



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

**CORRELACION HISTOPATOLOGICA DE LESIONES  
SUGESTIVAS A TUBERCULOSIS BOVINA CON LA  
PRESENCIA DE *Mycobacterium bovis* ANALIZADA  
MEDIANTE LA PRUEBA DE REACCION EN CADENA  
DE LA POLIMERASA (PCR).**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
P R E S E N T A :  
**RUBEN ARTURO TORRES LEON.**

ASESOR: M EN C CYNTHIA GONZALEZ RUIZ.  
COASESOR: DR. CIRO ESTRADA CHAVEZ



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.



GOBIERNO NACIONAL  
AUTONOMIA DE  
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

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

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

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

Correlación histopatológica de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina con la presencia de Mycobacterium bovis, analizada mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa.

que presenta el pasante: Ruben Arturo Torres León  
con número de cuenta: 9505683-0 para obtener el título de:  
Médico Veterinario 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 junio de 2005.

PRESIDENTE	<u>MVZ.R.Javier Hernández Balderas</u>	
VOCAL	<u>QFB.Juana Alicia Alquicira Camacho</u>	
SECRETARIO	<u>M.C.Cynthia González Ruíz</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>M.C.Juan Sebastian Barrientos Padilla</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Ma.Reyes Pichardo Molinero</u>	

## ÍNDICE GENERAL.

	PÁGINA
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b>	2
1.1 Definición.	2
1.2 Antecedentes históricos.	2
1.3 Importancia económica.	3
1.4 Importancia en Salud Pública.	4
1.5 Características generales de las micobacterias.	5
1.6 Epidemiología.	7
1.6.1 Resistencia ambiental.	7
1.6.2 Hospedadores.	8
1.6.3 Transmisión.	8
1.7 Patogenia.	8
1.8 Inmunopatogenia.	11
1.8.1 Inmunidad natural (adquirida)	11
1.8.2 Inmunidad adquirida (específica)	14
1.9 Diagnóstico.	17
1.9.1 Aislamiento e identificación bacteriológica.	17
1.9.2 Intradermorreacción (Prueba de Tuberculina).	17
1.9.3 Interferón gamma.	18
1.9.4 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA):	18
1.9.5 Inspección postmortem (IP)	18
1.9.6 Histopatología.	20
1.9.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	21
<b>2. JUSTIFICACIÓN.</b>	22
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	23
<b>4. HIPÓTESIS.</b>	23
<b>5. OBJETIVO GENERAL.</b>	23
<b>6. OBJETIVOS PARTICULARES.</b>	24
<b>7. ESTRATEGIA.</b>	25
<b>8. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	26
8.1 Animales.	26
8.2 Inspección postmortem.	26
8.3 Histopatología.	23
8.3.1 Preparación histopatológica.	27
8.3.2 Tren de coloración de H.E:	28
8.3.3 Tren de coloración de Ziehl Neelsen (Z.N) :	29
8.4. Extracción de DNA genómico.	29
8.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR control y PCR anidada)	31
8.6 Análisis estadístico	33
<b>9. RESULTADOS.</b>	34
9.1 Estudio anatomopatológico:	34
9.2 Clasificación de lesiones	37
9.3 Analisis histopatológico	37

9.4 Estudio de PCR:	44
<b>10. DISCUSIÓN.</b>	<b>48</b>
<b>11. CONCLUSIONES.</b>	<b>54</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b>	<b>55</b>

## RESUMEN.

“Correlación Histopatológica de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina, con la presencia de *Mycobacterium bovis*, analizada mediante la prueba en reacción de la polimerasa (PCR)”. Torres León Rubén Arturo. M en C Cynthia González Ruíz Dr. Ciro Estrada Chávez.

La tuberculosis bovina (Tb) es considerada un problema de salud pública y una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria ganadera. El objetivo del presente trabajo fue correlacionar las características histopatológicas, presencia de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), sitio de lesión macroscópico y la presencia de DNA de *M. bovis* en bovinos positivos a la prueba de tuberculina. Se emplearon 23 bovinos de la raza Holstein Friesian provenientes de un hato con alta prevalencia de TBB (Almaraz, FESC-4). Todos los animales fueron sacrificados y se determinó postmortem, la presencia de lesiones visibles (LV) sugestivas a Tb. Posteriormente se tomaron las muestras necesarias para el estudio histopatológico, Ziehl-Neelsen (ZN) y PCR. Al revisar las canales en rastro observamos que solamente 8 (39.16%) de ellas presentaron lesiones visibles sugestivas a Tb, mientras que con el estudio histopatológico se logró detectar 9 (39.13%) Las lesiones granulomatosas sugestivas a tuberculosis, fueron agrupadas en 3 categorías de acuerdo a sus características histopatológicas. Además se determinó que el principal sitio de afección fueron los linfonodos retrofaringeos con 9 lesiones, seguidos de los linfonodos traqueobronquiales con 6 y pulmón con 5. En 9 (39.13%) casos se observaron bacilos ácido alcohol resistentes. En tanto que mediante la prueba de PCR anidada se detectó 10 casos positivos a la presencia de DNA de *M. bovis*. Los valores obtenidos de Cohen's *kappa* obtenidos entre la inspección postmortem (IP) y las lesiones histopatológicas fue buena ( $k=0.59$ ), la concordancia entre lesiones microscópicas y macroscópicas con la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes fue perfecta ( $k=1$ ) y buena ( $k=0.59$ ) respectivamente. La concordancia de la PCR con la presencia de lesiones visibles a la IP o lesiones histopatológicas fue inadecuada. La presencia de animales reactivos sin lesiones visibles sugiere que no se debe descartar la presencia de focos primarios a partir de los cuales se libera la bacteria en un órgano diferente a pulmón. Este hallazgo es importante, ya que estos animales pueden estar diseminando la enfermedad, contribuyendo así a la persistencia de la Tb. en un hato.

**Palabras clave:** Tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, histopatología, PCR anidada.

## 1.- INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Definición.

La Tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa, crónica, producida por las bacterias del género *Mycobacterium*, tiene una distribución mundial afectando a todos los animales de sangre caliente incluyendo el hombre. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas localizadas frecuentemente en ciertos órganos (pulmón, linfonodos, hígado) o diseminadas, acompañadas por caquexia progresiva, periodos febriles y retraso en el crecimiento.<sup>1,2</sup>

### 1.2 Antecedentes históricos.

La tuberculosis a afectado desde la antigüedad al hombre y a los animales. En el siglo XVI la "enfermedad perlada" del bovino se consideró como una forma de sífilis. A mediados del siglo pasado el padecimiento se transmitió, en numerosos experimentos en humanos y en bovinos, a conejos y cobayos, atribuyendo entonces su aparición a un agente transmisible específico.<sup>1</sup> Es probable que el bacilo que produce la tuberculosis se haya observado por primera vez en los tejidos por Baumgarten y Koch en 1882.<sup>3</sup> Más tarde Koch opinó que la tuberculosis humana era distinta de la bovina y debido a ello suponía que no era necesario proteger al hombre contra la "enfermedad perlada del bovino", este punto de vista lo rebatieron numerosos experimentos, según el resultado de los cuales los agentes de tuberculosis humana y de los animales son variedades o tipos de una misma especie de bacterias, que solo se diferencian por características de importancia secundaria.<sup>1</sup>

### 1.3 Importancia económica.

La tendencia mundial hacia la apertura de mercados y formación de bloques económicos regionales nos ha lanzado al mundo con mayores exigencias y si México aspira a formar parte de este nuevo orden económico, tendrá que cumplir con las nuevas reglas, que en materia sanitaria son claras e inflexibles para países como EE.UU. y Canadá, países con los cuales comerciamos y que ostentan una muy baja prevalencia de enfermedades, como la tuberculosis.<sup>4</sup>

La tuberculosis bovina (Tb.) origina perjuicios económicos al ganadero y reduce la eficiencia productiva de sus animales disminuyendo la fertilidad hasta en un 6%, las vacas en ordeña disminuyen la producción láctea en un 10% del total de la producción lechera, la duración de las lactancias disminuye a la mitad en la séptima lactancia. El promedio de 270 días en la primera lactancia se reduce a la mitad, en la séptima lactancia (131 días), se produce un lento aumento del peso del animal o disminución gradual del mismo (caquexia). Se pierde en promedio el 15% del peso normal, como efecto secundario causa reducción de la inmunidad, aumentando la susceptibilidad a otras enfermedades, la esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre el 5 y 10%, disminuye la producción de carne en bovinos y porcinos, además provoca pérdidas de parición de terneros y lechones en hembras tuberculosas hasta en un 15%.<sup>5,6,7</sup>

En México la ganadería cuenta con un estimado de 1,863,977 cabezas de ganado lechero y 28,313,158 cabezas de ganado de carne, en donde la presencia de la enfermedad en nuestro país se contabiliza en pérdidas hasta del 17% en la producción láctea.<sup>6</sup>

La prevalencia de la tuberculosis es más alta en vacas lecheras que en animales de carne, ya que su vida útil es más prolongada, debido al mayor contacto al momento del ordeño, a la estabulación o semi-estabulación.<sup>4</sup>



En los países industrializados, la tuberculosis bovina está erradicada o se encuentra en una fase avanzada de control, mientras que en la mayoría de los países en desarrollo la situación no ha mejorado o la prevalencia se encuentra en aumento. En casi todos los países de Europa occidental la prevalencia de la infección bovina es inferior a 0.1%. En el hemisferio occidental, el Canadá y los Estados Unidos de América han reducido la tasa de infección a niveles muy bajos al igual que en centro América y el Caribe. Las tasas más altas de infección se encuentran en las cuencas lecheras, alrededor de las grandes ciudades de América del Sur.<sup>4,5</sup>

#### 1.4 Importancia en Salud Pública.

La Tb. es considerada por organizaciones internacionales de la salud como una zoonosis, su agente etiológico *M. bovis* tiene como hospedador principal a los bovinos, pero el hombre es susceptible, pudiendo desarrollar la enfermedad, lo cual representa altos costos en materia de salud pública, gastos terapéuticos, la disminución de la capacidad laboral, además del sufrimiento de los individuos que la padecen. La Tb. es una enfermedad que afecta de preferencia a las poblaciones pobres, se registran 7,000 casos nuevos de tuberculosis humana de origen bovino en América Latina por año, las poblaciones vulnerables incluyen a trabajadores rurales y mataderos.<sup>4,8,9,10,11</sup>

La tuberculosis en humanos provocada por *M. bovis* no está muy bien documentada. Sin embargo, algunos estudios publicados estiman que el porcentaje de humanos contagiados en el mundo con *M. bovis* es alrededor de 3.1%.<sup>12</sup> En Latinoamérica, *M. bovis* es responsable de causar alrededor de 7,000 casos de tuberculosis humana cada año.<sup>13</sup> En México, la tuberculosis humana causada por *M. bovis* representa del 8 al 15% de los casos reportados.<sup>14</sup>

La desnutrición, la pobreza, la sobrepoblación, la contaminación, la resistencia del bacilo a los fármacos tradicionales, el mal uso de ellos, el VIH y el consumo tradicional de leche sin previa ebullición popularmente conocida como "leche bronca", así como la ingesta de productos lácteos no pasteurizados, ponen

de manifiesto el riesgo potencial que representan los animales infectados como transmisores de esta enfermedad.<sup>6,7</sup>

La prevalencia de la tuberculosis humana de origen animal ha disminuido mucho en los países donde se impuso la pasteurización obligatoria de la leche y donde se realizaron exitosas campañas de control y erradicación de la infección bovina. Aunque no existen datos confiables de la participación de las vacas en el incremento de casos de tuberculosis humana en México, se presume que aproximadamente el 8% de los casos son debidos a *M bovis*.<sup>4</sup>

En países donde la leche de vaca se consume hervida, entre ellos los de América Latina, la incidencia de infección por *M. bovis* ha sido siempre más baja. Sin embargo, tanto las formas pulmonares como extrapulmonares de la tuberculosis humana de origen animal no dejan de ser un problema en las áreas con alta prevalencia de infección en bovinos.<sup>4,6</sup>

#### 1.5 Características generales de las micobacterias.

El género *Mycobacterium* obtiene su nombre de las raíces griegas Myces y Bacterion que significan hongo y bacilo corto respectivamente, estas miden 0.2-0.6mm de ancho por 1.0 mm de largo.<sup>15</sup> Las micobacterias son bacilos intracelulares facultativos, aerobios y ácido alcohol resistentes. Esto último debido a que el 60% del peso total de su pared celular esta constituida por lípidos, algunos de ellos considerados factores de virulencia<sup>16</sup>. Los lípidos, ácidos grasos y ceras se encuentran íntimamente unidos a proteínas y polisacáridos formando una estructura compleja. El núcleo de la pared celular está compuesta de tres moléculas unidas de forma covalente: Peptidoglicano, Ácido micólico, Arabinogalactano y la lipoarabinomanana. Este último es el polisacárido de las micobacterias más estudiado hasta la fecha debido a su alta capacidad antigénica.<sup>17</sup>

La envoltura micobacteriana consta de 2 partes, siendo la primera la membrana plasmática y alrededor de esta, la pared. Ambas estructuras sirven de protección osmótica, actúan en el transporte iónico y dan soporte mecánico.<sup>18</sup> 1.5.1 Clasificación microbiológica de las micobacterias.

Los miembros de este género pueden clasificarse de la siguiente manera:

1.- Como se observa en el cuadro A, *M. bovis*. Tiene uno de los más amplios rangos de hospedadores de todos los patógenos conocidos, las especies que se han reconocido como causa de patología en el hombre y en animales de sangre caliente, son las siguientes.<sup>2,3,20</sup>

**Cuadro A.** Diferentes especies del género *Mycobacterium*

Especies del género <i>Mycobacterium</i>	Animales afectados
Complejo <i>M. avium subsp. Avium</i> <i>M. avium subsp. silvaticum</i> <i>M. avium subsp. paratuberculosis</i>	Pollos, pájaros y cerdos Paloma torcaz y ciervo Bovinos, ovinos, caprinos y Rumiantes silvestres.
<i>M. bovis</i>	Bovinos, borregos, perros, gatos, monos, simios, mink, cerdos, elefantes, rinocerontes, pericos, venados, zorros, tapires, camellos, bisontes, llamas, humanos.
<i>M. tuberculosis</i>	Bovinos, monos, simios, cerdos, perros, apires, elefantes, humanos
<i>M. lepraemurium</i>	Gatos, ratas, ratones
<i>M. fortuitum</i>	Perros, vacas, cerdos.
<i>M. marinum</i>	Peces y sapos.
<i>M. kansasii</i>	Monos, vacas y cerdos.
<i>M. chelonae</i>	Cerdos y manatíes.
<i>M. leprae.</i>	Armadillo.

2.- Como se observa en el cuadro B, Runyon (1959), colocó en un principio en varias categorías a cierto número de micobacterias, llamadas “anónimas”, “sin clasificación o “atípicas”. Este investigador organizó cuatro grupos de acuerdo al índice de crecimiento y a la producción de pigmento, En todos los casos el rango de temperatura óptimo de crecimiento para las micobacterias se establece entre los 28<sup>0</sup> C y 45<sup>0</sup> C.<sup>2,3,10</sup>

**Cuadro B.** Clasificación de Runyon, de las Mycobacterias de acuerdo al índice de crecimiento y a la producción de pigmento.

<b>Grupo I</b>	<b>Colonias fotocromógenas, que sólo producen pigmento (amarillo) después de exposición a la luz; crecen con lentitud ya que requieren siete o más días para apreciar su proliferación</b>	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i> , <i>M. simiae</i> . <i>M. asiaticum</i> <i>M. intermedium</i>
<b>Grupo II</b>	<b>Escotocromógenas, es decir, que producen pigmento amarillo o anaranjado en ausencia de luz, crecimiento lento</b>	<i>M. gordonae</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. xenopi</i> .
<b>Grupo III</b>	<b>No fotocromógeno, que produce escaso pigmento cuando se exponen a la luz o no producen, crecimiento lento</b>	<i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. térrea</i> , <i>M. ulcerans</i> .
<b>Grupo IV</b>	<b>Pigmentación variable, crecen con rapidez, por tanto su proliferación es visible en menos de siete días</b>	<i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> .

## 1.6 Epidemiología.

### 1.6.1 Resistencia ambiental.

*Mycobacterium bovis* es un germen moderadamente resistente al calor, a la desecación y a muchos desinfectantes, dadas las características hidrófobas de su superficie la cual impide la fijación y penetración del producto desinfectante en la célula bacteriana.<sup>6</sup> En agua estancada sobrevive en el sedimento

aproximadamente de 203-260 días.<sup>21</sup> Bajo la acción de los rayos solares directos *M. bovis* sobrevive de 16-23 días y en el interior de las instalaciones de 31-37 días a temperatura media de 28<sup>0</sup>C y 82% de humedad relativa.<sup>22</sup> La supervivencia del *M. bovis* en heces expuestas al sol en época de lluvias es de 37 días mientras que dentro de las instalaciones se considera de 71-84 días.<sup>23</sup>

#### 1.6.2 Hospedadores.

*M. bovis*. Tiene uno de los más amplios rangos de hospedadores de todos los patógenos conocidos, se ha demostrado la infección en primates, incluido el hombre, ungulados y carnívoros, tanto domésticos como silvestres.<sup>24</sup>

#### 1.6.3 Transmisión.

La principal vía de transmisión de la Tb., es la aerógena, por inhalación de aerosoles con dosis elevadas del microorganismo. Durante la tos y los estornudos que desarrollan los animales clínicamente enfermos, son expeditas una gran cantidad de gotas de diversos tamaños las cuales provienen principalmente de bronquios y contienen moco, leucocitos y bacilos.<sup>1,2,6,10,11,25.</sup>

La ingestión de leche contaminada con bacilos constituye una fuente de infección para los animales lactantes y para el hombre, esta leche puede contaminar los equipos de ordeño, los instrumentos, el suelo, las camas, la ropa, y los recipientes destinados para el almacenamiento de la leche sana. El insuficiente procesamiento de la leche de rebaños afectados puede propagar la enfermedad a otros rebaños donde los terneros fueron alimentados con esta leche.<sup>6,8,25</sup>

#### 1.7 Patogenia.

Actualmente se considera que la principal forma de transmisión de la Tb. se lleva a cabo por la inhalación de aerosoles cargados con el *M. bovis*., provenientes de bovinos tuberculosos con lesiones abiertas en pulmones.<sup>26,27,28,29,30</sup> Los bacilos que hacen contacto con la capa muco-ciliar del tracto respiratorio superior

pueden ser acarreados hacia los bronquios terminales y espacios alveolares; y es en este sitio donde son ingeridos por los neumocitos tipo III.<sup>30,31,32,33</sup>

En la infección primaria los macrófagos son incapaces de destruir por completo a las micobacterias fagocitadas debido a que los bacilos virulentos poseen la habilidad de resistir a radicales libres y enzimas proteolíticas.<sup>34, 35, 30</sup> En esta etapa las micobacterias se multiplican dentro de los macrófagos e inducen la formación de una lesión primaria, la cual previene el crecimiento y diseminación de la micobacteria en el organismo.<sup>36</sup>

La formación de la lesión primaria es un evento inflamatorio, en respuesta a los lípidos y carbohidratos de la pared celular, ya que se puede inducir por micobacterias muertas. Dichos componentes de la micobacteria inducen a cierta activación del macrófago caracterizada por la transcripción de citocinas proinflamatorias.<sup>35</sup>

Cuando la actividad microbicida de los macrófagos fracasa en la destrucción de las micobacterias, estas se replican en su interior ocasionando su destrucción,<sup>37,38</sup> provocando quimiotaxis de monocitos hacia esta zona e iniciar la formación del granuloma o tubérculo,<sup>32, 33, 35, 39</sup> que se considera la lesión característica de la tuberculosis. Este granuloma se caracteriza por un centro necrótico y posiblemente bacterias libres, rodeado de macrófagos infectados, células epitelioides, células gigantes y todo esto a su vez puede estar rodeado por tejido conectivo fibroso y linfocitos.<sup>32,33,35</sup> En algunos casos puede existir mineralización en el centro necrótico mientras que en procesos graves estos focos de mineralización pueden ser confluyentes con otros granulomas.<sup>40</sup>

Cuando el proceso de cicatrización en las lesiones fracasa se desarrolla una bronconeumonía progresiva, existen dos diferentes rutas mediante las cuales es posible que se produzcan nuevos centros de infección: en primer lugar, cuando la lesión primaria alcanza cierto tamaño, y especialmente cuando se ablanda o

licua, los bacilos son arrojados dentro de los bronquios y son acarreados a otras porciones sanas del pulmón durante los accesos de tos, de esta manera los bacilos ya sea, en la membrana mucosa de los bronquios con los que tenga contacto directo, o al ser aspirados dentro de los alvéolos en lugares remotos de la lesión primaria, pueden producir nuevos centros de enfermedad. Cada uno de estos centros puede evolucionar de la misma forma que el primero.

La segunda ruta mediante la cual los bacilos pueden ser transportados a partir del foco primario de infección, es a través de los vasos linfáticos durante el curso de la enfermedad los bacilos son transportados hacia los nódulos linfáticos (NL) bronquiales y mediastínicos y cuando esto ocurre se desarrollan tubérculos a lo largo del curso de los vasos linfáticos y en los NL.<sup>41</sup>

Los NL son más comúnmente infectados que otros tejidos porque el flujo de linfa en un animal eventualmente pasa por todos los nódulos, que es dónde el organismo capta a los bacilos. La presencia de macrófagos entre las células reticulares fibrosas de los NL, provee de un ambiente adecuado para el crecimiento micobacterial y el desarrollo de las lesiones granulomatosas en el nódulo.<sup>42</sup>

El granuloma se forma para tratar de delimitar la infección y permitir que el proceso inflamatorio y los mecanismos inmunológicos destruyan a los bacilos. Sin embargo, un pequeño número de micobacterias pueden permanecer viables por varios años en el centro necrótico de algunos granulomas en el ganado en forma inactiva.<sup>39</sup> Estas lesiones, algunas veces se pueden activar en el momento que existan factores que depriman el estado inmunológico del individuo como lo sería el estrés y la edad entre otros. Por todo ello, la inmunosupresión favorece la diseminación de la enfermedad en el huésped.<sup>43</sup>

## 1.8 Inmunopatogenia.

*M. bovis* es un buen ejemplo biológico de patógenos intracelulares capaces de resistir y replicarse dentro de los macrófagos. Se han descrito por lo menos dos factores de patogenicidad que permiten esta supervivencia. El primero es la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, la segunda es la resistencia de micobacterias a enzimas lisosomales y metabolitos activos del oxígeno.<sup>34, 40, 42, 44, 45</sup>

La respuesta inmune protectora generada durante la tuberculosis es el resultado de la integración de las respuestas inmune natural y adquirida a través de la activación de linfocitos T CD4 + y productores de IFN  $\gamma$ , permitiendo la eliminación del bacilo por macrófagos activados.

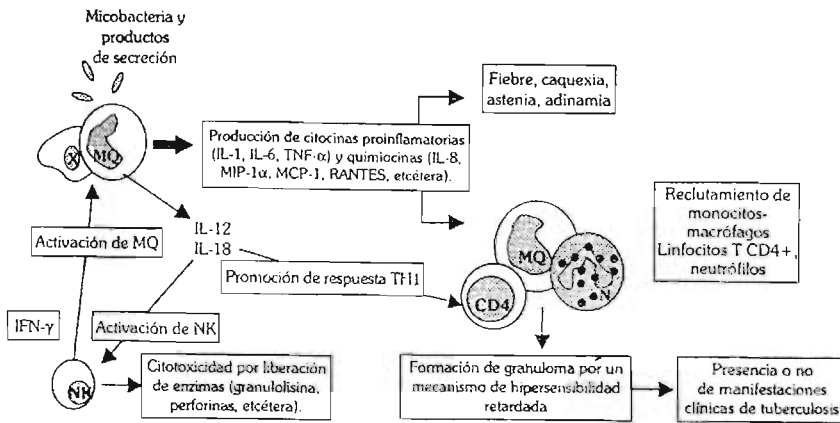
### 1.8.1 Inmunidad natural (adquirida)

La ruta más común de entrada del bacilo tuberculoso es a través de la inhalación del bacilo que ha sido expulsado durante la tos o los estornudos de animales con tuberculosis.<sup>38,42,64</sup> Una vez que el bacilo tuberculoso llega a pulmón, se inician una serie de mecanismos destinados a su eliminación. Se han descrito cuatro posibles consecuencias durante el proceso infeccioso: a) la respuesta puede ser efectiva conduciendo a la eliminación y muerte del bacilo, el animal jamás desarrollará signos de tuberculosis ; b) la micobacteria no es eliminada totalmente y empieza a multiplicarse inmediatamente causando tuberculosis primaria como signo clínico; c) el sistema inmune puede impedir el crecimiento del bacilo sin causar eliminación total, esto puede sospecharse cuando los animales resultan positivos a la prueba intradérmica de PPD y d) los microorganismos que han estado latentes, eventualmente vuelven a multiplicarse causando reinfección<sup>37, 45, 43, 64</sup>

Las células implicadas en limitar o eliminar al bacilo, son los macrófagos que han sido reclutados por citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 y por quimiocinas.<sup>39, 46</sup> Estas moléculas son producidas en conjunto por células



epiteliales, endoteliales y macrófagos alveolares. Las citocinas proinflamatorias regulan positivamente la expresión de moléculas de adhesión como CD54, CD106 y CD62-E en el endotelio y en los leucocitos, de esta forma los leucocitos circulantes pueden migrar al sitio de la lesión mediante un proceso inflamatorio finamente regulado.<sup>65</sup> El aumento en la concentración plasmática de estas citocinas proinflamatorias produce fiebre y en procesos crónicos puede generar caquexia.<sup>65</sup> **Figura 1**



X: célula epitelial/endotelial; MQ: macrófagos; NK: células NK; N: neutrófilos; IL: interleucina; TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor alpha; MIP-1  $\alpha$ ; macrophage inflammatory protein alpha; MCP-1: monocyte chemotactic protein; RANTES: regulated on activation normal T-cell expressed and secreted.

**Figura 1** Eventos inmunológicos inespecíficos que ocurren tras la infección por *M. bovis*.

Las quimiocinas (citocinas con propiedades quimiotácticas) tienen la capacidad de inducir la migración direccional de los leucocitos, regulando la adhesión celular, el tráfico y la activación así como el retorno al sitio de activación inicial, entre otras acciones.<sup>37,65</sup> Generalmente son producidas por una gran variedad de células (leucocitos, células epiteliales y macrófagos alveolares) en respuesta a factores irritantes, activadores policlonales, antígenos y citocinas.<sup>65</sup>

Durante la fase temprana de la infección, algunas quimiocinas como IL-8 atraen a los neutrófilos, los cuales pueden fagocitar a la micobacteria, sin la capacidad suficiente para eliminarla. La función de los neutrófilos es contener a las micobacterias evitando su diseminación mientras son substituidos por macrófagos activados.<sup>37, 45</sup> Otras quimiocinas como la (MCP-1) proteína quimiotáctica 1 de Monocitos, (MIP-1 $\alpha$ ) proteína inflamatoria 1 alfa de macrófagos, (RANTES) que son quimiocinas de la gran familia de la interleucina 8, RANTES es un acrónimo de: Regulado sobre activación T normal expresada y secretada, (IP-10) proteína 10 inducible por interferon, (Mig) monocina inducida por interferon gama, (I-TAC) célula T alfa quimioatrayente inducida por interferon, dirigen la migración de monocitos y linfocitos para la formación del granuloma<sup>64</sup> el cual tiene la finalidad de restringir el crecimiento bacilar confinando a las micobacterias en un sitio. En este sentido la citosina TGF- $\beta$  producida por macrófagos activados, promueve el depósito de colágeno.<sup>66</sup> y favorece la quimiotaxis de otros macrófagos teniendo actividad permisiva en la formación del granuloma.

Las quimiocinas también pueden dirigir a los linfocitos T cooperadores (CD4+) hacia los sitios donde se está iniciando una respuesta de hipersensibilidad retardada que culmina con la formación del granuloma, esto se logra mediante la expresión selectiva de receptores de quimiocinas en linfocitos, durante las diferentes fases de la respuesta inmune. Recientemente, se ha sugerido que las quimiocinas son quienes regulan la hipersensibilidad retardada en la tuberculosis, diferenciando esta, de la respuesta mediada por células.<sup>66</sup> Es decir, las quimiocinas participan en la prevención de la diseminación del bacilo tuberculoso, favoreciendo la migración y activación de células fagocíticas circulantes, dirigiendo además, la migración de linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), todo este proceso se reconoce como hipersensibilidad de tipo IV. Mientras que la acción efectora de los linfocitos Th depende del reconocimiento del antígeno a través de su TCR y de la activación posterior con producción de citocinas (IL-2, TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$

principalmente), generando de esta forma la inmunidad celular necesaria para la eficaz eliminación del bacilo.<sup>37,52,64</sup>

Existen otras citocinas que favorecen la respuesta de linfocitos TCD4+ Th1, como IL-12 e IL-8, producidas por los macrófagos reclutados y activados. Ambas inducen la producción de IFN- $\gamma$  en las células asesinas naturales, el cual a su vez activará a más macrófagos. IL-12 e IL-18, incrementan la actividad citotóxica de las células NK favoreciendo la eliminación de los patógenos intracelulares. La actividad citotóxica de las células NK difiere de la actividad citotóxica de los linfocitos T citotóxicos (CD8+), debido a que estos últimos reconocen específicamente antígenos presentados en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I. Mientras que para las células NK no se necesita la presentación del antígeno.<sup>64</sup> Sin embargo, las células NK comparten con los linfocitos T CD8+ enzimas como la granulisina, granzimas y perforinas, que al ser liberadas inducen la lisis tanto de las células blanco como de *M. bovis*.<sup>37, 64</sup>

### 1.8.2 Inmunidad adquirida (específica)

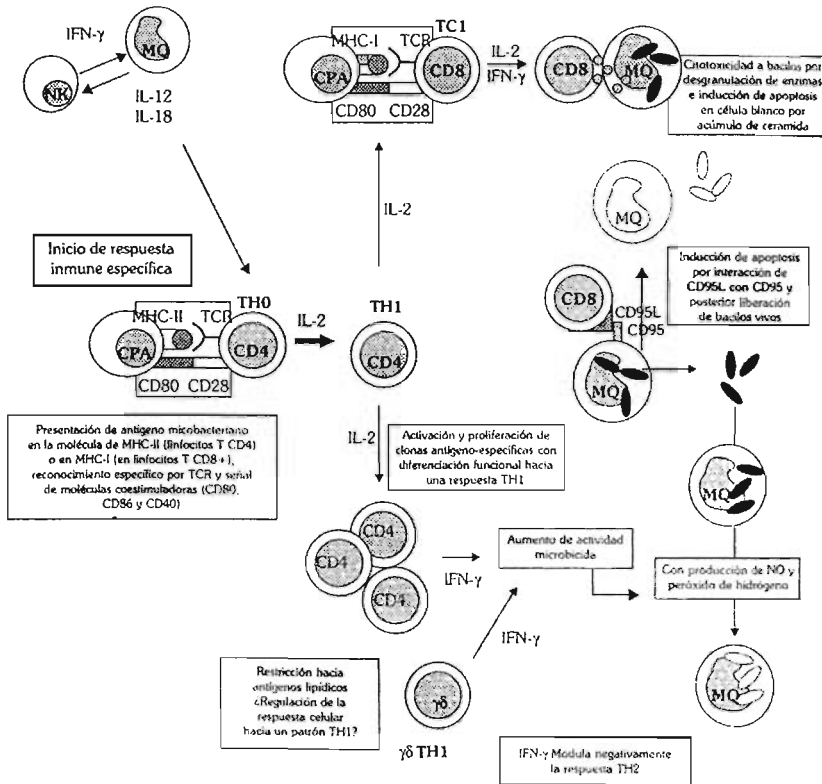
La cinética de protección inmunitaria específica contra *M. bovis* inicia tras la activación de linfocitos T CD4+ capaces de secretar IFN $\gamma$ . Sin embargo existen otras subpoblaciones celulares involucradas durante la infección por tuberculosis como los linfocitos T CD8+.<sup>64</sup>

Los linfocitos TCD4+ encabezan la respuesta inmune protectora a través de tres mecanismos generales: el primero de ellos es el reconocimiento de los antígenos de la micobacteria mediante el contexto de la molécula de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II), así los linfocitos TCD4+ antígeno-específicos, inician el segundo mecanismo general de la respuesta inmune, el cual es la activación celular. Además para una activación celular eficiente se necesitan moléculas coestimadoras que amplifiquen la respuesta, en este sentido, estudios recientes señalan que las células epitelioides que forman parte de los granulomas

expresan moléculas coestimadoras (CD80, CD86 y CD40). El tercer mecanismo general de la respuesta inmunitaria es la fase efectora que consiste en la secreción de un patrón específico de citocinas. Así, la subpoblación Th1 producirá grandes cantidades de IL-2, TNF- $\beta$  (linfotóxina) e INF- $\gamma$  promoviendo la respuesta inmune celular y la activación de macrófagos. Asimismo, el INF- $\gamma$  modula negativamente la respuesta de tipo humoral. En contraste la subpoblación Th2 producirá grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales favorecen la respuesta inmune contra patógenos extracelulares. IL-4, IL-10 e IL-13 tienen la capacidad de modular negativamente la respuesta Th1 y conforme a este esquema general, la protección contra organismos intracelulares como *M. bovis* depende de la cooperación de Th1.<sup>64</sup> **Figura 2.**

Los linfocitos TCD8<sup>+</sup> reconocen el antígeno micobacteriano en el contexto del MHC-1, sin embargo todavía no se ha establecido completamente la ruta de acceso de éstos a la molécula de histocompatibilidad de clase I. Aunque se ha propuesto que la micobacteria libera antígenos y de esta forma son procesados para ser presentados por el MHC-1. Una vez activados por el antígeno, los linfocitos TCD8<sup>+</sup> producen INF- $\gamma$ . Sus acciones efectoras se realizan en dos sentidos: el primero, por medio de la exocitosis de sus gránulos enzimáticos, ricos en granulísina, esta enzima forma parte de las proteínas tipo saposína, quienes interactúan con los lípidos de la membrana, lo que conduce a un aumento en la concentración de ceramida que está involucrada en la inducción de la apoptosis. La otra forma de daño, es la inducción de apoptosis por medio de la interacción de FasL (CD95L, en el linfocito TCD8<sup>+</sup>) con Fas (CD95, en la célula blanco) esto genera señales de muerte mediante la iniciación de una cascada de proteasas intracelulares llamadas caspasas.<sup>64</sup>

La respuesta inmune protectora contra la tuberculosis depende del balance entre la inmunidad inespecífica y la específica y esta última del predominio de la respuesta Th1 con producción de INF- $\gamma$  sobre la respuesta Th2.



CPA: célula presentadora de antígeno; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de linfocito T; TC1: linfocito citotóxico de tipo 1; MQ: macrófagos; IL: interleucina; IFN-γ: interferon gamma; TH: linfocito T cooperador; γ-δ: linfocito T gamma-delta; NO: óxido nítrico.

**Figura 2.** Eventos inmunológicos específicos que ocurren tras la infección por *M. bovis*.

## 1.9 Diagnóstico.

### 1.9.1 Aislamiento e identificación bacteriológica.

Para el aislamiento de *M. bovis* se emplean muestras de tejidos provenientes de animales sospechosos, los cuales presentan lesiones sugestivas a Tb. durante la inspección macroscópica.<sup>20</sup>

Para el cultivo de las micobacterias se utilizan medios a base de huevo, debido a que son muy ricos en nutrientes y poseen altas cantidades de fosfolípidos y proteínas necesarias para su metabolismo. Los medios más comúnmente utilizados para este propósito son el medio de Lowestein-Jensen, Herrold así como otros medios tales como el Middlebrook 7H-10. Sin embargo, el mejor medio para el aislamiento de *M. bovis* es el Stonebrink con piruvato al 0.48% y además crecen mejor en una atmósfera de 3-10% de bióxido de carbono, a una temperatura de 37°C con un tiempo de incubación para *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. africanum* de 6 a 12 semanas con la finalidad de obtener un crecimiento visible.<sup>47</sup>

### 1.9.2 Intradermoreacción (Prueba de Tuberculina).

Esta prueba se realiza mediante la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado que se obtiene de la cepa AN5 de *M. bovis* (PPD bovino), para la realización de la prueba simple o bien junto con la cepa D4 de *M. avium* (PPD aviar) para la prueba doble comparativa. Ambas pruebas se emplean para detectar a los animales expuestos a *M. bovis* o infectados con *M. avium* o bien pueden sugerir la infección por otras micobacterias tales como *M. paratuberculosis*. De tal manera, que estos individuos, desarrollan una reacción de hipersensibilidad tipo IV en el sitio de la inyección en casos de haber tenido exposición previa con el antígeno, manifestándose un engrosamiento de la piel. Para realizar la evaluación de la prueba doble comparativa se establece la diferencia entre el grosor inicial de la piel con aquella que se presenta a las 48 ó 72 horas posteriores a la inyección. Esta prueba posee una alta sensibilidad del

85% y una especificidad que oscila entre un 95-98% para detectar animales expuestos a *M. bovis* o *M. tuberculosis*.<sup>48</sup>

### 1.9.3 Interferón gamma (IF $\gamma$ ).

Esta prueba detecta la producción de interferón gamma *in vitro*, inducida por antígenos específicos en linfocitos previamente sensibilizados. Este método se ha empleado para el diagnóstico de la tuberculosis bovina, en la cual se utiliza sangre completa heparinizada y PPD-bovino como antígeno específico. Para el ganado bovino se estima que la prueba de IF $\gamma$  posee una sensibilidad de entre el 70 y 94% con una especificidad que varía entre un 97 y 99%.<sup>49</sup>

### 1.9.4 Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA):

Esta técnica se emplea para la detección de anticuerpos, mediante el uso de antígenos específicos de micobacterias unidos a una fase sólida, conjuntamente empleando anticuerpos unidas a una enzima, para identificar color. Sin embargo, para la realización de esta prueba existen una gran variedad de problemas, como son: que la respuesta inmune esta dirigida principalmente hacia los antígenos micobacterianos comunes no específicos, la respuesta inmune es principalmente celular excepto en individuos que presenten cuadro clínico o se encuentren en estados avanzados de la enfermedad y una significativa proporción de alrededor del 20 al 40% de individuos de una población infectada no posee niveles detectables de anticuerpos específicos del subtipo IgG, que son indispensables para la realización de esta prueba.<sup>50</sup>

### 1.9.5 Inspección postmortem (IP)

Una medida comúnmente realizada por la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CONETB) es el diagnóstico morfológico de la Tb. mediante una inspección postmortem (IP). Esta se lleva a cabo en los rastros durante el sacrificio de los bovinos reactivos a la tuberculina. Debido a la apariencia característica de las lesiones es posible corroborar el resultado de las pruebas aplicadas a los bovinos en pie. Durante la inspección

muchas ocasiones se colectan muestras de tejidos para enviarse a los laboratorios certificados, en donde se realizan análisis histopatológicos y bacteriológicos de las muestras.<sup>51</sup> Estos permiten establecer con más certeza el grado de diseminación de la enfermedad, además de normar criterios que relacionan el número de reactores (+) con lesiones visibles que se encuentren.<sup>51</sup>

La inspección postmortem es una buena prueba de diagnóstico y en conjunto con la histopatología realizada por los patólogos expertos en la TBB se obtienen resultados confiables que permite una comparación de los métodos de diagnóstico con el "status" epidemiológico de la enfermedad en los hatos.<sup>41,52</sup>

Los bovinos con lesiones visibles únicamente en Nódulos Linfáticos (NL) respiratorios no se consideran capaces de liberar bacilos, pero pueden ser considerados excretores potenciales, debido a que el tiempo necesario para el desarrollo de lesiones en el pulmón y la consecuente excreción del bacilo podría ocurrir rápidamente.<sup>53</sup> Se ha observado en infecciones experimentales que la liberación de bacilos ocurre en forma intermitente.<sup>41,53</sup>

En la IP se deben considerar todas aquellas etiologías que tienden a producir lesiones visibles de tipo granulomatoso y que no pueden diferenciarse de las lesiones producidas por *M. bovis*. Entre las más importantes tenemos a la actinomicosis, actinobacilosis, aspergilosis, corinebacteriosis, migraciones larvianas y linfosarcoma.<sup>54</sup> Las infecciones causadas por *Mycobacterium avium* pueden producir lesiones locales en NL mesentéricos, meninges, útero y ubres. Este tipo de casos es más frecuente en los animales jóvenes de un hato.<sup>3,6</sup>

En los bovinos tuberculosos los órganos torácicos, es decir los pulmones y los nódulos linfáticos de cabeza y tórax son los más frecuentemente afectados.<sup>1, 55.</sup><sup>56</sup> Está ampliamente documentado que las lesiones tuberculosas se presentan en nódulos linfáticos asociados con el tracto respiratorio aproximadamente en un 90% de reactores positivos con infección confirmada, y que sólo del 1 al 2% de estos



animales tienen lesiones visibles en pulmón por lo general muy pequeñas menores de un cm. y frecuentemente únicas.<sup>55, 56</sup> Sin embargo un estudio histopatológico muy extenso hace evidentes las lesiones en este órgano, hasta en un 70% de estos casos.<sup>41</sup>

#### 1.9.6 Histopatología.

En el estudio histológico de los tejidos procedentes de animales sospechosos a tuberculosis bovina, es factible encontrar lesiones granulomatosas las cuales se caracterizan por presentar un centro necrótico con o sin calcificación, rodeado principalmente por células de tipo mononuclear como macrófagos, células epiteloideas, células gigantes tipo Langhans, linfocitos y células plasmáticas y en menor grado por neutrófilos y delimitados o no por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso. Aunque en lesiones iniciales sólo observamos cúmulos importantes de macrófagos, células epiteloideas y células gigantes, por lo que emitir un diagnóstico en estos casos, es compatible con la enfermedad.<sup>25,30,32,33</sup>

Debido a que los granulomas no son específicos de la tuberculosis, se hace indispensable realizar técnicas tintoriales como el Ziehl Neelsen para detectar los bacilos ácido-alcohol resistentes. Desafortunadamente, se requiere que exista una gran cantidad de bacterias en la muestra para que se puedan observar al microscopio. El resultado debe describirse como, "presencia de bacterias ácido alcohol resistentes", debido a que es imposible diferenciar objetivamente las especies de micobacteria en la observación al microscopio. Debe de resaltarse la importancia de utilizar laminillas testigo y evitar el paso de micobacterias de un corte a otro en el agua de la tina de flotación. Por otra parte, es conveniente realizar tinciones para bacterias ácido-alcohol resistentes en todos los casos diagnosticados con lesiones compatibles con tuberculosis.<sup>47, 57</sup>

### 1.9.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Esta técnica fue desarrollada en 1985 por un grupo del departamento de Genética Humana de CETUS Corporation en Emeryville. El término "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR) se aplica al proceso bioquímico *in vitro* mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN Polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso.<sup>58</sup>

En general, los componentes requeridos para una PCR son: ADN, iniciadores (oligonucleótidos) específicos que flanquean el gen o segmento que actúa como blanco para la amplificación, mezcla de desoxinucleótidos (dntp's), solución amortiguadora de reacción, y DNA Polimerasa.<sup>58</sup>

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores que limitan la región del ADN que se va a amplificar, es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Al ser este uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad del PCR, su elección y diseño debe de ser muy cuidadoso.<sup>58</sup>

Diversos autores han corroborado la factibilidad de utilizar esta tecnología en el diagnóstico clínico de la TBB y han demostrado que es posible utilizarla en la detección de micobacterias en muestras de sangre y tejidos de bovinos infectados.<sup>49, 59, 60</sup>

Además de permitir la detección de las micobacterias en el ganado infectado, la técnica de PCR también puede ser muy útil para identificar la especie de micobacteria. Esto es de particular importancia ya que debido al lento crecimiento de las micobacterias, solo en pocos casos el diagnóstico es

confirmado por cultivo y en un número todavía menor se llega a la identificación de especie por métodos microbiológicos convencionales.<sup>51</sup>

Recientemente se han descrito técnicas de amplificación del ADN de las micobacterias utilizando oligonucleótidos especie-específicos, los cuales permiten diferenciar estos microorganismos.<sup>61, 62</sup>

## **2. Justificación.**

Con cierta frecuencia existen ciertas discrepancias entre los resultados bacteriológicos, intradermorreacción así como de algunas otras pruebas con respecto a la inspección postmortem o resultados histopatológicos, en las cuales a pesar de encontrar lesiones sugestivas a tuberculosis, no es factible detectar el agente causal. Por lo tanto es importante establecer una correlación entre una o varias pruebas diagnósticas. Asimismo el establecer una clasificación histológica de acuerdo al grado de evolución de las lesiones granulomatosas, así como las posibles diferencias que existan entre los diferentes tipos de lesiones, las cuales podrían relacionarse con algunos factores relacionados con el animal o con la bacteria. Todo lo anterior permitiría establecer un diagnóstico eficiente y confirmativo, que ayude a conocer mejor la epidemiología de la enfermedad y la situación del hato. El diagnóstico eficiente colaboraría a las medidas para la erradicación de la enfermedad, la reducción de pérdidas de producción, la exportación de ganado en pie y a la disminución del riesgo de transmisión a humanos.

confirmado por cultivo y en un número todavía menor se llega a la identificación de especie por métodos microbiológicos convencionales.<sup>51</sup>

Recientemente se han descrito técnicas de amplificación del ADN de las micobacterias utilizando oligonucleótidos especie-específicos, los cuales permiten diferenciar estos microorganismos.<sup>61, 62</sup>

## **2. Justificación.**

Con cierta frecuencia existen ciertas discrepancias entre los resultados bacteriológicos, intradermorreacción así como de algunas otras pruebas con respecto a la inspección postmortem o resultados histopatológicos, en las cuales a pesar de encontrar lesiones sugestivas a tuberculosis, no es factible detectar el agente causal. Por lo tanto es importante establecer una correlación entre una o varias pruebas diagnósticas. Asimismo el establecer una clasificación histológica de acuerdo al grado de evolución de las lesiones granulomatosas, así como las posibles diferencias que existan entre los diferentes tipos de lesiones, las cuales podrían relacionarse con algunos factores relacionados con el animal o con la bacteria. Todo lo anterior permitiría establecer un diagnóstico eficiente y confirmativo, que ayude a conocer mejor la epidemiología de la enfermedad y la situación del hato. El diagnóstico eficiente colaboraría a las medidas para la erradicación de la enfermedad, la reducción de pérdidas de producción, la exportación de ganado en pie y a la disminución del riesgo de transmisión a humanos.

### **3. Planteamiento del problema.**

La tuberculosis bovina representa un riesgo a la salud animal y potencialmente a la salud pública por ser una enfermedad transmisible al hombre (zoonosis). Las pruebas empleadas para el diagnóstico de la tuberculosis bovina no son específicas ni sensibles en un 100%, para determinar la presencia de animales infectados. La falta de un adecuado estudio anatomopatológico tanto macroscópico como microscópico, así como de pruebas microbiológicas, impide establecer la presencia y frecuencia de lesiones tuberculosas en el ganado afectado. Una prueba como la PCR permite identificar fácilmente a *M. bovis* con alta sensibilidad y especificidad en lesiones sugestivas, pero para su instrumentación en el campo es conveniente establecer la relación que guarda con el tipo macroscópico y microscópico de las lesiones.

### **4. Hipótesis.**

Existe una relación entre las características histopatológicas de las lesiones que se presentan durante el desarrollo de la tuberculosis en bovinos, positivos a la prueba de tuberculina y la presencia de *M. bovis*.

### **5. Objetivo General.**

Correlacionar las lesiones histopatológicas de bovinos positivos a la prueba de tuberculina, con la presencia de *M. bovis* en el tejido lesionado mediante un análisis molecular (PCR).

## **6. Objetivos particulares.**

**6.1** Obtener nódulos linfáticos retrofaringeos (NLR), traqueobronquiales (NLTB), mediastínicos (NLM), submandibulares (NLSM) y pulmón (lóbulo craneal) de bovinos positivos a la prueba de tuberculina en la FES-C4.

**6.2** Clasificar las lesiones histopatológicas de acuerdo a sus características (tipos celulares, morfología, etc.)

**6.3** Determinar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en preparaciones histológicas teñidas con la técnica de Ziehl Neelsen.

**6.4** Determinar la existencia de DNA de *M. bovis*. En muestras de tejido congelado mediante una PCR anidada.

**6.5** Establecer la concordancia entre: 1.-Características Histopatológicas, 2.- Tinción de Ziehl Neelsen, 3.- Presencia de DNA de *M. bovis*. 4.- Sitio de lesión macroscópico, mediante el cálculo del coeficiente de Cohen's KAPA (K=)

## 7. Estrategia.

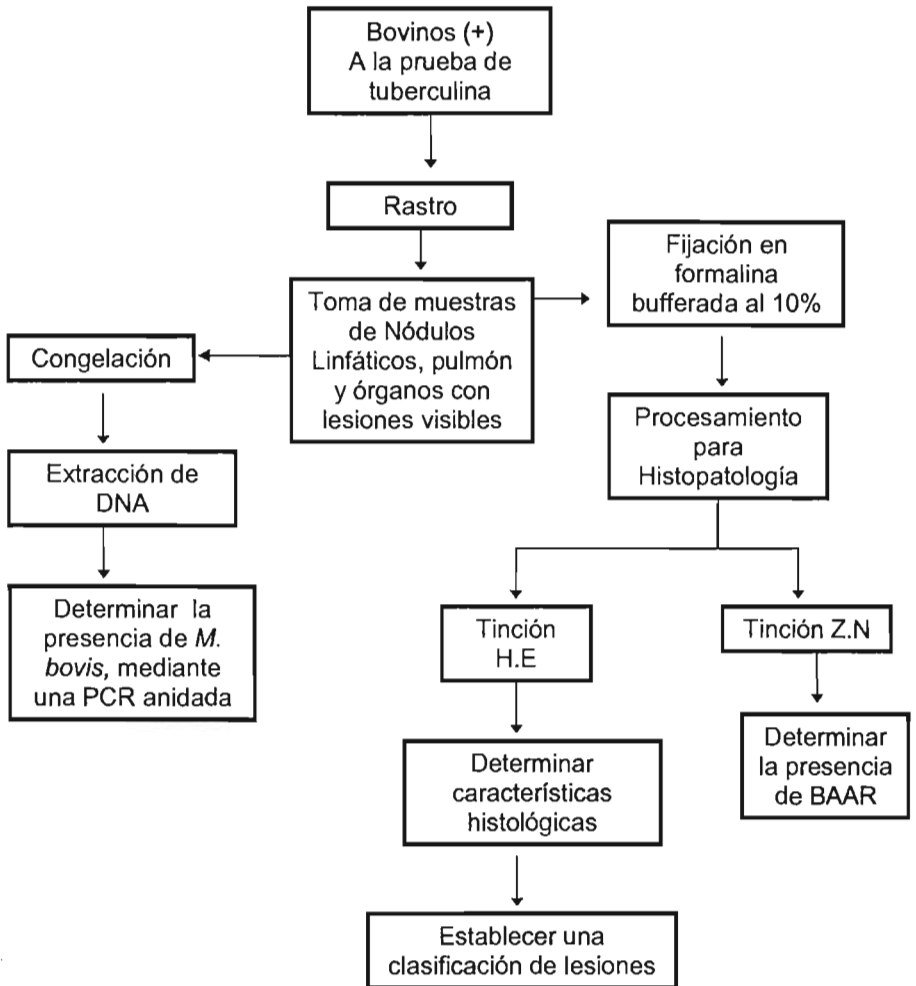


Diagrama 1. Estrategia de la investigación.

## **8. Material y Métodos.**

### **8.1 Animales.**

Se utilizaron 23 hembras (22%) de la raza Holstein Friesian del rancho Almaraz de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, el cual es una explotación semi-intensiva en el área de novillas de reemplazo e intensiva en el área de producción.

### **8.2 Inspección postmortem.**

Los animales se sacrificaron mediante pistola de émbolo oculto. Las canales se inspeccionaron y los órganos se revisaron como demanda la CANETB<sup>63</sup> con la finalidad de encontrar lesiones compatibles a la TBB. Los órganos que se inspeccionaron fueron: A) Nódulos Linfoides: Sub-mandibular (NLSM) Retrofaringeos (NLR), traqueobronquiales (NLTB), mediastínicos (NLM), pre-escapulares (NLP), precurales (NLPR), iliacos (NLI), supramamarios (NLSM) y poplíteos (NLPO). B) Tejido pulmonar (P).

Las lesiones encontradas se clasificaron de acuerdo a su tamaño como:

(+) Lesiones de menos de 5mm de diámetro y de 1 a 2 lesiones visibles.

(++) Lesiones entre los 6 y 10 mm, más de 3 lesiones.

(+++) Lesiones múltiples mayores a 10mm.

Todas las muestras de tejido con o sin lesiones de TB, fueron sometidas a estudios histopatológicos. Una parte de cada una de estas muestras se conservó en congelación para la extracción de DNA.

### **8.3 Histopatología.**

Para el estudio histopatológico se tomo aproximadamente una muestra de 1.5cm<sup>3</sup> y se depositaron en formalina bufferada al 10% para ser procesadas y



teñidas con H.E, y posteriormente con la tinción de Zielh-Neelsen para detectar la presencia del bacilo. Para el análisis histopatológico se utilizó una clasificación de las lesiones sustentada principalmente en los tipos celulares y cambios patológicos encontrados de la siguiente manera:

Tipo I.- Exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloideas, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas y ausencia de fibrosis. **Figura 3.**

Tipo II.- Similares a las tipo I pero con una necrosis caseosa, fibrosis y con diversos grados de acúmulos de material sugestivo a calcio. **Figura 4.**

Tipo III.- Corresponde a la lesión típica del granuloma, las mismas características de la lesión tipo II pero con una capa fibrosa gruesa y necrosis caseosa central. **Figura 5a y 5b.**

#### 8.3.1 Preparación histopatológica.

Las muestras después de estar fijadas por 72 hrs. en formalina bufferada al 10% se sometieron a los siguientes pasos:

- Lavado con agua corriente por 1hr.
- Alcohol al 70% 1hr.
- Alcohol al 80% 1hr.
- Alcohol al 96%, dos pasos, el primero de 1hr. y el segundo de 2hrs.
- Alcohol absoluto, dos pasos de 2 hrs. cada uno.
- Xileno, dos pasos de 2 hrs. cada uno.
- Parafina, dos pasos de 2 hrs. cada uno.

Posteriormente las muestras son incluidas en una rejilla de aluminio con parafina para uso histológico con un punto de fusión de 56-58 C, se identifican y se dejan enfriar, para pasar al corte, el cual se realizará con el microtomo, obteniendo cortes de 5 micras de grosor.

Para el montaje se utilizó un baño de flotación a una temperatura de 40°C agregando 1% de grenetina, donde se forma una película de adhesión entre la muestra y el portaobjetos. Posteriormente las laminillas se secan en una platilla térmica por 10 o 15 min., para eliminar el exceso de agua.

### 8.3.2 Tren de coloración de H.E:

Las laminillas se colocan en rejillas metálicas, para que puedan ser sumergidas en los diferentes alcoholes y sustancias, la cuales se encuentran en recipientes de cristal.

- Xileno, dos pasos de 10 min. Cada uno.
- Alcohol absoluto un paso de tres min.
- Alcohol al 90% un paso de tres min.
- Alcohol al 80% un paso de tres min.
- Alcohol al 70% un paso de tres min.
- Lavado con agua corriente.
- Hematoxilina de Harris un paso de 5 a 10 min.
- Lavado con agua corriente, 3 pasos.
- Diferenciación con Alcohol ácido, un paso rápido.
- Lavado con agua corriente y viraje, tres pasos.
- Eosina amarillenta alcohólica, un paso de 30 seg.
- Alcohol al 90%, dos pasos de tres min. cada uno.
- Alcohol absoluto, dos pasos de tres min. cada uno.
- Xileno, dos pasos de diez min. cada uno.
- Montaje con resina sintética.

### 8.3.3 Tren de coloración de Ziehl Neelsen (Z.N):

- Lavado a chorro de piseta con agua destilada.
- Colorante carbón fucsina, un paso de 30 min.
- Lavado a chorro de agua corriente.
- Decoloración en alcohol ácido, hasta que las muestras presenten un color rosa pálido.
- Lavado con agua corriente, por 8 min.
- Contrastar con azul de metileno, hasta que las muestras presenten un color azul pálido.
- Lavado a chorro de agua corriente.
- Lavado a chorro de piseta con agua destilada.
- Alcohol al 90%, dos pasos de tres min. cada uno.
- Alcohol absoluto, dos pasos de tres min. cada uno.
- Xileno, dos pasos de diez min. cada uno.
- Montaje con resina sintética.

### 8.4. Extracción de DNA genómico.

Para esta prueba se utilizaron los tejidos que se conservaron en congelación. El procedimiento de extracción se realizó mediante el siguiente protocolo:

- 1.- Las muestras se maceraron con 1.0 ml de buffer TE, y se centrifugaron a 13,000 rpm, durante 5 min. y se decantó el sobrenadante.
- 2.- Se les agregó 1.0 ml de buffer TE, se repitió la centrifugación a 13,000 rpm, durante 5 min. y se decantó el sobrenadante.
- 3.- Se les agregó 400  $\mu$ l de TE. 10X.

4.- Se agregó 50  $\mu\text{l}$  de Lizosima (100 mg/ml), se agitaron con vortex hasta mezclar y se incubaron 1hr a 37<sup>o</sup> C.

5.- Se agregó 70  $\mu\text{l}$  de SDS al 10 % y 6  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K (10mg/ml) y se agitaron con vortex hasta mezclar y se incubaron 10 min. a 65<sup>o</sup>C. Se puede dejar toda la noche a 45<sup>o</sup>C. Después de la incubación se puede guardar el tubo a -20<sup>o</sup>C en congelación por tiempo indefinido.

6.- Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de cloruro de sodio (NaCl) 5M.

7.- Se agregaron 80  $\mu\text{l}$  de una solución CETAB/NaCl, y se agitaron con vortex hasta que el contenido del tubo se torne blanco lechoso y se incubaron 10 min. a 65<sup>o</sup> C.

8.- Se agregó un volumen igual (700 a 800  $\mu\text{l}$ ) de cloroformo/alcohol isoamilico 24:1, y se agitaron con vortex hasta mezclar y se centrifugaron 5 min. a 13,000 rpm.

9.- Se transfirió el sobrenadante de cada tubo (líquido claro de la parte superior aproximadamente 600  $\mu\text{l}$ ) a un tubo nuevo (evitando tomar interfase). Identificado previamente. Después de la incubación se puede guardar el tubo indefinidamente.

10.- Se agregó 0.6 volúmenes (350  $\mu\text{l}$ ) de isopropanol absoluto para precipitar los ácidos nucleicos, se incubó a -20<sup>o</sup>C en congelación durante 30 min. O toda la noche. Se puede quedar indefinidamente.

11.- Se centrifugaron 30 min. a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante en un frasco.

12.-Se lavó la pastilla de DNA que se encontró en el fondo del tubo con 1ml de etanol frío al 70%.

13.-Se centrifugaron 5 min. a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante, teniendo cuidado de no tirar la pastilla.

14.- Se dejaron los tubos los tubos abiertos a 37°C hasta que se secó la pastilla, aproximadamente 10 min.

15.- Una vez que se secó la pastilla, se resuspendieron en 50 µl de agua desionizada MILI-Q y se calentaron a 65°C por 5 min.

16.- Se corrieron las muestras en geles de agarosa al 1.0% a 120 volts durante 50 min.

#### 8.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR control y PCR anidada)

Las muestras que se obtuvieron de la extracción del DNA genómico fueron evaluadas, mediante la realización de una PCR control, utilizando los iniciadores CyB1 (MWG-Biotech) (5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') y CyB2 (MWG-Biotech) (5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3') que amplifican una región de 375pb del gen que codifica al **Citocromo b** mitocondial. La cantidad de DNA utilizado de cada muestra fue de 10µl y las concentraciones finales en la reacción de amplificación para 50µl fueron: Mg. 3mM, dNTP's .25mM, Buffer 1X, 1.0 pM de los iniciadores CyB1 y CyB2 y 2UI de la ADN Polimerasa Termoestable. Se usó un Termociclador "Gene Amp. PCR System 2400" de Perkin ELMER, con un programa de amplificación de 40 ciclos totales con 94°C para la desnaturalización por 35 seg. 58°C por 40seg. para la alineación y 72°C por 30 seg. para la amplificación.

En los productos amplificados con los iniciadores CyB1 y CyB2 se buscó la presencia de *Mycobacterium bovis* a través de una PCR simple utilizando los iniciadores TB1-F (MWG-Biotech) (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') y TBR-1

(MWG-Biotech) (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3') para amplificar una región de 375pb del gen que codifica la proteína de secreción MPB70 del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La cantidad de DNA utilizado de cada muestra fue de 10µl y las concentraciones finales en la reacción de amplificación para 50µl fueron: Mg. 3mM, dNTP's .25mM, Buffer 1x, .8pM de los iniciadores CyB1 y CyB2 y 2UI de la ADN Polimerasa Termoestable. Con un programa de amplificación de 24 ciclos totales con 94<sup>0</sup>C para la desnaturalización por 45 segundos, 58<sup>0</sup>C por 60seg. para la alineación y 72<sup>0</sup>C por 60seg. para la amplificación.<sup>68,69</sup>

Posteriormente en los productos amplificados con los iniciadores TB1-F y TBR-1 se buscó la presencia de *Mycobacterium bovis* a través de una PCR anidada utilizando los iniciadores M22/3 (5'-GCTGACGGCTGCACTGTCGGGC-3') y M22/4 (5'-CGTTGGCCGGGCTGGTTTGCC-3') que amplifican 208pb del gen MPB70. Para la PCR anidada se tomaron 10µl del PCR simple y las concentraciones finales en la reacción de amplificación para 50µl fueron: Mg. 3mM, dNTP's .25mM, Buffer 1x, .5pM de los iniciadores CyB1 y CyB2 y 2UI de la ADN Polimerasa Termoestable. Con un programa de amplificación de 40 ciclos totales con 95<sup>0</sup>C para la desnaturalización por 45seg, 72<sup>0</sup>C por 60seg para la alineación y 72<sup>0</sup>C por 60seg para la amplificación.

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron en el transluminador 4000, Strategene en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (10mg / ml). Para corroborar el tamaño de los productos de amplificación se utilizó un marcador de bajo rango de ADN ADNpBR322/Mspl Biotecnologías Universitarias empleando 3µl del marcador.

## 8.6 Análisis estadístico.

Se utilizó la prueba de Cohen's Kappa (STAT versión 7.1), la cual permite medir el grado de concordancia existente entre mediciones de la misma categoría estudiada. La estadística *kappa* tiene un rango de valores que van desde -1 hasta +1, dependiendo de la magnitud de la concordancia y la probabilidad de que ésta sea debida solamente al azar. La interpretación de este rango de valores se resume en el **Cuadro C**.

**Cuadro C.** Interpretación de la estadística *kappa* para evaluar el índice de concordancia.

Valor de <i>kappa</i>	Interpretación
1	Concordancia perfecta (no es debida al azar)
0.76 a 0.99	Concordancia excelente (mucho mayor que debida al azar)
0.40 a 0.75	Concordancia de adecuada a buena (mayor que la debida al azar)
0.01 a 0.39	Concordancia insuficiente (puede ser debida Solamente al azar)
0.00 a -1	Concordancia inadecuada (menor de la que puede ser debida al azar)

Adaptado de Fleiss (1981)

## 9. Resultados

### 9.1 Estudio anatomopatológico:

Para determinar la presencia de lesiones visibles sugestivas a tuberculosis en este estudio, se inspeccionaron 23 canales obteniéndose las siguientes muestras: NLTB, NLSM, NLR, NLP, NLSM, NLMT, NLPR, NLI y P. Los resultados demostraron lesiones macroscópicas visibles (**LV**) sugestivas a tuberculosis sólo en 8 canales (39.16%) (**Figura 1 y 2**), siendo los NLM los más afectados con 4 casos (50%), seguido de los LNR con 3 casos (37.5%), las cuales se caracterizaron por tener aspecto nodular de color amarillento, dichas estructuras presentaban diversos tamaños de entre 2 mm hasta varios centímetros de diámetro, la mayoría de ellos con mineralización crepitante al corte y delimitados por una cápsula (**Cuadro 1**). En los 15 casos restantes se observó un aumento de tamaño generalizado en algunos nódulos linfoides, que al corte solo denotaban una coloración rojiza entre la corteza y la médula.



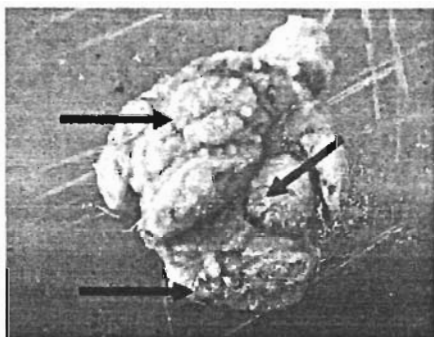
**Cuadro 1.** Resultados de la inspección *post mortem* de 23 vacas reactoras a la tuberculina incluidos en este estudio

No.	Lesiones sugestivas de tuberculosis	Localización.	Tamaño/Número
1	CLV	NLM y P	(+++)
2	CLV	NLTB y P.	(+++)
3	CLV	NLM y NLH	(+++)
4	CLV	NLR y NLM	(+++)
5	CLV	NLR	(+++)
6	CLV	N.L	(++)
7	CLV.	NLTB y NLR	(++)
8	CLV	NLM y NLR	(+++)
9	SLV	SLV	SLV
10	SLV	SLV	SLV
11	SLV	SLV	SLV
12	SLV	SLV	SLV
13	SLV	SLV	SLV
14	SLV	SLV	SLV
15	SLV	SLV	SLV
16	SLV	SLV	SLV
17	SLV	SLV	SLV
18	SLV	SLV	SLV
19	SLV	SLV	SLV
20	SLV	SLV	SLV
21	SLV	SLV	SLV
22	SLV	SLV	SLV
23	SLV	SLV	SLV

**CLV:** Con lesiones visibles; **SLV:** Sin lesiones visibles; **(+)** Lesiones de menos de 5 mm de diámetro y de 1 a 2 lesiones visibles; **(++)** Lesiones entre los 6 y 10 mm; **(+++)** Lesiones múltiples mayores a 10 mm. Nódulos Linfoides: Sub-mandibular (**NLSM**) Retrofaringeos (**NLR**), traqueobronquiales (**NLTB**), mediastínicos (**NLM**), pre-escapulares (**NLP**), precurales (**NLPR**), iliacos (**NLI**), supramamarios (**NLSM**) hepático (**NLH**) y poplíteos (**NLPO**). Tejido pulmonar (**P**).



**Figura 1.** Lesiones granulomatosas en la médula de nódulos linfoides traqueobronquiales.



**Figura 2.** Lesiones granulomatosas en la cápsula de nódulo linfoide Retrofaríngeo.

## 9.2 Clasificación de lesiones.

Tipo I.- Exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloideas, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas y ausencia de fibrosis. **Figura 3.**

Tipo II.- Similares a las tipo I pero con una necrosis caseosa, fibrosis y con diversos grados de acúmulos de material sugestivo a calcio. **Figura 4.**

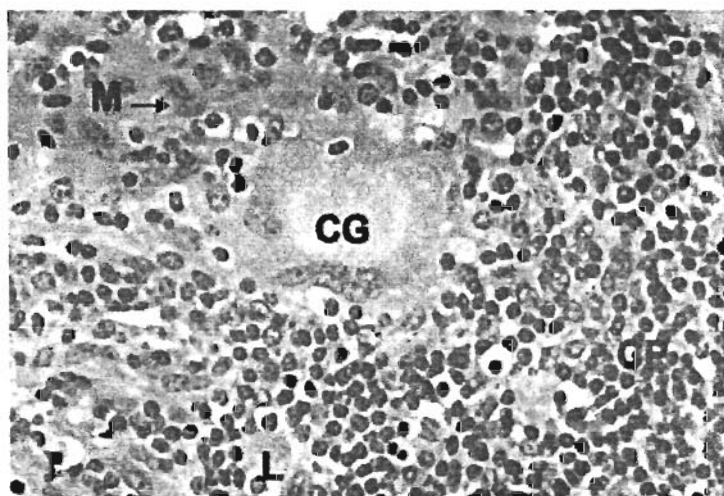
Tipo III.- Corresponde a la lesión típica del granuloma, las mismas características de la lesión tipo II pero con una capa fibrosa gruesa y necrosis caseosa central. **Figura 5a y 5b.**

## 9.3 Análisis histopatológico

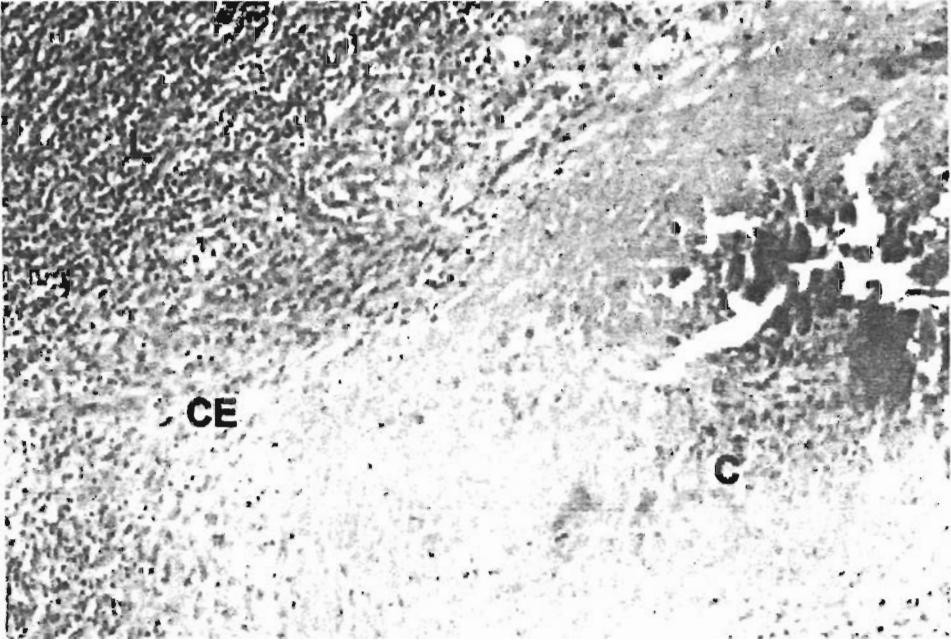
Al análisis histopatológico de las muestras se encontraron 26 lesiones sugestivas a TBB, 11 casos del tipo I (42.3%), del tipo II (38.4%) y del tipo III (19.2%). En orden descendente por número de lesiones en los órganos analizados se encontraron 9 en NLR, 6 en NLTB, 5 en Pulmón y 2 en NLS. En todos los órganos analizados se encontraron lesiones de los 3 tipos a excepción del NL submandibular donde no se hallaron lesiones del tipo III. (**Cuadros 2-6**). Solo en 2 animales reactivos se encontraron lesiones en pulmones, una de ellos solo visible a la histopatología (**Cuadro 6**). La depleción linfóide se encontró en todos los NL, en NLR en 6 casos, NLM en 4, y 3 en NLS o NLTB. En el tejido linfóide asociado a los bronquiolos en el pulmón no se observó depleción linfóide. La concordancia entre lesiones a la inspección post mortem e histopatológicas fue  $k = 0.59$ .

Independientemente del órgano, así como del tipo de lesión, se encontraron bacilos ácido alcohol resistentes a la tinción de Ziehl Neelsen en todas las lesiones microscópicas identificadas a la histopatología (**Cuadros 2-6**). La localización de las bacterias estaba confinada al citoplasma de células gigantes tipo Langhans, **Figura 6**. En los cambios degenerativos identificados como depleción linfóide no se encontraron bacterias. La concordancia entre lesiones microscópicas y macroscópicas con la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes fue ( $k = 1$ ) y

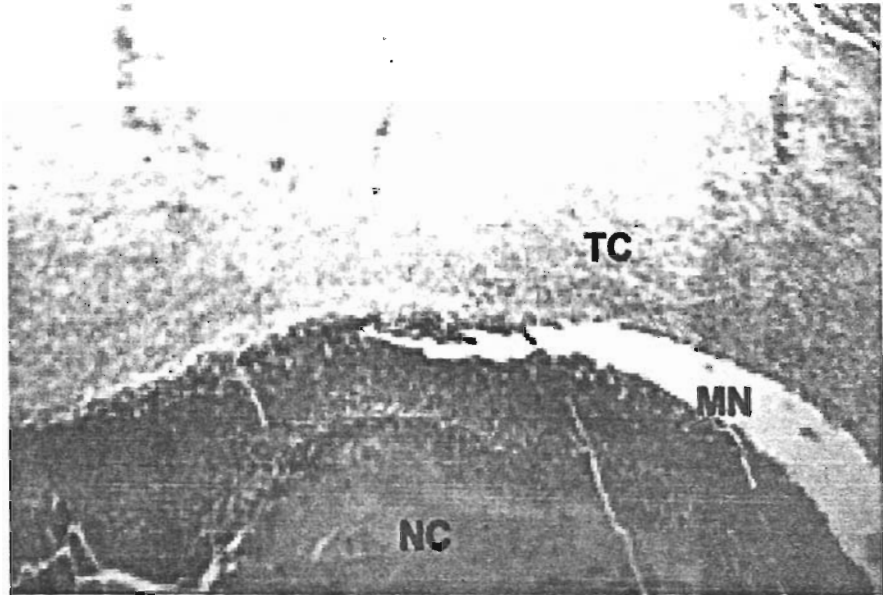
( $k = 0.59$ ), respectivamente. En cuanto a la concordancia entre la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes y con los tipos histológicos la concordancia se encontró en los tipos I de ( $k = 0.87$ ), II de ( $k = 0.86$ ) y en los tipo III de ( $k = 0.41$ ).



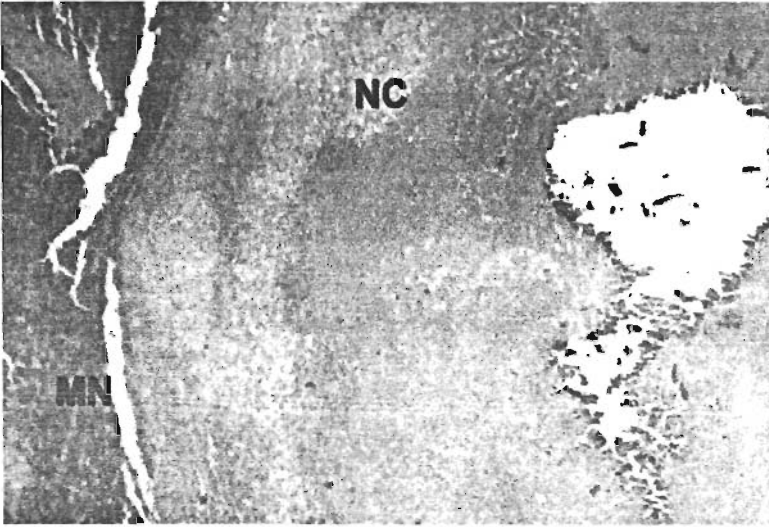
**Figura 3.** Clasificación histopatológica Tipo I: Exudado de macrófagos (M), células gigantes (CG), linfocitos (L) y células plasmáticas (CP), además de la ausencia de fibrosis y calcificación. H.E 40X.



**Figura 4.** Clasificación histopatológica Tipo III: Lesión similar al de tipo I, mostrando necrosis caseosa y posible calcificación al centro (C) caracterizado por un intenso precipitado basófilo. Posterior al centro caseoso se observan células inflamatorias principalmente células epiteloideas (CE) y M $\phi$ , más hacia la periferia un intenso puntilleo basófilo que corresponde al acúmulo de linfocitos. (L) , H.E 40X

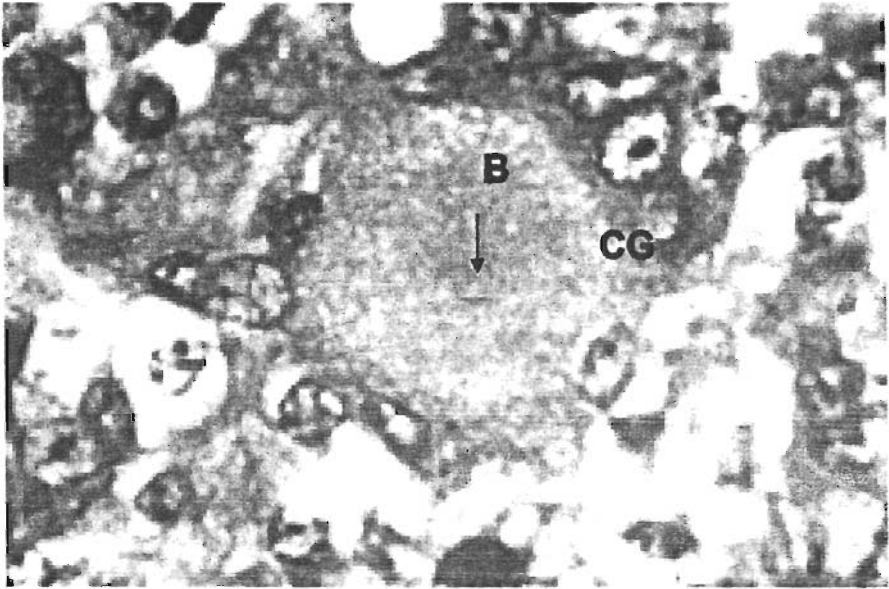


**Figura 5a:** Clasificación histopatológica Tipo III: Se observa un centro de necrosis caseosa (**NC**) y a la periferia se observa un infiltrado celular predominantemente mononuclear (**MN**) y una gruesa capa de tejido conectivo (**TC**), H.E., 10X.



**Figura 5b:** Granuloma típico, donde se observa una amplia zona eosinofílica que corresponde a una necrosis caseosa (NC) delimitada por una franja intensamente basófila que corresponde al infiltrado mononuclear (MN). H.E., 10X.

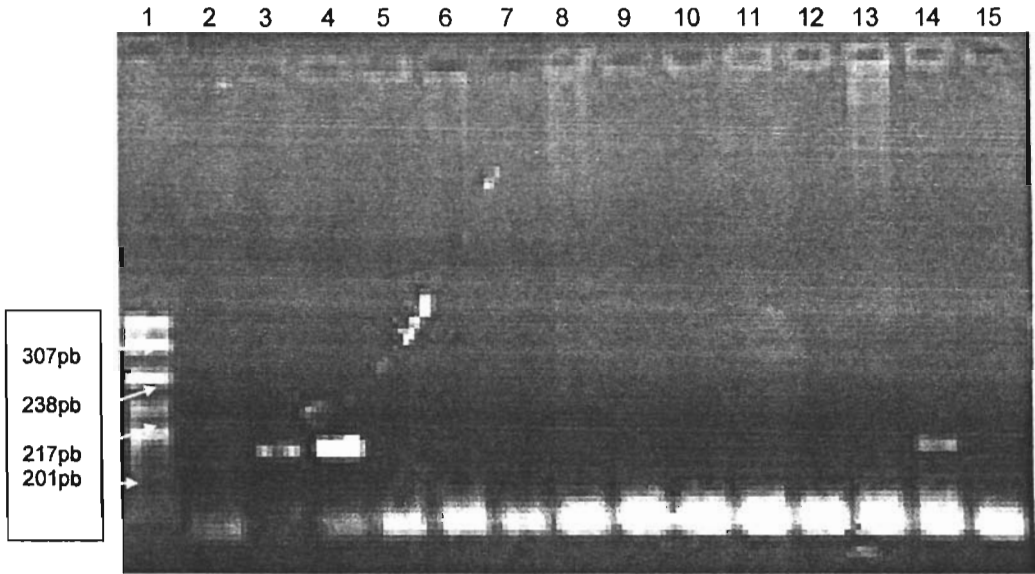




**Figura 6** Identificación de bacilos (B) ácido alcohol resistentes (BAAR) dentro de una célula gigante (CG) Mediante la tinción de Ziehl Neelsen, 100X.

#### 9.4 Estudio de PCR:

A partir de las muestras colectadas en la inspección y de forma separada se aisló DNA total para analizar la presencia de *M. bovis* mediante una PCR anidada. (FIGURA 7). De las 44 muestras analizadas en total, 24 muestras resultaron positivas PCR (54.5%). Las muestras positivas a PCR correspondían a 10 de las 23 vacas reactoras (43.4%). En 6 vacas se obtuvo una reacción de PCR positiva en más de una muestra y en las cuatro restantes solo en una ocasión. De los NL traquebronquiales 5 de 7 casos resultaron positivos, en los retrofaringeos 6 de 10, en los mediastínicos 2 de 8, en los submandibulares 4 de 9 y en pulmones 7 de 10. La concordancia de la PCR con la presencia de lesiones visibles a la IP o lesiones histopatológicas fue inadecuada.



**Figura 7.** Gel de agarosa al 2%. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: *M. avium*. Carril 3 y 4: *M. bovis*. AN5. Carril 5-13: Muestras de tejido negativas. Carril 14: Muestra de tejido positiva con un peso de 208pb. Carril 15: Agua.

**Cuadro 2.** Resultados a la inspección post mortem, histopatología y PCR de linfonodos traqueobronqueales recuperados de 7 vacas rectoras a la tuberculosis.

NL. No.	Vaca No.	PCR	LV	Tipo de lesión Histológica				ZN
				I	II	III	DP	
1	2	(-)	(+)			*		(+)
2	3	(+)	(-)	*				(+)
3	5	(+)	(-)				*	(-)
4	7	(-)	(+)	*	*			(+)
5	13	(+)	(-)				*	(-)
6	19	(+)	(-)				*	(-)
7	23	(+)	(-)	*	*			(+)
	Total	5	2	3	2	1	3	4

LV: Lesiones Visibles. DP: Depresión Linfóide. ZN: Ziehl Neelsen. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tipo I: Exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloides, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas, además de ausencia de fibrosis. Tipo II: Similares a las tipo I pero con una necrosis caseosa y fibrosis, con diversos grados de calcificación. Tipo III: Corresponde a la lesión típica del granuloma, las mismas características de la lesión tipo II pero con una capa fibrosa gruesa y necrosis caseosa central.

**Cuadro 3.** Resultados a la inspección post mortem, histopatología y PCR de linfonodos retrofaringeo recuperados de 10 vacas rectoras a la tuberculosis.

NL. No.	Vaca No.	PCR	LV	Tipo de lesión Histológica				ZN
				I	II	III	DP	
1	2	(+)	(-)	*				(+)
2	3	(+)	(-)				*	(-)
3	4	(-)	(+)	*	*	*		(+)
4	5	(-)	(+)	*	*	*		(+)
5	7	(-)	(+)	*	*			(+)
6	11	(-)	(-)				*	(-)
7	13	(+)	(-)				*	(-)
8	19	(+)	(-)				*	(-)
9	22	(+)	(-)				*	(-)
10	23	(+)	(-)				*	(-)
	Total	6	3	4	3	2	6	4

LV: Lesiones Visibles. DP: Depresión Linfóide. ZN: Ziehl Neelsen. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tipo I: Exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloides, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas, además de ausencia de fibrosis. Tipo II: Similares a las tipo I pero con una necrosis caseosa y fibrosis, con diversos grados de calcificación. Tipo III: Corresponde a la lesión típica del granuloma, las mismas características de la lesión tipo II pero con una capa fibrosa gruesa y necrosis caseosa central.

**Cuadro 4.** Resultados a la inspección post mortem, histopatología y PCR de linfonodos mediastínico recuperados de 8 vacas reactoras a la tuberculina.

NL. No.	Vaca No.	PCR	LV	Tipo de lesion Histológica				ZN
				I	II	III	DP	
1	2	(-)	(-)				*	(-)
2	3	(+)	(-)		*	*		(+)
3	5	(-)	(-)					(-)
4	7	(-)	(-)				*	(-)
5	13	(-)	(-)					(-)
6	19	(+)	(-)				*	(-)
7	22	(-)	(-)				*	(-)
8	23	(-)	(-)	*	*			(+)
	Total	2	0	1	2	1	4	2

LV: Lesiones Visibles. DP: Depleción Linfoide. Z.N: Ziehl Neelsen. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tipo I: Exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloideas, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas, además de ausencia de fibrosis. Tipo II: Similares a las tipo I pero con una necrosis caseosa y fibrosis, con diversos grados de calcificación. Tipo III: Corresponde a la lesión típica del granuloma, las mismas características de la lesión tipo II pero con una capa fibrosa gruesa y necrosis caseosa central.

**Cuadro 5.** Resultados a la inspección post mortem, histopatología y PCR de linfonodos submandibular recuperados de 9 vacas reactoras a la tuberculina.

NL. No.	Vaca No.	PCR	LV	Tipo de lesion Histológica				ZN
				I	II	III	DP	
1	2	(-)	(-)					(-)
2	3	(+)	(-)	*	*			(+)
3	4	(+)	(-)					(-)
4	5	(-)	(-)					(-)
5	7	(-)	(-)				*	(-)
6	11	(-)	(-)					(-)
7	13	(+)	(-)				*	(-)
8	19	(+)	(-)					(-)
9	23	(-)	(-)				*	(-)
	Total	4	0	1	1	0	3	1

LV: Lesiones Visibles. DP: Depleción Linfoide. Z.N: Ziehl Neelsen. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tipo I: Exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloideas, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas, además de ausencia de fibrosis. Tipo II: Similares a las tipo I pero con una necrosis caseosa y fibrosis, con diversos grados de calcificación. Tipo III: Corresponde a la lesión típica del granuloma, las mismas características de la lesión tipo II pero con una capa fibrosa gruesa y necrosis caseosa central.

**Cuadro 6.** Resultados a la inspección post mortem, histopatología y PCR de pulmones recuperados de 10 vacas reactoras a la tuberculina.

NL. No.	Vaca No.	PCR	LV	Tipo de lesion Histológica				ZN
				I	II	III	DP	
1	1	(+)	(+)	*	*	*		(+)
2	2	(-)	(+)	*	*			(+)
3	3	(+)	(-)					(-)
4	4	(+)	(-)					(-)
5	5	(+)	(-)					(-)
6	7	(+)	(-)					(-)
7	11	(-)	(-)					(-)
8	19	(+)	(-)					(-)
9	20	(-)	(-)					(-)
10	22	(+)	(-)					(-)
	Total	7	2	2	2	1	0	2

LV: Lesiones Visibles. DP: Depresión Linfoide. Z.N: Ziehl Neelsen. PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tipo I: Exudados con neutrófilos, monocitos, macrófagos, células epiteloides, células gigantes, linfocitos y células plasmáticas, además de ausencia de fibrosis. Tipo II: Similares a las tipo I pero con una necrosis caseosa y fibrosis, con diversos grados de calcificación. Tipo III: Corresponde a la lesión típica del granuloma, las mismas características de la lesión tipo II pero con una capa fibrosa gruesa y necrosis caseosa central.

## 10. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo utilizando una PCR anidada específica para una secuencia del gen MPB70 del complejo *M. tuberculosis*, se analizó la presencia de *M. bovis* en 23 bovinos reactivos a la tuberculina de un hato en donde ya se habían tomado acciones de control sustentadas en la Norma Oficial Mexicana (NOM), es decir mediante prueba de tuberculina y sacrificio. Adicionalmente, se analizó la relación que guardan los resultados de la PCR anidada con algunos parámetros, tales como: Tipo de lesión histopatológica, sitio de lesión macroscópica y presencia de bacilos ácido alcohol resistentes.

La prueba de tuberculina en cualquiera de sus modalidades tiene una baja especificidad comparada con las pruebas inmunológicas y moleculares, tal como se demuestra en diversos trabajos. Lo anterior debido a que el PPD está preparado a partir de cultivos de *M. bovis* cepa AN5 especie que comparte más del 95% de su genoma con cualquier otra bacteria del mismo género, incluyendo las especies atípicas y las del complejo *M. avium*. Lo cual nos puede llevar a obtener resultados falsos positivos o falsos negativos, por lo que es necesario desarrollar métodos de diagnóstico altamente sensibles para identificar animales infectados, es decir, señalar todos los animales enfermos y sanos.

Es por eso que en este trabajo se consideró importante el diagnóstico de la Tb por medio de la biología molecular, utilizando la técnica de PCR y la relación que guarda con esta prueba el tipo de lesión histopatológica, sitio de lesión macroscópica y presencia de bacilos ácido alcohol resistentes.

Únicamente en poco más de la tercera parte de bovinos reactivos analizados se encontraron lesiones visibles sugestivas a TB 8/23 (39%). siendo los NLM los más afectados con 4 casos (50%), seguido de los LNR con 3 casos (37.5%), los NLTB con 2 (8.6%), los NLH con 1 (4.3%) Y tan solo 2 animales con lesiones en los pulmones (8.6%). En todos los demás NL inspeccionados se

encontró evidencia de cambios inespecíficos, como el aumento de tamaño y congestión. Este resultado se considera bajo en comparación al obtenido por Estrada-Chávez (1995), el cual encontró que el 67% de animales provenientes de un hato de alta prevalencia presentaban lesiones sugestivas a TB.

Se considera que en explotaciones en las que no se ha realizado ningún tipo de control y saneamiento de la Tb., es posible encontrar hasta un 90% de animales reactivos con lesiones en NL asociados al tracto respiratorio y hasta un 64% de animales con un foco primario en el tejido pulmonar. Conforme la prevalencia disminuye y es establecido un programa de control de la TB, el porcentaje de animales con lesiones IP se reduce. (Estrada-Chávez 1995).

El 25% de los animales presentó lesiones en un solo órgano (2/23), mientras que el otro 75% presentó lesiones en diferentes localizaciones. La presencia de lesiones en NL asociados al tracto respiratorio ha sido descrita en diversos trabajos y se considera característica de la TB, ya que del 23% al 32% de los animales tuberculosos las presentan (Estrada-Chávez, 1995; Whipple y Col., 1996; Corner, 1994)

La frecuencia y localización de las lesiones en este estudio se asemeja a lo reportado por otros autores, los cuales han encontrado que los NL más afectados son los relacionados con la cavidad torácica y en segundo lugar, están representados los NL asociados al tracto respiratorio superior o de la cabeza (Nelly y Col., 2001). Con respecto a este último punto, recientemente han sido descritas las lesiones en tonsilas, sugiriendo otra ruta de infección vía nasofaringe y orofaringe (Cassidy y Col., 1999).

Por otro lado, el 65% (15/23) de los animales sacrificados no tuvieron lesiones visibles, la ausencia de lesiones visibles también sugiere que la infección era reciente en estos animales. No obstante, otra posibilidad es que las lesiones

hayan sido muy pequeñas como para observarse a simple vista, recordando que la IP está sujeta a error (Corner, 1994).

A la histopatología, en todos los órganos analizados se encontraron lesiones de los 3 tipos definidos. Las lesiones estaban localizadas principalmente en NLR, NLTB y en Pulmón. El 25% de los animales presentaron lesiones en un solo órgano (2/8), mientras que el otro 75% presentó lesiones en diferentes localizaciones. Las lesiones en pulmón y NL traqueobronquiales son consideradas como los focos primarios en la patogénesis de la TB. La lesión única encontrada en los NL hepáticos podrían ser un indicio de una infección diseminada a partir del foco primario (Goodchild y Col., 2001), y con menor probabilidad a una infección congénita, ya que son poco frecuentes (Francis, 1958.)

Casi la mitad del total de las lesiones eran del tipo I (42.3%) y del tipo II (38.4%), describiéndose en menor grado del tipo III (19.2%). Las tipo I corresponden a lesiones tempranas, las tipo III a granulomas típicos crónicos bien encapsulados y mineralizados con necrosis central extensa, mientras que los tipo II son lesiones en transición del tipo I al tipo III con poca necrosis, mineralización y capsula definida pero delgada. Considerando estas diferencias es posible sugerir que en la mayoría de los animales se encontraron lesiones de los diversos tipos debido a que cada lesión es un proceso independiente, lo cual concuerda con lo mencionada previamente por Danenberg 1991 en el modelo de conejo, uno de los más estudiados. Adicionalmente, sería importante definir si el inicio de los procesos es vía endógeno o exógena, ya se debido a confluencia y diseminación de bacilos a partir de un foco primario o debido a una reinfección resultado de la transmisión y contacto entre dos animales infectados. En la explotación en donde se realizó el estudio la movilización de animales es nula, por lo que se piensa que la infección respiratoria entre animales es la ruta más importante de transmisión en comparación con aquellos en que la infección puede provenir de fuentes externas, ya sea por la introducción de animales infectados o por la cercanía de explotaciones contaminadas (Goodchild y Col., 2001)



La concordancia entre las LV e histológicas fue muy buena ( $k=59$ ), esta concordancia no es debido al azar, ya que al tener una lesión visible sugestiva a TB encontraremos una lesión ya sea tipo I, II o III con las características histológicas antes descritas. Asimismo la concordancia entre las lesiones ya fueran visibles o microscópicas con la presencia de BAAR fueron de ( $k=59$ ) y ( $k=1$ ) respectivamente, lo que nos indica que los BAAR están presentes en cualquiera que sea la lesión. En particular, los tipos histológicos I y 2 mostraron excelente concordancia ( $k =85$ ), pero solo fue buena con los tipo III ( $k = 0.41$ ). Estos últimos datos podrían estar relacionados con la cantidad de bacilos presentes en cada lesión, ya que es común que su presencia disminuya conforme aumenta la necrosis y licuefacción del tejido.

Por otro lado, la depleción linfóide se encontró en todas las muestras sin lesiones sugestivas de Tb, con mayor frecuencia en los NLR y mediastínicos, pero ningún caso coincidió con la identificación de BAAR. Actualmente, utilizando como referencia los estudios realizados con pacientes de diversas latitudes, así como datos epidemiológicos en bovinos, se considera que más de la mitad de los individuos en la mayoría de las poblaciones muestra una resistencia natural a las micobacterias patógenas a bajas dosis. La transmisión de la Tb tiene una tasa denominada intermitente y puede traducirse como baja en general, aunque el periodo reciente a la primo infección es más común y posteriormente es más bien raro (Romero. 2003, Neill y Col, 1994). Asimismo la dosis de infección generalmente es baja y más baja aún en relación a la prevalencia y a la severidad de los casos. Con toda esta información generada y los hallazgos presentados es posible suponer que la depleción linfóide podría en las vacas reactivas haber sido originada debido a infecciones que lograron ser controladas por la respuesta inmune.

Es pertinente resaltar la importancia de la histopatología para el diagnóstico y control de la Tb. En este trabajo se encontró un caso con lesiones microscópicas sin lesiones macroscópicas, presentado lesiones del tipo I y II en el NLM.

Algunas de las lesiones microscópicas mostraron una presencia importante de un infiltrado polimorfonuclear. Se sabe que los neutrófilos son atraídos al sitio de lesión por la acción quimiotáctica de la IL-8 y TNF- $\alpha$ , y que juegan un papel importante en la etapa inicial de la patogénia y en la formación del granuloma (Cassidy y Col., 1999).

Cerca de la mitad de las vacas rectoras se encontraron positivas a PCR (43%) y en más de la mitad de (54%), se obtuvo amplificación del fragmento de 208 PB del gen MPB70 en más de un órgano analizado. En un estudio previo donde se validó el uso de esta herramienta para el diagnóstico, se encontró un sensibilidad del 100% de la PCR y una especificidad del 77% con una prevalencia real calculada del 37% (estrada-Chávez 2004). No obstante que no se analizaron todos los mismos órganos en cada uno de los animales, en el presente trabajo se analizaron órganos independientes, siendo los NL más comúnmente afectados los retrofaríngeos y los traqueobronquiales, ya que más de la mitad de casos analizados resultaron positivos.

No obstante el análisis estadístico mostró una concordancia inadecuada de la patología con los resultados de PCR ( $k < 0.4$ ). Esto no quiere decir que los animales con lesiones sugestivas a TB, no sean detectados mediante la PCR. Se sabe que la excreción de la micobacteria es intermitente, pudiéndose haber perdido un evento de excreción bacteriana durante la cual no se tomó muestra. Nelly (1992), demostró que bajas dosis infectivas no causan enfermedad, ni el desarrollo de lesiones visibles al sacrificio.

Otra razón de este resultado es posiblemente debido a las diferencias en la prevalencia del hato la cual es alta (43%). También no se debe olvidar factores epidemiológicos como son la función zootécnica, la etapa productiva de los animales, el sexo la edad, la raza, las prácticas zootécnicas, el tamaño del hato, la densidad de población, las instalaciones ( hacinamiento y deficientes prácticas de limpieza), etc., que pudieran también intervenir en este proceso.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio y a lo reportado por varios autores las técnicas de PCR deben considerarse como una prueba complementaria para el diagnóstico de la Tb., además también en este estudio se logró amplificar un control positivo *M. bovis* en todos los PCR's que se realizaron, por lo que se descarta la posibilidad de error en la técnica de PCR, por lo tanto los resultados obtenidos en este trabajo son válidos.

## 11. CONCLUSIONES.

- El presente trabajo permitió reforzar la importancia que tiene la tipificación histopatológicas de las lesiones para obtener información de la epidemiología de la Tb en una unidad de producción.
- La relaciones de la presencia de *M. bovis* en tejidos de animales positivos a la prueba de tuberculina sin la necesidad de cultivo es sin duda un aporte importante para la valoración de la prueba oficial y el diagnóstico oportuno de la Tb en tejidos fresco obtenidos bajo condiciones de alta prevalencia o al menos por arriba del 30%.
- La utilización de métodos moleculares como la PCR anidada, pueden ser herramientas útiles altamente sensibles y específicas en la detección de animales que están diseminando la enfermedad, con la finalidad de controlar la Tb en explotación.
- Se requieren futuras investigaciones, las cuales midan la relación entre los diversos factores epidemiológicos como el medio ambiente, nutrición, estrés, manejo zootécnico, entre otros, con la presencia de *M. bovis* en los tejidos de los animales reactivos a la prueba de tuberculina.

## 12. Referencias Bibliográficas.

- 1.- Rosenberger, G .1983. Enfermedades de los Bovinos. 1ª. edición en español Edit. Hemisferio Sur. S.A Buenos aires Argentina. Tomo-II, p.139-151
- 2.- Bernard, D. 1987. Tratado de Microbiología. 4ª. Edición. Salvat Editores S.A México. p. 868-889.
- 3.- Carter, G. 1994. Bacteriología y Micología Veterinarias. 2ª. Edición. Edit. Manual Moderno. México .p 361-364
- 4.- Acha, P. 1986. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al hombre y a los animales. Edit. Organización Panamericana de la Salud. E.U.A.
- 5.- De Cantor, I.N, Ritacco, V.1994 Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs.Veterinary Microbiology. 40:5-14
- 6.- Manual de actualización técnica para la aprobación del médico veterinario en Tuberculosis bovina y Brucelosis. SAGAR. Comisión para la erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CONETB)Octubre de 1998.
- 7.- Doseti, D.J.G. 1993. Análisis del daño económico producido por la tuberculosis bovina en once establos lecheros durante un programa de control. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. FES-Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. Mex. P40
- 8.- Moda, G., Daborn, C., Grange, J.M., Cosivi, O. 1996. The zoonotic importance of Mycobacterium bovis. Tubercle and lung disease. 77. 103-108
- 9.- Grange, J.M., Yates, M.D. 1994. Zoonotic aspects of Mycobacterium bovis infection. Veterinary Microbiology. 40. 137-151
- 10.- Beer, J. Enfermedades Infecciosas de los animales domésticos; Enfermedades producidas por bacterias y hongos e intoxicaciones, 1ª edición, Zaragoza España, Edit. ACRIBIA, S. A, 1981 Tomo II, Cap. 25, p. 228-248
- 11.- Blood, D. C. Medicina Veterinaria; Libro de texto de las enfermedades del ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y equino, 7a. Edición, Madrid España. Edit. Interamericana McGraw-Hill, 1992, Volumen I, Cap, IV, p.764-785.
- 12.- Grange, J.M 2001. Micobacterium bovis infection in human beings. Tuberculosis 81 (1/2):71-77

- 13.- Millán, S.F., Sánchez M.L, Toledo P., Ramírez C., Santillán M. 2000 Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.42:13-19
- 14.- Díaz, O.F. 2000. Aislamiento y caracterización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium bovis* que estimulan Linfocitos T de bovino. Tesis de Doctorado, C.U. UNAM.
15. - Cervantes, O.R.A 1993. Descripción de la tuberculosis y generalidades de la enfermedad en "Curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis" pp 6-8 Comisión Nacional de erradicación de la tuberculosis y brucelosis. México, D.F
16. - Sut, A, Sirugue S, Sixou S, Lakhdar-Ghazal F, Tocanne JF, Laneelle G 1990. Mycobacteria glycolipids as potential pathogenicity effectors: alteration of model and natural membranes *Biochemistry*.29(36):8498-502.
17. - Venisse, A., Fournie J. J., Puzo 1995. Mannosylated lipoarabinomannan interacts with phagocytes. *Eur .J Biochem* , 231(2):440-7
18. - Brennan, J.P. Draper, P.1994 Ultraestructure of *Mycobacterium tuberculosis*. En *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control* ed. American Microbiology Press. Pp 2273-274 D.C
- 19.- Brooks, F. 1999. *Microbiología Médica*. Edit. Manual Moderno. México.
- 20.- Campuzano, J.G. 2001. Comparación de diferentes pruebas anatopatológicas y microbiológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Tesis de Maestría. C.U UNAM
- 21.- Vera, A. 1988. Supervivencia de *M. bovis*. En agua. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*. Habana. 15: 243
- 22.- Vera, A. 1980. Supervivencia del *M. bovis*. Sobre superficies de cemento en época de verano. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*. Habana.11:113-118
- 23.- Vera, A. 1980. Importancia de las heces fecales como fuente secundaria de infección en la Tuberculosis Bovina. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*. Habana. 11:227-233
- 24.- Morris, R., Pfeiffer. D., Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis*. *Infections*. *Veterinary microbiology*. 40: 153-177
- 25.- Goodchild, A., Clifton-Hadley R. 2001. Cattle to cattle transmisión of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81:23-41

- 26.- Katheleen, A., Kress and Barry Y. 1993. Pathogenesis of Tuberculosis: Interacción of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. Howar Hughes Medical Institute and Albert Einstein College of Medicine. E.U.A p.2763-2773
- 27.- Neill, S.D., Hanna, J., Mackie, D.P., Bryson, T.G.1992. Isolationa of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet. Rec.* 18, 45-47
- 28.- Neill, S.D., Hanna, J., O'Brien, J.J. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentaly infected cattle. *Vet. Rec.* 123, 340-350.
- 29.- Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiology.* 40, 41-52
- 30.- Thoen, C.O. "Mycobacterium bovis infection in cattle: Pathogenesis". Departament of Microbiology and Preventive Medicine Iowa State University. Simposio de "Tuberculosis Bovina"; XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias, Memorias de los trabajos presentados en el congreso realizado en Acapulco, Gro, México, del 9 al 15 de Octubre de 1994. p 3-11
- 31.- Lee, R.E., Brennan, P.J., Besra, G.S. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelop. Tuberculosis.
- 32.- Robbins, 2000. Patología Estructural y Funcional. Edit. Mc. Graw-Hill Internacional. México.
- 33.- Trigo, F. 1998. Patología Sistémica Veterinaria. 3ª. Edición. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México.
- 34.- Hirsch, C.S., Ellner, J.J., Russell, D.G., Rich, E.A. 1994. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha-mediated growtho inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J. Immunol.* 152, 743-753.
- 35.- Schlesinger, L.S., Bellinger, C.G., Payne, N.R., Horwitz, M.A. 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J. Immunol.* 144. 2771-2780
- 36.- Felton, M.J., Vermeulen, M.W. 1996. Inmunopathology of tuberculosis. Roles of macrophages and monocytes. *Inf. Immun.* 64, 683-690.
- 37.- Dannenberg, A.M. 1993. Inmunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp. Pract.* 28, 33-58.

- 38.- Edwards, D., Kirkpatrick, H.C. 1986. The immunology of Mycobacterial Diseases. Am. Rev. Respir. Dis. 134, 1062-1071.
- 39.- Gyles, L.C., Thoen, O.C. 1986. Pathogenesis of micobacterial Infections in Animals. Iowa State University. Am. Press.
- 40.- Cassidy, J.P., Bryson, D.G., Pollock, J.M., Evans, R.T., Forster, F., Neill, S.D. 1998. Early Lesion Formation in Cattle Experimentally Infected With *Mycobacterium bovis*. J. Comp. Path. 119, 27-44
- 41.- Estrada, C.C. 1995. Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de intradermorreacción, interferón gama y Elisa, basado en la inspección postmortem. Tesis de Licenciatura. FESC. UNAM.
- 42.- Francis, J. Tuberculosis in animals and man; A study in comparative pathology; Casell and company limited London; First published 1958. 420-425
- 43.- Griffin, J.F.T. 1989. Stress and Inmunity, a unifying concept. Vet. Inmunol. Immunopathol. 20, 263-312
- 44.- Cotrina, P.N. 1986. Epizootiología de la Tuberculosis Bovina, 1ª Edición, México D.F p. 52-53
- 45.- Tizard, I. 1987. Inmunología Veterinaria. 3ª. Edición.Edit. Interamericana. McGraw-Hill. México.
- 46.- Beek, J.S., Morley, S.M., Lowe, J.G. 1988. Diversity in immigration of CD4 and CD8 lymphocytes in different microanatomical compartments of the skin in the tuberculosis reaction in man. Br. J. Exp. Pathol. 69, 771-776
- 47.- Roberts, G.D., Koneman, E.W., Kim, Y.K. 1991. Mycobacterium. In manual of clinical microbiology, 5<sup>th</sup> ed. Ed. American Society for Microbiology. Washington D.C
- 48.- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J. 1994. The tuberculin test. Veterinary microbiology. 40, 111-124.
- 49.- Díaz, O.F., Banda, R.V., Jaramillo, M.L., Arriaga, D.C., González S.D., Estrada, C.C. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. Vet. Méx. 34, 13-26
- 50.- O'Reilly, M.L. 1995. The usefulness of ELISA for the diagnosis of tuberculosis in man and animals: A review. Veterinary Reserch Laboratory. Dublin.



- 51.- Sánchez, G.J. 2000. Reacción en Cadena de la Polimerasa y restricción enzimática (NESTED PCR-REA) para el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina. Informe de Servicio Social Legal. UAM Xochimilco.
- 52.- Ritacco, V.M.D. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*. 50. 365-367
- 53.- McNeil, M.R., Brennan, P.J. 1991. Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacterial in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance, some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Res. Microbiol.* 142. 451-463
- 54.- Moghel, N.J.M. 1981. Relación entre la prueba de intradermorreacción, hallazgos postmortem y estudio bacteriológico en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. FESC.
- 55.- Corner, L.A. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary microbiology*. 40. 56-63
- 56.- Whipple, D.L., Bolin, C.A., Millar, J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Diagn. Invest.* 8. 351-354
- 57.- Ramirez, I. C., Valero, G. 1997. Diagnóstico de la tuberculosis bovina por pruebas diferentes a la tuberculinización. INIFAP-SARH. P.1-6
- 58.- Barrera, S. H. A., Ortiz, L.R., Rojas. M.A., Resendiz, P.D. 1993. Reacción en Cadena de la Polimerasa. *Ciencia y Desarrollo*. 108. 50-61
- 59.- Barry, T., Glenon, M., Smith and Ganoon F. 1993. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. *Veterinary record*. 132. 66-67
- 60.- Brisson, A., Gicquel, B., Lecossier, D., Levy-Frebault, V., Nassif and Hae A. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *The lancet*. 4. 1069-1071
- 61.- Wilton, S., Cousins, D. 1992. Detection and identification of Multiplex Mycobacterial Pathogen by DNA Amplification in a Single tube. *Research PCR methods and applications*. 1. 269-273
- 62.- Del Portillo, P., Murillo, L.A., Patarollo, M.E. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 29. 2163-2168.
- 63.- Manual de inspección post-mortem de bovinos para la detección de tuberculosis. Toma y envío de muestras a laboratorio. CONETB.

- 64.- Jiménez, M. M., Báez, S.R., Linares, C.M., Chávez, S.R., Lascurain, L.R., Zenteno, G.E. 2001. Avances en el estudio de los mecanismos celulares de supresión de la respuesta inmunitaria en la tuberculosis. Rev. Int. Nal. Enf. Resp. Mex. Pag. 39-48
- 65.- Chávez, R., Reyes, J., Maldonado, G., et al. 1994. Moléculas de cooperación y regulación durante la migración celular de la respuesta inflamatoria. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 7:67-75
- 66.- Roman, J., Jeon, YJ., Pérez, RL. 1995. Distribution of extracellular matrices, matrix receptors, and transforming growth factor-beta 1 in human and experimental lung granuloma inflammation. Am. J. Med. Sci. .124-133
- 67.- Romero, T, A. 2003. Asociación de la excreción de *Mycobacterium bovis* con la respuesta inmune específica en una hato de alta prevalencia. Tesis de Maestría. F.E.S.C. UNAM
- 68.- Wards, B. J., Collins, D. M., 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology. Volume 43, Issues 2-3.
- 69.- Zanini, M.S., Moreira, E.C., Oliveira, R.S., 2001. *Mycobacterium bovis*: polymerase chain reaction identification in bovin lymphnode biopsies and genotyping in isolates from Southeast Brazil by polygotyping and restriction fragment length polymorphism. Vet. J. 163(2) 109-118