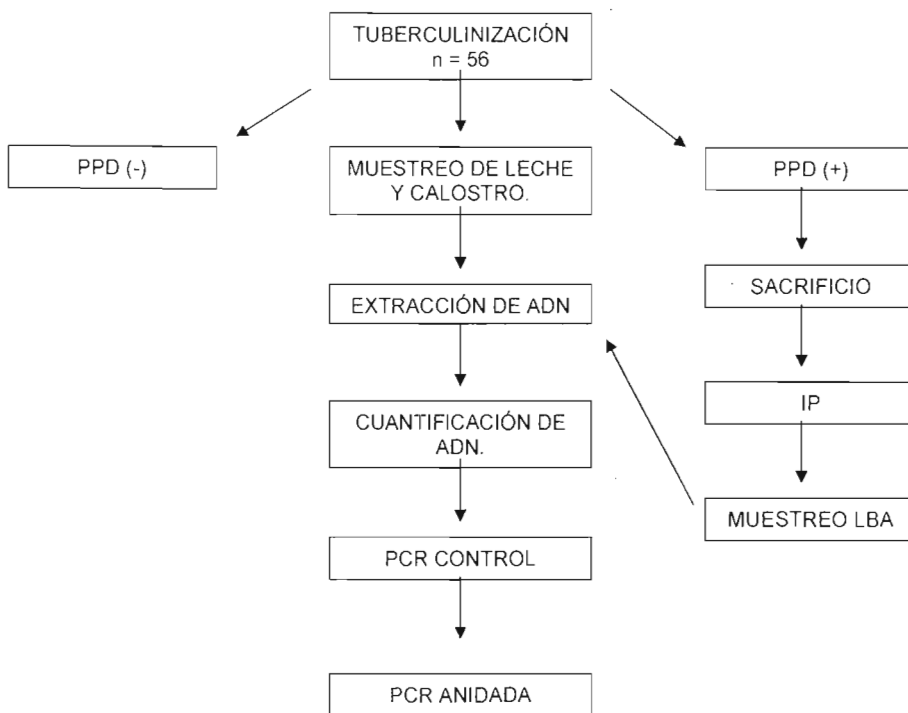


Diagrama 1. Estrategia de trabajo.

6.1 Prueba De Tuberculina Simple Caudal

Se realizó la prueba simple caudal inoculando 0.1 ml intradérmicamente de PPD bovino (PRONAVIBE) en el pliegue ano-caudal, midiendo previamente el grosor de la piel antes de la inoculación y a las 72 horas posteriores. El criterio utilizado para detectar animales reactivos y negativos se tomó de acuerdo a la CANETB, considerando positivos aquellos que mostraron una induración mayor de 4 mm.

6.2 Toma De Muestras De Leche, Calostro Y Lavados Bronquioalveolares

Las muestras de leche fueron tomadas en tubos *Falcon* de 50 ml al momento de la ordeña mecánica, limpiando cada cuarto para evitar contaminación, descartando los primeros chorros de leche (despunte) y cada frasco fue congelado hasta su proceso. En el caso del calostro, este se obtuvo en tubos *Falcon* de 15 ml entre el 1er y 3er día después del parto de la misma forma que la leche, transportándose al laboratorio donde fueron congeladas hasta su proceso.

Para obtener las muestras de LBA, se separaron los pulmones en el momento de la IP y se conservaron en cajas de unisel con hielo para ser trasladados al laboratorio. A cada pulmón se le agregó solución de Hank a través de la tráquea y dando masajes, se recuperó por medio de una bomba de vacío. Los LBA que se recuperaron fueron vaciados en tubos *Falcon* de 15 ml, centrifugados a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en buffer TE 1X para después ser almacenados en un congelador. Previo a la extracción de ADN, cada tubo se diluyó en 1:100 con agua bidestilada y fueron congelados nuevamente en tubos *ependorf* de 1.9 µl hasta su uso.

6.3 IP

Se realizó la IP a los animales positivos a la prueba de tuberculina como lo dicta la CANETB para localizar lesiones sugestivas de TB. Los órganos inspeccionados fueron: Nódulos linfoides (NL) de la cabeza (submandibulares y retrofaríngeos), Tórax (traqueobronquiales, mediastínicos), Canal (cervicales superficiales, inguinales superficiales, iliacos internos y externos, supramamarios y poplíteos) y Tejido pulmonar.

6.4 Extracción De ADN de Calostro, Leche y LBA

De las muestras obtenidas, se realizó extracción de ADN por el método modificado de van Soolingen (Cousins, 1992) (**anexo1**), basado en la utilización de detergentes como el SDS y CTAB, enzimas y alcoholes para precipitar el ADN. El ADN genómico obtenido se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml), por medio de un analizador de rayos UV (*Transilluminador EpiChem II Darkroom, Bioimaging Systems*)

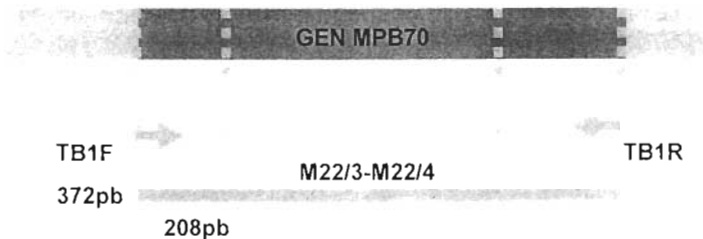
6.5 Cuantificación

La cuantificación del ADN se realizó con un fluorómetro (*VersaFluor™ Fluorometer. BIO-RAD*) por medio de un kit comercial (*Fluorescent ADN Quantitation kit. BIO-RAD*). Además se utilizó un espectrofotómetro (*GeneQuant, Pharmacia Biotech*) para cuantificar las mismas muestras. Las muestras se ajustaron a 100 ng/μl por medio de diluciones con agua bidestilada para facilitar su uso.

6.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Con la finalidad de descartar inhibiciones de la reacción y validar el método se realizó la PCR control siguiendo la metodología descrita por Estrada-Chávez (2004) donde se utilizaron los iniciadores CYB1 (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y CYB2 (5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') (*MWG-Biotech*), los cuales amplifican una región de 375 pb del gen que codifica el Citocromo b del ADN mitocondrial (Cousins, 1991). La amplificación se realizó en un termociclador (*Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400*) y las mezclas de reacción para 20 μl de se muestran en el **anexo 2**.

Para detectar la presencia de *M. bovis* en muestras de calostro, leche y LBA se realizó una PCR, utilizando los iniciadores TB1F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') y TB1R (5'-AGCAGCTGTCAATCATGTA-3') (*MWG-Biotech*), los cuales amplifican una región de 372 pb del gen que codifica a la proteína de secreción MPB70 de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Empleando como templete los productos de amplificación de la PCR simple, se realizó la segunda amplificación (PCR anidada) con los iniciadores M22/3 (5'-GCTGACGGCTGCACTGTCCGGC-3') y M22/4 (5'-CGTTGGCCGGCTGGTTTGGCC-3') (*MWG-Biotech*), los cuales amplifican una región de 208 pb del gen MPB70. La mezcla para la reacción en 20 μl y las condiciones de amplificación se muestran en el **anexo 3 y 4**.



Los productos de amplificación se visualizaron por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% teñido con bromuro de etidio, utilizando un marcador de rango bajo de ADN (*ADNpBR322/Mspl. Biotecnologías Universitarias*).

6.7 ANALISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó la prueba de Cohen's Kappa para medir la concordancia entre la excreción bacteriana en leche, calostro y LBA por medio de la PCR anidada con la prueba de tuberculina y la presencia de lesiones a la IP.

7.0 RESULTADOS

Para este estudio se utilizaron 56 hembras de la raza Holstein Friesian provenientes del Rancho Almaraz de la FESC-C, UNAM de entre 2 y 7 años, con un número de parto entre 1 y 5. El hato presenta una historia de alta prevalencia de TB (hasta 50%) mediante la prueba de tuberculina y actualmente se encuentra en etapa de control con apoyo de la CANETB.

Se realizó la prueba de tuberculina a las 56 hembras, obteniendo un total de 32 animales negativos (57.1%) y 24 positivos (42.9%). Se obtuvieron 44 muestras de leche provenientes de 21 animales reactivos y 23 negativos, 42 muestras de calostro que provenían de 18 animales reactivos y 24 negativos, además de 6 LBA de animales reactivos.

Con la finalidad de identificar la frecuencia de excreción de la micobacteria en leche, calostro, y LBA se utilizó una PCR anidada que amplifica un segmento del gen que codifica la proteína MPB70. Para evaluar la sensibilidad se llevó a cabo la inoculación en muestras de leche y calostro provenientes de una vaca negativa a la tuberculina e IFN- γ , desde 1 fg a 200 ng de ADN de *M. bovis* cepa AN5 (Fig. 1) y desde 125 hasta 16000 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del Bacilo Calmete-Guerin (BCG) donado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Fig. 2). La especificidad de la prueba se obtuvo por medio de la amplificación de los controles *M. tuberculosis* cepa H37Rv y *M. bovis* cepa AN5 y la ausencia de amplificación de la cepa D4 de *M. avium* y agua MILI-Q estéril (Fig. 3). Previo a la PCR anidada y para descartar inhibiciones, se realizó una PCR control para amplificar una región de 375 pb del gen que codifica el Citocromo b del ADN mitocondrial (Fig. 4).

Por medio de la PCR anidada se observó la amplificación en 8 muestras de leche de las cuales 6 provenían de animales reactivos y 2 animales negativos. En cuanto a los 36 animales PCR negativos en leche 15 fueron reactivos y 21 negativos a tuberculina (Tabla 1, Fig. 5). En 26 de las 42 muestras de calostro se logró la amplificación de ADN de la micobacteria, de las cuales 14 provenían de vacas reactivas y 12 de vacas negativas. Dieciséis muestras de calostro fueron negativas (Tabla 2). Por otro lado, Las 6 muestras de LBA provenientes de vacas reactivas fueron PCR negativas.

En cuanto a los resultados obtenidos en la IP, 24 de las 56 hembras muestreadas fueron enviadas a rastro (18 positivas a la tuberculina y 6 negativas) con la finalidad de detectar lesiones compatibles a la TB. De las 24 hembras, 8 presentaron lesiones macroscópicas en NL asociados a tracto respiratorio (mediastínico y traqueobronquial) y pulmón además de NL hepático y NL mesentéricos, mientras que las 16 restantes no presentaron ningún tipo de lesión. De los 8 animales con lesiones, 4 las presentaron en los NL mediastínicos, 2 en NL retrofaringeos, 2 en NL traqueobronquiales, 2 en pulmón, 1 en NL mesentérico y 1 en NL hepático. De estas muestras, 6 presentaron lesiones en histopatología y fueron positivas a la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) (Tabla 3)

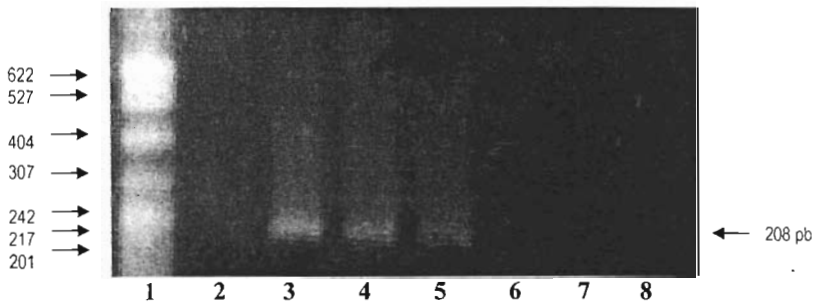


Figura 1. Sensibilidad de la PCR anidada. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: cepa *M. avium* D4. Carril 3: cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 4: cepa *M. bovis* AN5. Carril 5: 100 fg de ADN de *M. tuberculosis*. Carril 6: 200 fg ADN de *M. tuberculosis*. Carril 7 y 8: agua. Gel de agarosa al 2.5 % teñido con bromuro de etidio (BE).

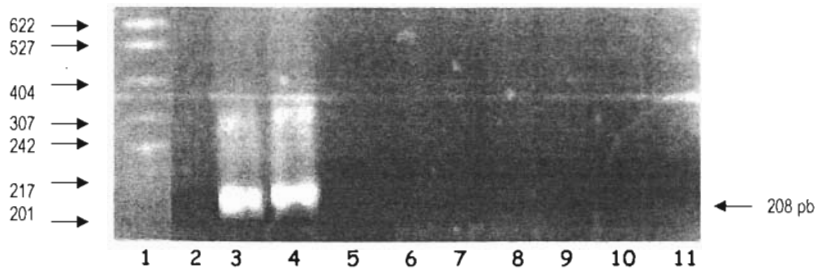


Figura 2. Sensibilidad de la PCR anidada. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: cepa *M. avium* D4. Carril 3: cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 4: cepa *M. bovis* AN5. Carril 5 – 7: 1000, 400 Y 200 UFC de BCG *M. bovis* inoculadas en calostro. Carril 8 -10: 400, 200 y 125 UFC BCG *M. bovis* inoculadas. Gel de agarosa al 2% teñido con BE.

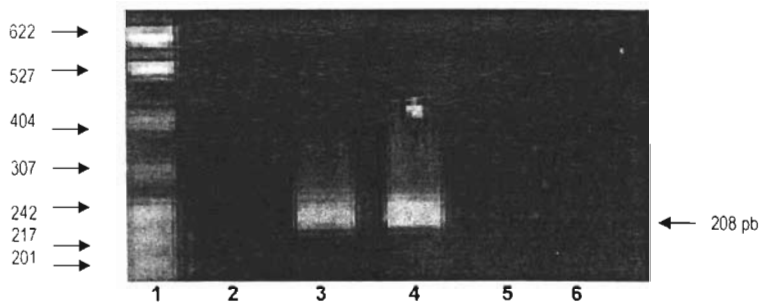


Figura 3. Especificidad de la PCR anidada. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: cepa *M. avium* D4. Carril 3: cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 4: cepa *M. bovis* AN5. Carril 5 Y 6: agua. Gel de agarosa al 2.5 % teñido con BE.

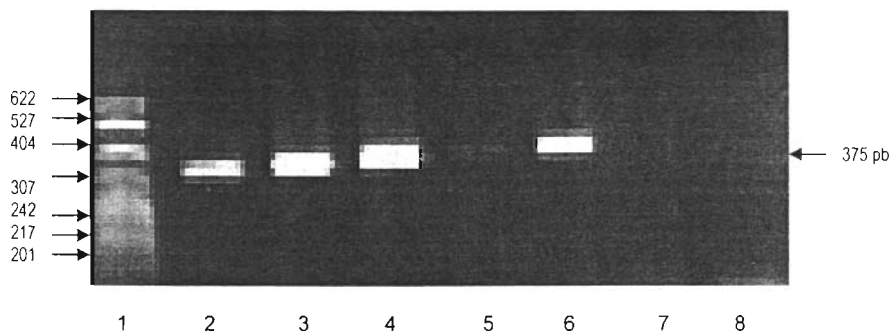


Figura 4. PCR control. Productos de amplificación de 375 pb del gen que codifica el Citocromo b en muestras de leche. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: control positivo, muestra de exudado nasal. Carril 3-6: muestras de calostro amplificadas. Carril 7: muestra negativa. Carril 8: agua. Gel de agarosa al 2.5 % teñido con BE.

Tabla 1. Comparación de los resultados de la PCR anidada en las muestras de leche con la prueba de tuberculina.

n=44	PPD (+)*	PPD (-)	TOTAL
PCR (+)	6(75) ^a	2(25)	8(18.2)
PCR (-)	15(41.7)	21(58.3)	36(81.8)
TOTAL	21(47.7)	23(52.3)	44

$$K^b = 0.20$$

*Resultado de la prueba de tuberculina

^a Porcentaje

^b Valor de Cohen's Kappa

Tabla 2. Comparación de la PCR anidada en calostro con la prueba de tuberculina.

n=42	PPD (+)*	PPD (-)	TOTAL
PCR (+)	14(53.8) ^a	12(46.2)	26(62)
PCR (-)	4(25)	12(75)	16(38)
TOTAL	18(42.9)	24(57.1)	42

$K^b = 0.26$

*Resultado de la prueba de tuberculina

^a Porcentaje

^b Valor de Cohen's Kappa

Tabla 3. Características de los ocho animales que presentaron lesiones a la IP y los resultados obtenidos en la PCR anidada en muestras de leche, calostro y LBA.

ID ^a	EDAD ^b	LOC ^c	TB	HP ^d	ZN ^e	PCR LECHE	PCR CALOSTRO	PCR LBA
8	9	Tb, P, Ms	+	+	+	+	+	-
213	6	M, P	+	+	+	+	+	-
206	6	M, Hp	+	+	+	+	+	-
220	6	Rf, Tb	+	+	+	-	**	-
316	5	Rf	+	+	+	-	**	**
59	7	M	-	-	-*	-	**	**
208	4	M	-	-	-*	-	**	-
212	6	M	+	+	+	-	-	-

Tb: traqueobronquial; P: pulmón; M: mediastínico; H: hepático; Ms: mesentérico; Rf: retrofaríngeo.

*La muestra enviada para el estudio medía menos de 2 mm de grosor.

**No se obtuvo muestra.

^a Número de identificación

^b Edad en años.

^c Localización macroscópica de las lesiones.

^d Histopatología.

^e Tinción Ziehl-Neelsen.

Al comparar los resultados de la PCR anidada en leche con los obtenidos en la IP, se observó que solo 8 de los animales tuvieron lesiones. Catorce muestras de leche fueron negativas a la PCR, de las cuales 6 provenían de vacas con lesiones (**Tabla 4**). En la comparación de los resultados de la PCR anidada en calostro con la IP, 13 de 17 muestras amplificaron, de las cuales 3 provenían de vacas con lesiones. Solamente una de las muestras provenía de una vaca con lesiones que fue negativa a la PCR anidada y las 3 muestras restantes negativas a la PCR anidada pertenecían a vacas sin lesiones (**Tabla 5**).

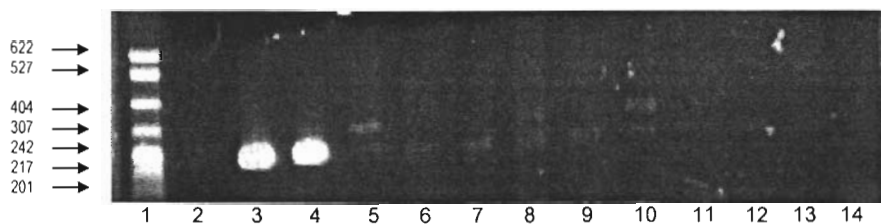


Figura 5. Productos de amplificación de la PCR anidada en calostro. Carril 1: marcador de peso molecular. Carril 2: cepa *M. avium* D4. Carril 3: cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Carril 4: cepa *M. bovis* AN5. Carril 5-13: muestras amplificadas de calostro. Carril 14: agua. Gel de agarosa al 2.5 % teñido con BE.

Tabla 4. Comparación de los resultados de la IP con la PCR anidada en muestras de leche.

n=19	Lesiones	S/ lesiones	TOTAL
PCR +	2(40) ^a	3(60)	5(26.3)
PCR -	6(42.9)	8(57.1)	14(73.7)
TOTAL	8(42.1)	11(57.9)	19

^a Porcentaje

Tabla 5. Comparación de los resultados de la IP con la PCR anidada en muestras de calostro.

n=17	Lesiones	S/lesiones	TOTAL
PCR +	3(23.1) ^a	10(76.9)	13(76.5)
PCR -	1(25)	3(75)	4(23.5)
TOTAL	4(23.5)	13(76.5)	17

^a Porcentaje

8.0 DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la frecuencia con que se excreta *M. bovis* en leche, calostro y LBA en vacas tuberculosas por medio de la PCR anidada, así como la concordancia que existe entre estos resultados con la tuberculina y la IP. La transmisión de *M. bovis* en la tuberculosis del ganado y del humano es objeto de gran interés, ya que muchas investigaciones ponen de manifiesto la amenaza de esta zoonosis en países en desarrollo y el aumento de la incidencia así como por las pérdidas económicas que ocasiona. Se estima que en Latinoamérica la prevalencia de TB en humanos es cercana al 3.1% del total de casos y un 8% de la tuberculosis es extrapulmonar (Cosivi, 1998).

La principal vía de transmisión en el bovino es la aerógena (Francis, 1958; Cantor, 1978; Dannenberg, 1993; Nelly, 2001; Morris, 1994; Goodchild, 2001; Costello, 1998) y más del 15% del ganado con TB excreta la micobacteria a través del tracto respiratorio (Costello, 1998; Ritacco, 1991). Sin embargo, se considera que la leche y el calostro pudieran ser una vía importante en la transmisión para el humano, dando como resultado la presentación extrapulmonar de la enfermedad (Wedlock, 2002; Moda, 1996). Diversos trabajos mencionan el aislamiento de *M. bovis* en muestras de leche de vacas clínicamente sanas (Batis, 1989; Leite, 2003), de muestras de tanques de almacenamiento (Guindi, 1980) y de vacas sospechosas o positivas a tuberculina (Pardo, 2001) Sin embargo se ha observado que solo entre el 1 y 5% de las hembras positivas a tuberculina pueden llegar a excretarla por leche (Collins, 2001; Zanini, 1998).

En el caso del ganado, la leche y el calostro se consideran una fuente importante de nutrición, el calostro sobre todo, provee los primeros días de vida de la inmunidad pasiva necesaria para que el neonato sobreviva (Rentería, 1996; Mallard, 1998), sin embargo se ha demostrado que el uso de la leche y el calostro derivado de madres rectoras aumenta la posibilidad de exposición a *Mycobacterium spp* (Rentería, 1996).

La prueba de tuberculina es el método de diagnóstico utilizado en México para detectar animales infectados aunque una de las desventajas es la deficiente detección de algunos animales que no responden a la prueba por no montar una hipersensibilidad tardía (animales anérgicos) (Ritacco, 1991) por lo que constituyen una fuente de infección para todo el hato (Ritacco, 1991; Monaghan, 1994). Por esta razón se deben implementar pruebas complementarias rápidas y eficientes para el diagnóstico de esta enfermedad (Ryan, 2001; Zanini, 1998; Perez, 2002). Asimismo, a causa de los problemas asociados con el aislamiento de la micobacteria (Perez, 2002), se ha considerado utilizar como prueba complementaria la PCR empleando iniciadores específicos para amplificar fragmentos del ADN del genoma de bacterias del complejo *M. tuberculosis* (Cousins, 1991).

Se ha descrito la detección de ADN de *M. bovis* en muestras como sangre, exudado nasal, tejidos y leche (Wards, 1995; Talbot, 1997; Borún, 2001; Zanini, 1998; Perez, 2002) pero ninguna para el caso de calostro. El uso de la PCR en el diagnóstico de la TB en humanos y bovinos por medio de la amplificación de un fragmento del gen que codifica la proteína MPB70 ha sido descrita anteriormente mostrando buena sensibilidad y excelente especificidad (Cousins, 1991 y 1992)

La PCR anidada que se utilizó para este estudio presentó una sensibilidad de 125 UFC de BCG inoculadas en muestras de leche y calostro, lo cual asemeja a los trabajos descritos por Zanini (1998), en donde se inocularon muestras de leche con ADN de la cepa AN5 de *M. bovis* obteniendo una sensibilidad de 10^2 UFC, y Pérez (2002) en donde se obtuvo una sensibilidad de 100 UFC por medio de la extracción de ADN convencional. La especificidad de la PCR anidada se demostró con la amplificación de la región de 208 pb del gen que codifica la proteína MPB70 utilizando ADN de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis* AN5 y *M. tuberculosis* H37Rv) y la ausencia total de amplificación de ADN de la cepa D4 de *M. avium*. Esto permite reafirmar el uso de esta prueba en estudios epidemiológicos de micobacterias patógenas causantes de TB.

En este trabajo se observó que de las 44 muestras de leche recolectadas 8 amplificaron bajo las condiciones de PCR establecidas. De las muestras de leche 6 fueron PCR positivas provenientes de vacas rectoras. Este evento se ha reportado previamente por diversos autores, en donde se sabe que las vacas tuberculosas son una fuente importante de infección para el hato (Pollock, 2001; Costello, 1998). Por otro lado, 2 de las vacas negativas a la tuberculina fueron positivas a la PCR en leche, presumiendo que estos animales fueran anérgicos a la prueba y excretores al mismo tiempo. La excreción bacteriana dependerá en gran parte del sistema inmune del bovino (Pollock, 2001) y de diversos factores epidemiológicos, tales como el estrés debido al manejo, mala alimentación (Doherty, 1995) y la presencia de enfermedades inmunosupresoras (Larsson, 1988), entre otras.

De las muestras de leche provenientes de vacas rectoras 15 fueron negativas a la PCR. Se debe de tomar en cuenta que el muestreo que se realizó fue de tipo transversal (una vez), pudiendo haber perdido un período de excreción bacteriana, sobre todo si se sabe que la excreción de la micobacteria es intermitente, precedida por un período constante de excreción postinfección (Menzies, 2000). Es posible que la excreción de *M. bovis* esté subestimada sobre todo por el tipo de muestreo. Diversos autores han señalado la baja frecuencia de detección de este patógeno en muestras de leche por medio de cultivo y PCR (Romero, 1996; Pardo, 2001; Perez, 2002; Leite, 2003).

Otras razones por las cuales algunas de las muestra provenientes de vacas rectoras fueron negativas a la PCR, incluyen la diversidad celular de la leche, en donde el ADN de la micobacteria puede representar una fracción pequeña comparado con el total de ADN de la muestra. Además tenemos que la realización de diluciones con agua estéril en las muestras para reducir la posibilidad de inhibición en la PCR control y los métodos de extracción y/o decontaminación pueden llegar a disminuir la viabilidad de la bacteria (Perez, 2002; Kantor, 1998; Sreevatsan 2000).

Existen reportes de la presencia de la micobacteria en muestras de leche en vacas clínicamente sanas (Batis, 1989), lo cual puede deberse a la migración bacteriana por vía linfática o hematológica, como en el caso de humanos, en donde la localización mamaria de *M. tuberculosis* puede producirse por diseminación a partir de un foco contiguo por vía hematológica, o lo que es más frecuente por vía linfática.

En lo que respecta a calostro se logró identificar la bacteria en un mayor número de muestras siendo 14 PCR positivas provenientes de vacas rectoras, y 12 de vacas negativas a tuberculina. Por

otro lado, el 25.5% de las muestras PCR negativas provenían de vacas rectoras. Los valores de concordancia obtenidos entre la excreción de *M. bovis* en leche y calostro con la prueba de tuberculina se consideran bajos (20 y 26% respectivamente), debido quizá al tipo de muestreo realizado, a la intermitencia de la excreción, a todos los diversos factores que pueden favorecer su eliminación y al bajo número de muestras obtenidas. Sin embargo, se observó que un gran porcentaje de animales tuberculosos son capaces de diseminar la bacteria por la leche y sobre todo por calostro.

En comparación con la leche, hubo un mayor número de animales que excretaron la bacteria en calostro. En diversos estudios han demostrado que durante el periodo seco hay múltiples factores que predisponen y contribuyen a la susceptibilidad de la glándula mamaria a infecciones, tales como el estrés provocado por la misma gestación y el parto, lo que provoca la liberación de corticosteroides, teniendo efecto negativo sobre el sistema inmune (Sordillo, 2002; Mallard, 1998; Preisler, 2000). La acumulación de leche en la glándula provoca que se ensanche el canal de la teta y permite la entrada de microorganismos ambientales, además de que las vacas no se ordeñan durante dos meses consecutivos (vacas secas), por lo que no hay arrastre de bacterias al exterior (Hurley, 1989; Díaz, 1992). También existen diferentes estudios donde señalan que durante este periodo el número de los macrófagos y neutrófilos están disminuidos, además de que existe una alteración en las funciones de defensa y en la presentación de antígenos mediante el MHC II (Mallard, 1998; Díaz, 1992; Sordillo 1997 y 2002).

De los animales sacrificados 16 de 24 no presentaron lesiones, lo cual se considera un porcentaje alto para el caso de un hato con alta prevalencia (Estrada, 2001). No se debe descartar que los animales presentaran una infección reciente, por lo que las lesiones eran pequeñas y difíciles de ver a simple vista (Whipple, 1996). También no se debe olvidar que la IP está sujeta al error humano (Corner, 1990 y 1994). Los 8 bovinos restantes presentaron lesiones, ninguna en glándula mamaria ni el NL supramamarios, lo cual se apega al bajo porcentaje de animales con lesiones en estos órganos (Goodchild, 2001; Menzies, 2000). La mayoría de estas lesiones se localizaron en NL asociados a tracto respiratorio y cabeza (mediastínicos, traqueobronquiales, retrofaringeos) concordando con lo previamente reportado por diversos autores (Goodchild, 2001; Whipple, 1996). Dos animales (No. 206 y 08), presentaron lesiones en NL hepático y NL mesentérico, pudiendo deberse a una infección diseminada a partir del foco primario (Goodchild, 2001).

De los 8 animales con lesiones, 3 de ellos fueron PCR positivos en leche, 2 de estos con lesiones en pulmón. Se ha reportado que los casos abiertos de tuberculosis son aquellos donde los animales presentan lesiones en pulmón, los cuales son importantes en la diseminación de la enfermedad (Goodchild, 2001). Sin embargo no se descarta la posibilidad de lesiones microscópicas, no consolidadas, en un órgano diferente a pulmón de donde se libere la micobacteria (Neill, 1992; Cassidy, 1999).

Existe un número reducido de estudios sobre la importancia de la leche y calostro en la transmisión de la micobacteria (Rentería, 1996), aunque existen reportes donde se sugiere que una vaca con mastitis tuberculosa puede infectar un gran número de becerros (Francis, 1947; Monies,

2000) por ello es necesario dar un mayor énfasis en la importancia a la vía digestiva como forma de transmisión entre el ganado, ya que puede ser un factor determinante para que la TB persista en un hato de alta prevalencia. Asimismo, es primordial hacer hincapié en la importancia de ésta zoonosis, ya que este trabajo confirma que el ganado tuberculoso excreta la bacteria de manera importante, es por eso que se debe crear una cultura de pasteurización de leche, sus derivados y manejo del calostro para controlar dicha transmisión.

Las pruebas moleculares como la PCR anidada en comparación con el cultivo bacteriano, puede ser definitivamente una herramienta fácil, rápida e importante para el control de la transmisión de la TB en el mismo hato, ya que mediante su empleo se puede seleccionar un banco de calostro libre de *M. bovis* y así controlar o disminuir la transmisión entre los mismos animales.

9.0 CONCLUSIONES.

1. El reciente trabajo manifiesta la importancia de tener un método de diagnóstico más sencillo y específico para detectar animales excretores.
2. En calostro hay una mayor frecuencia de identificación de ADN de micobacterias del complejo *M tuberculosis* en comparación con leche y LBA este resultado es de gran importancia pues son animales que pueden estar diseminando la enfermedad.
3. El buen manejo de la leche y calostro son factores importantes para evitar la transmisión de la TB por ello se recomienda el uso de sustitutos o bancos de calostro libres de TB en explotaciones con alta prevalencia.
4. Se debe dar un mayor énfasis a la investigación sobre la transmisión vía digestiva ya que la prevalencia en un hato puede persistir por esta razón.

ANEXO 1

METODO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.

1. Transferir las muestras a tubos eppendorf de 1.5 o 1.9 ml IDENTIFICADOS, centrifugar a 13.000 rpm (*Centrifuga Eppendorf 5415D*) durante 10 min. y decantar el sobrenadante en un recipiente con cloro.
2. Centrifugar nuevamente con 1 ml de PBS 1X y decantar el sobrenadante sin tirar la grasa, repetir una o dos veces este paso antes de proceder con el paso 3.
3. Agregar 1 ml de buffer TE 1X, repetir la centrifugación durante 3 min. y decantar hasta dejar 400 μ l de buffer TE aproximadamente.
4. Agregar 50 μ l de lisozima (*SIGMA*) (10mg/ml), agitar con vortex hasta mezclar e incubar 1 hora a 37° C
5. Agregar 70 μ l de SDS al 10% y 6 μ l de Proteinasa K (*SIGMA*) (10mg/ml) agitar con vortex (*Vortex-genie 2*) hasta mezclar e incubar 10 min. a 65° C. Se puede dejar toda la noche a 45°. Después de la incubación se puede guardar el tubo a -20° en congelación por tiempo indefinido.
6. Agregar 100 μ l de cloruro de sodio (NaCl 5M)
7. Agregar 80 μ l de una solución CTAB/ NaCl precalentada 10 min. a 65 ° (4.1 g NaCl en 80 de agua estéril más 10g de CTAB y ajustar a 100 ml), agitar con vortex hasta que el contenido del tubo se torne blanco lechoso e incubar 10 min. a 65° C. Agregar un volumen igual de cloroformo / alcohol isoamilico 24:1, agitar con vortex hasta mezclar y centrifugar 5 min. a 13,000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante de cada tubo -líquido claro de la parte superior aproximadamente 450 a 600 μ l- a un tubo nuevo identificado, evitando tomar la interfase.
9. Agregar 0.6 -1.0 volumen (aprox. 400-600 μ l) de isopropanol absoluto para precipitar los ácidos nucleicos. Incubar a -20° C en congelación durante 30 o toda la noche. Se puede quedar indefinidamente.
10. Centrifugar 30 min. a 13,000 rpm y decantar el sobrenadante en un frasco.
11. Lavar la pastilla de ADN (blanca o ámbar) en el fondo del tubo con 1 ml de etanol al 70% frío.
12. Centrifugar 2 min. a 13,000 rpm y decantar el sobrenadante teniendo mucho cuidado de no tirar la pastilla.
13. Secar la pastilla en el evaporador (*Eppendorf vacufuge™*) aproximadamente 6 min. a 45° C y resuspender en 50 μ l con agua desionizada mili-Q y calentar a 65-80° C por 5 a 10 min. en baño maría.
14. Visualizar el ADN extraído en geles de agarosa al 1% (1.2 μ l Bromuro de etidio 10 mg/100 ml de gel) a 100 voltios durante 40 a 50 minutos y observar en el transiluminador (*EpiChemii Darkroom, Bioimaging Systems*)

ANEXO 2
CONCENTRACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS
PARA LA AMPLIFICACIÓN EN 20 μ l DE LA PCR CONTROL.

	STOCK	[]* FINAL	VOLUMEN
Buffer^a	10 X	1X	2 μ l
dNTP's^a	20 mM	1 mM	2 μ l
Magnesio^a	30 mM	2 mM	1.6 μ l
CYB1^b	20 pM	0.5 pM	0.5 μ l
CYB2^b	20 pM	0.5 pM	0.5 μ l
Taq^a	50 UI / μ l	3 UI	0.5 μ l
ADN	100 ng / μ l	**	**
Agua	c.b.p 20 μ l	cbp 20 μ l	cbp 20 μ l

*Concentración.

^aBioteecnologías Universitarias

^bMWG-Biotech

**Se trabajó un rango de 100-500 ng

ANEXO 3
CONCENTRACIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN EN 20 μ l DE LA PCR ANIDADA

	STOCK	[]* FINAL	VOLUMEN
Buffer^a	10 X	1X	2 μ l
dNTP's^a	20 mM	1 mM	2 μ l
Magnesio^a	30 mM	2 mM	1.6 μ l
TB1R^b	20 pM	0.8 pM	0.8 μ l
TB1F^b	20 pM	0.8 pM	0.8 μ l
M22/3^b	20 pM	0.4pM	0.4 μ l
M22/4^b	20 pM	0.4pM	0.4 μ l
Taq^a	50 UI / μ l	3 UI	0.5 μ l
ADN	100 ng / μ l	**	**
Agua	c. b. p 20 μ l	c. b. p 20 μ l	c. b. p 20 μ l

*Concentración.

^aBiotecnologías Universitarias

^bMWG-Biotech

**Se trabajó un rango de 100-500 ng

ANEXO 4
CONDICIONES DE LAS PCR UTILIZADAS EN EL TRABAJO.

PRIMER	REGIÓN AMPLIFICADA	PB *	NO. CICLOS	CONDICIONES.
CYB1-CYB2	Citocromo b.	375	30	94°C 30'' 58°C 40'' 72°C 30''
TB1R-TB1F	MPB70	372	20	94°C 30'' 58 °C 1' 72 °C 1'
M22/3-M22/4	MPB70	208	30	94°C 30'' 68 °C 30'' 72 °C 30''

* pares de bases

ANEXO 5

SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN.

PBS (BUFFER DE FOSFATOS) 1X

Cloruro de sodio (NaCl) 8 g
Cloruro de potasio (KCl) 0.2 g
Fosfato de sodio (Na_2PO_4) 1.15 g
Fosfato de potasio (K_2PO_4) 0.2 g
Agua bidestilada 800 ml
Ajustar el pH a 7.3 y aforar a 1000 ml

NaCl 5M

Disolver
NaCl 146.1 g
Agua 400 ml
Aforar a 500 ml
Esterilizar en autoclave

TE 1X

Tris base 1.21 g
EDTA 0.372 g
Agua bidestilada 800 ml
Ajustar pH a 7.4-7.6 con HCl
Aforar a 1000 ml
Esterilizar en autoclave

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

SDS (DUODECIL SULFATO DE SODIO) 10%

Duodecil sulfato de sodio 10 g
Agua bidestilada 90 ml
Calentar a 68° C para disolver
Ajustar pH 7.2 y aforar a 100 ml
Filtrar con membrana 0.2 μm
No refrigerar

TBE 10X (BUFFER DE CORRIDA)

Tris base 108 g
Ac. Bórico 55 g
Agua bidestilada 900 ml
Disolver estos 3 y después añadir EDTA (200 mM pH 8.0) 100ml
Aforar a 1000 ml.

BUFFER DE CARGA

Agua 6.5 ml
Azul de bromofenol 25 mg
Xilen 25 mg
Glicerol 7 ml

EDTA 200 mM pH 8.0

EDTA 7.45 g
Agua bd 80 ml
Ajustar pH a 8.0 con NaCl
Aforar a 100 ml

CTAB (N-cetil-N,N,N-trimetil bromuro amonio) /NaCl

Na Cl 4.1 g
CTAB 10 g
Agua 100 ml
Disolver a 65°C
No esterilizar en autoclave.

CLOROFORMO / ALCOHOL ISOAMÍLICO (1:24)

Cloroformo 96 ml
Alcohol isoamilico 4 ml
Mezclar

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Antognoli MC, Salman MD, Triantis J, Hernandez J, Keefe T. 2001. A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of mycobacterium bovis in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. *J Vet Diagn Invest.* Mar;13(2):111-6.}
2. Batish BV, Yadav JS, Grover L. 1989. Detection of tubercle bacilli in milk. *Livestoc Adviser.* 4 (1): 38-42.
3. Blood DC; Henderson JA. 1988. *Medicina Veterinaria.* 6a edición. Mc Graw Hill. 670-691.
4. Borun M, Sajduda A, Pawlowska I, McFadden JJ, Dziadek J. 2001. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples using insertion sequences IS6110 and IS990. *Tuberculosis (Edinb).* 81(4):271-8.
5. Campuzano Granados Jaime. Comparación de diferentes pruebas anatomopatológicas y microbiológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. 1998. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias: Patología Animal. UNAM.
6. Cassidy JP, Bryson DG, Neill SD. 1999. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with Mycobacterium bovis. *Vet Rec.* Feb 6;144(6):139-42.
7. Collins DM. 2001. Virulence factors of Mycobacterium bovis. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2):97-102.
8. Corner L, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, Rothel JS. 1990. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust Vet J.* Nov;67(11):389-92.
9. Corner LA. 1994. Post mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. *Vet Microbiol.* May;40(1-2):53-63.
10. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. 1998. Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries. *Emerg Infect Dis.* Jan-Mar;4(1):59-70.
11. Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF. 1998. A study of cattle-to-cattle transmission of Mycobacterium bovis infection. *Vet J.* May;155(3):245-50.
12. Costello E, O'Reilly PF, Yearsley DK, Collins JD, Monaghan ML, Basset HF. 1997. A study of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of tuberculosis in cattle. *Ir. Vet. J.* 50: 35-8.
13. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* Jan;30(1):255-8.
14. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of Mycobacterium bovis. *Vet Microbiol.* Apr;27(2):187-95.
15. Dannenberg AM Jr. 1993. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis *Hosp Pract (Off Ed).* Jan 15;28(1):51-8.

- 16 de Kantor IN, Roswurm JD. 1978. Mycobacteria isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *Am J Vet Res* 39(7):1233-4
- 17 De Kantor. 1998. Micobacterias aisladas de muestras de leche en Buenos Aires, Argentina. *Rev. Arg. Tuberc. Enf. Pul.* 37: 57-59.
- 18 Diaz OF, Santiago CJ. 1992. Mecanismos de defensa de la glándula mamaria bovina en las fases de involución y lactación. *Vet Méx.* XIII: 4.
- 19 Doherty ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC, Monaghan ML. 1995. Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res* Oct;56(10):1300-6.
- 20 Doherty ML, Monaghan ML, Bassett HF, Quinn PJ, Davis WC. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996 Jan;49(4):307-20.
21. Estrada-Chávez C, Mancilla, Arriaga DC, Pérez González, Diaz OF. 2001. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Vet Méx.* 32 (3): 207-211
22. Fenton MJ, Vermeulen MW. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun.* 64(3):683-90.
23. Francis J. 1947. *Bovine tuberculosis including a contrast with human tuberculosis.* London: Staples Press.
24. Francis J. 1958. *Tuberculosis in animals and man. A study in comparative pathology.* Cassel and Compy Limited. London.
25. Fuentes XA, Castiñeiras MJ, Queralto JM. 1998. *Bioquímica y patología molecular.* Editorial Reverte S. A. Vol 1. 2ª Edición.
26. Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2):23-41.
27. Grange JM. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis.* 81(1-2):71-7.
- 28 Guindi SM, Ahmed OL, Awad WM, El-Saban MS, Saban MA. 1980. Incidence of bovine and human tubercle bacilli in milk and milk products. *Agr. Res. Rew.* 58 (1): 78-84
29. Hurley WL. 1989. Mammary gland function during involution. *J Dairy Sci.* Jun;72(6):1637-46.
- 30 Jiménez MMC, Báez SR, Linares CM, Chávez SR et al. 2001. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 14 (1): 39-48.
- 31 Larsson B, Fossum C, Alenius S. 1988. A cellular analysis of immunosuppression in cattle with mucosal disease. *Res Vet Sci.* Jan;44(1):71-5
- 32 Leite CQ, Anno IS, Leite SR, Roxo E, Morlock GP, Cooksey RC. 2003. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Apr;98(3):319-23.

33. Mallard BA, Dekkers JC, Ireland MJ, Leslie KE, Sharif S, Vankampen CL, Wagter L, Wilkie BN. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification on dairy cow and calf health. *J Dairy Sci.* Feb;81(2):585-95.
34. Menzies FD, Neill SD. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J.* Sep;160(2):92-106.
35. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tuber Lung Dis.* Apr;77(2):103-8.
36. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. 1994. The tuberculin test. *Vet Microbiol.* May;40(1-2):111-24.
37. Monies RJ. LP-TB and BVD in a group of housed calves. Paper presented at the Spring Meeting of the British Cattle Veterinary Association. Ormskirk, 11-13 April, 2000.
38. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet Microbiol.* May;40(1-2):153-77.
39. Morrison WI, Bourne FJ, Cox DR, Donnelly CA, Gettinby G, McNerney PJ, Woodroffe R. 2004. Potential use of vaccination in cattle or badgers to control bovine tuberculosis. *Dev Biol (Basel)* 119:351-9.
40. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2):79-86.
41. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollock JM, Clements A, Walton E, Bryson DG. 1994. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec.* Aug 6;135(6):134-5.
42. Neill SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TG. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet Rec.* Jul 18;131(3):45-7.
43. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.* May;40(1-2):41-52.
44. OPS. Boletín Epidemiológico. 200. Bol. 21, No. 1.
45. Pardo J, Galindo I, Navarro LM, Querol R. 2000. Bilateral tuberculous mastitis in a woman infected by the human immunodeficiency virus. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Feb;18(2):98-9.
46. Pardo RB, Langoni H, Mendonca LJP, Chi KD. 2001. Isolation of *Mycobacterium spp.* in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. *Braz J Vet. Res. Anim Sci* 38(6): 284-287
47. Perez A, Reniero A, Fortes A, Meregalli S, Lopez B, Ritacco V. 2002. Study of *Mycobacterium bovis* in milk using bacteriological methods and the polymerase chain reaction. *Rev Argent Microbiol.* Jan-Mar;34(1):45-51.
48. Phillips CJ, Foster CR, Morris PA, Teverson R. 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Res Vet Sci.* Feb;74(1):1-15.
49. Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP, Neill SD. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 81(1-2):103-7.

50. Pollock JM, Neill SD. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J.* 163(2):115-27.
51. Preisler MT, Weber PS, Tempelman RJ, Erskine RJ, Hunt H, Burton JL. 2000. Glucocorticoid receptor expression profiles in mononuclear leukocytes of periparturient Holstein cows. *J Dairy Sci.* Jan;83(1):38-47.
52. Ramírez CC, Valero EG, Arriaga DC. 1995. Comparación del ELISA con la tuberculinización en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Tec. Pec. Mex.* 33(3): 148-158.
53. Rentarí ET; Hernández AJ. 1996. Tuberculosis in dairy calves: risk of *Mycobacterium spp.* Exposure associated with management of colostrum and milk. *Prev. Vet. Med.* 27: 23-27.
54. Ritacco V, Lopez B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* May;50(3):365-7.
55. Rodríguez JG, Fissanoti JC, Del Portillo P, Patarroyo ME, Romano MI, Cataldi A. 1999. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol.* Jul; 37(7):2330-2.
56. Rodríguez JG, Mejía GA, Del Portillo P, Patarroyo ME, Murillo LA. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Microbiology.* Sep;141 (Pt 9):2131-8.
57. Romero RE, Garzon DL, Mejía GA, Monroy W, Patarroyo ME, Murillo LA. 1999. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Can J Vet Res.* Apr;63(2):101-6.
58. Romero Tejeda Aurora. Asociación de la excreción de *Mycobacterium bovis* con la respuesta inmune específica en un hato de alta prevalencia. 2003. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción Animal. UNAM.
59. Ryan TJ, Buddle BM, De Lisle GW. 2000. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res Vet Sci.* Aug;69(1):57-61.
60. SAGAR.1998. Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis. Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis.
61. Sauret J, Jolis R, Ausina V, Castro E, Cornudella R. 1992. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tuber Lung Dis.* Dec;73(6):388-91.
62. Silva, MT; Macedo, MP. 1983. A comparative ultrastructural study of the membranes of *Mycobacterium leprae* and cultivable mycobacteria. *Bio. Cell.* 47. 383-386
63. Sordillo LM, Shafer-Weaver K, DeRosa D. 1997. Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci.* Aug;80(8):1851-65.
64. Sordillo LM, Streicher KL. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* Apr;7(2):135-46
65. Sreevatsan S, Bookout JB, Ringpis F, Perumaalla VS, Ficht TA, Adams LG, Hagius SD, Elzer PH, Bricker BJ, Kumar GK, Rajasekhar M, Isloor S, Barathur RR. 2000. A multiplex approach to

- molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Clin Microbiol.* Jul;38(7):2602-10.
66. Stevens, J. 1995. *Mycobacterium bovis* infection in Animals and Humans. Editores: Thoen. Ch. Steele. J. Iowa State University Press / AMES.
 67. Taibot EA, Williams DL, Frothingham R. 1997. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* Mar;35(3):566-9.
 68. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* Feb;43(2-3):227-40.
 69. Wedlock DN; Skinner MA; Lisle GW; Buddle MB. 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes and infection.* 4; 471-480.
 70. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest.* Jul;8(3):351-4.
 71. Wood PR, Corner LA, Plackett P. 1990. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Res Vet Sci.* Jul;49(1):46-9.
 72. Wood PR, Corner LA, Rothel JS, Baldock C, Jones SL, Cousins DB, McCormick BS, Francis BR, Creeper J, Tweddle NE. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Aust Vet J.* 68(9):286-90.
 73. Zanini MS, Moreira EC, Lopes MT, Mota P, Salas CE. 1998. Detection of *Mycobacterium bovis* in milk by polymerase chain reaction. *Zentralbl Veterinarmed B.* Oct;45(8):473-9.
 74. Zumarraga MJ, Paolichi F, Garbaccio S, Gioffre A, Cataldi A. 2001. Aplicación de la PCR en la detección de *Mycobacterium bovis* en muestras de tejido. *Vet. Arg.* Vol 18. No. 179.