



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

Detección de *Mycobacterium bovis* por medio de PCR-  
MULTIPEX a partir de muestras de suero de leche

T E S I S

Que para obtener el título de  
Médica Veterinaria Zootecnista

P R E S E N T A:

Elaenia Minerva Gurrola Mejía

ASESOR:

M. en C. Marco Antonio Santillán Flores.

CO-ASESORA:

Dra. Marisela Leal Hernández.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Detección de Mycobacterium bovis por medio de PCR-MULTIPLEX a partir de muestras de suero de leche**

Que presenta la pasante: ELAENIA MINERVA GURROLA MEJÍA  
Con número de cuenta: 30306822-2 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de julio de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	
<b>PRESIDENTE</b>	M.V.Z. Rafael Pérez González	
<b>VOCAL</b>	Dra. Cynthia González Ruiz	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Marisela Leal Hernández	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M.V.Z. Javier Donnadieu Zavala	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/ntm\*

## **DEDICATORIAS**

A mi madre, quien me dio la vida y me ha apoyado en todas etapas de mi vida; me enseñó a superarme y hacer las cosas para ser un adulto responsable. Te doy las gracias mamá por estar ahí y ser uno de mis pilares. Te amo.

A mi abuelo, Nicolás que, aunque ya no está aquí conmigo, siempre creyó en mí, siempre me apoyo y me enseñó a no llorar y a echarle ganas en todo lo que se me pusiera en frente y siempre me digo que podía terminar la carrera. A ti abuelo, por enseñarme muchas cosas en esta vida y ser mi mayor pilar. Te extraño y quiero.

A la Dra. Marisela Leal Hernández, que siempre estuvo conmigo apoyándome, brindándome sus conocimientos y resolviendo mis dudas, quien me apoyo en mis momentos malos y siempre me escucho. Por ella, por ser mi tutor y mi amiga. Gracias.

Al M. en C. Marco Antonio Flores Santillán, por sugerirme el tema de la tesis, por brindarme sus conocimientos en el laboratorio, enseñarme y resolver todas mis dudas.

A Alma, Sonia, Gabriela, la Dra, Guadalupe Socci, Olga y la M. en C. Lilia Soto, al M. en C Víctor Banda, y Aritzel por siempre creer en mí y darme ese apoyo, por los buenos momentos en el instituto, por brindarme su amistad.

A la M en C. Laura Hernández, por proporcionarme las muestras de leche para poder realizar mi trabajo.

A la UNAM, por ser mi casa de estudios, preparatoria y universidad. Estoy orgullosa de ser parte de esta gran institución.

Al INIFAP por abrirme las puertas para realizar mi Servicio Social y Tesis.

Gracias a todos.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	5
<b>1. Introducción</b> .....	6
1.1 Situación actual de la Ganadería Lechera en México.....	7
1.2 Historia de la Tuberculosis Bovina (TBb).....	8
1.3 Salud pública .....	10
1.4 Clasificación de las <i>Micobacterias</i> .....	10
1.4.1 <i>Mycobacterium bovis</i> .....	10
1.4.2 Resistencia ambiental.....	11
1.4.3 Hospedadores .....	11
1.4.4 Transmisión.....	12
1.4.5 Pared celular.....	12
1.5 Estructura genómica .....	14
1.6 Regiones de diferencia del genoma .....	15
1.7 Epidemiología.....	16
1.7.1 Factores de riesgo.....	16
1.8 Signología.....	17
1.9 Patogenia .....	18
1.10 Inmunidad.....	20
1.11 Métodos de diagnóstico.....	22
<b>2. Justificación</b> .....	25
<b>3. Hipótesis</b> .....	26
<b>4. Objetivo</b> .....	26
<b>5. Metodología</b> .....	27
<b>6. Resultados</b> .....	30
<b>7. Conclusiones</b> .....	41
<b>8. Referencias</b> .....	42

## Resumen

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa de origen bacteriano y de curso crónico, además de ser una de las zoonosis más importantes a nivel mundial. El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de *Mycobacterium bovis* en muestras de suero de leche, empleando una PCR múltiplex, se obtuvieron un total de 233 muestras de leche de vacas y 26 muestras de tanques de acopio; procedentes de hatos lecheros de diferentes estados de la República Mexicana (Querétaro, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Coahuila). Para realizar la PCR-M, se emplearon los iniciadores que identifican los genes RD1 y RD9 para el género tuberculosis y la especie *M. bovis* respectivamente, este se realizó con el ADN obtenido a partir de las muestras de suero de leche. Se realizó el aislamiento bacteriológico a partir de las muestras de suero de leche, mediante técnicas convencionales para identificar a las micobacterias. En los resultados de la PCR se logró amplificar un producto de 150 pb que corresponde a la región RD1 del complejo tuberculosis en el 14.59% (34/233) de las muestras de leche y en 15.38% (4/26) de las muestras de tanque. Se logró la identificación de *M. bovis* con la PCR para el gen RD9 de 34 muestras individuales y 4 de tanque observándose el producto de amplificación de 206 pb. Se obtuvieron seis aislamientos; cuatro en muestras de suero leche individuales y dos de las muestras de tanque, identificando a *M. bovis* por métodos bioquímicos. Los resultados obtenidos demuestran el potencial que tiene el empleo de la PCR-M, como método diagnóstico diferencial, así como la ventaja de detectar micobacterias en muestras provenientes de leche.

## 1. Introducción

La Tuberculosis bovina (TBb), es una enfermedad infecto-contagiosa, crónica y progresiva, que se caracteriza por la formación de granulomas básicamente en linfonódulos y pulmón, puede llegar a afectar órganos digestivos, genitourinarios, huesos y articulaciones, o difundirse por todo el organismo del animal. La TBb es causada por *Mycobacterium bovis*, bacteria de crecimiento lento intracelular obligado (O'Reilly y Daborn, 1995; Pérez, *et al*, 2008), de distribución mundial y capaz de infectar a diferentes especies animales y al hombre, considerándose así una zoonosis (Thoen y Barletta, 1995).

La importancia de esta enfermedad es por el riesgo que representa para la salud humana y por los efectos negativos que ocasiona en la industria pecuaria, debido a su carácter enzoótico. Las pérdidas económicas que genera en la ganadería nacional, son por concepto de eliminación de ganado infectado, decomisos de canales, desecho prematuro de animales y rompimiento de líneas genéticas, retrasos y disminución de las lactancias (Mendoza y Morilla, 2008; Pérez, *et al*, 2008).

El contagio natural en los bovinos se realiza de forma directa e indirecta, siendo las principales vías de infección la respiratoria y la alimentaria. *M. bovis* es eliminado con mayor frecuencia a través de las expectoraciones y se considera que la eliminación por leche es menor al 2%, pero esto dependerá del grado de infección que tenga la vaca y de que los linfonodos mamarios y la ubre desarrollen lesiones granulomatosas. La leche infectada con *M. bovis*, puede contaminar los equipos de ordeño, suelo, camas, recipientes de contención y almacenamiento de la leche, así como el insuficiente procesamiento de la leche puede propagar la enfermedad a otros hatos donde los terneros sean alimentados con leche contaminada con *M. bovis* (Rodgers, *et al*, 2007).

El diagnóstico confirmatorio de TB, se realiza por medio del cultivo bacteriológico a partir de tejidos que presenten lesiones granulomatosas, hisopados nasales y leche, teniendo el inconveniente de que es un método que puede tardar hasta cuatro semanas para observar crecimiento bacteriano y tres semanas más para llevar a cabo la tipificación por métodos bioquímicos (González, *et al*, 1999). Las técnicas de diagnóstico basadas en la amplificación de ADN de *M. bovis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido ampliamente descritas (Rodríguez, *et al*, 2014).

La tuberculosis bovina es una enfermedad de difícil control y el contar con métodos de diagnóstico alternos, que permitan establecer un diagnóstico más sensible, específico y rápido en comparación con el cultivo bacteriológico y que se puedan emplear diferentes tipos de muestras como leche de bovino ayudaría a establecer programas de control oportunos (Thoen y Barletta, 1995; Mendoza y Morilla, 2008; Pérez, *et al*, 2008; Rodríguez, *et al*, 2014).

## 1.1 Situación actual de la Ganadería Lechera en México

La actividad ganadera está enfocada en la generación de alimentos para consumo humano. Los diferentes alimentos de origen ganadero proveen nutrientes esenciales, contribuyendo con el 15% del total de la energía alimentaria y el 25% de las proteínas de la dieta humana. La producción ganadera eficiente requiere de buenas prácticas de gestión que incluyen la alimentación adecuada y cuidado de la salud, selección y desarrollo de razas adaptadas a los entornos específicos de producción. (FAO, 2016).

La población de bovinos productores de leche en México es de 2,457,683 millones de cabezas en el año 2015. Durante el 2016 (Cuadro 1 y Figura 1) la producción de leche de bovino alcanzó 192,052 litros a nivel nacional y para el 2017 se estima un incremento de 1.7% respecto del año anterior (SIAP, 2015).

Según datos del censo agrícola y forestal 2015, el país cuenta con alrededor de 1.13 millones de unidades de producción de ganado bovino y cerca del 60% de estas unidades tienen como actividad principal el desarrollo o engorda de bovinos (SIAP, 2015).

**Cuadro 1.** Principales estados productores de leche de bovino 2015 – 2016 (Millones de litros)  
(Panorama de la Leche en México, 2015).

Estado	Diciembre		Variación	
	2015	2016	Absoluta	Relativa
<b>Nacional</b>	<b>11,394,663</b>	<b>11,607,493</b>	<b>212,829</b>	<b>2</b>
Jalisco	2,157,002	2,228,482	71,480	3
Coahuila	1,380,539	1,411,959	31,420	2
Durango	1,142,047	1,133,982	-8,065	-1
Chihuahua	1,034,227	1,051,731	17,504	2
Guanajuato	796,786	823,444	26,658	3
Veracruz	695,762	703,003	7,241	1
México	455,283	448,833	-6,450	-1
Puebla	449,000	448,782	-218	0
Hidalgo	423,627	423,965	338	0
Chiapas	417,750	419,965	2,152	1
<b>Resto</b>	<b>2,442,640</b>	<b>2,513,409</b>	<b>70,769</b>	<b>3</b>





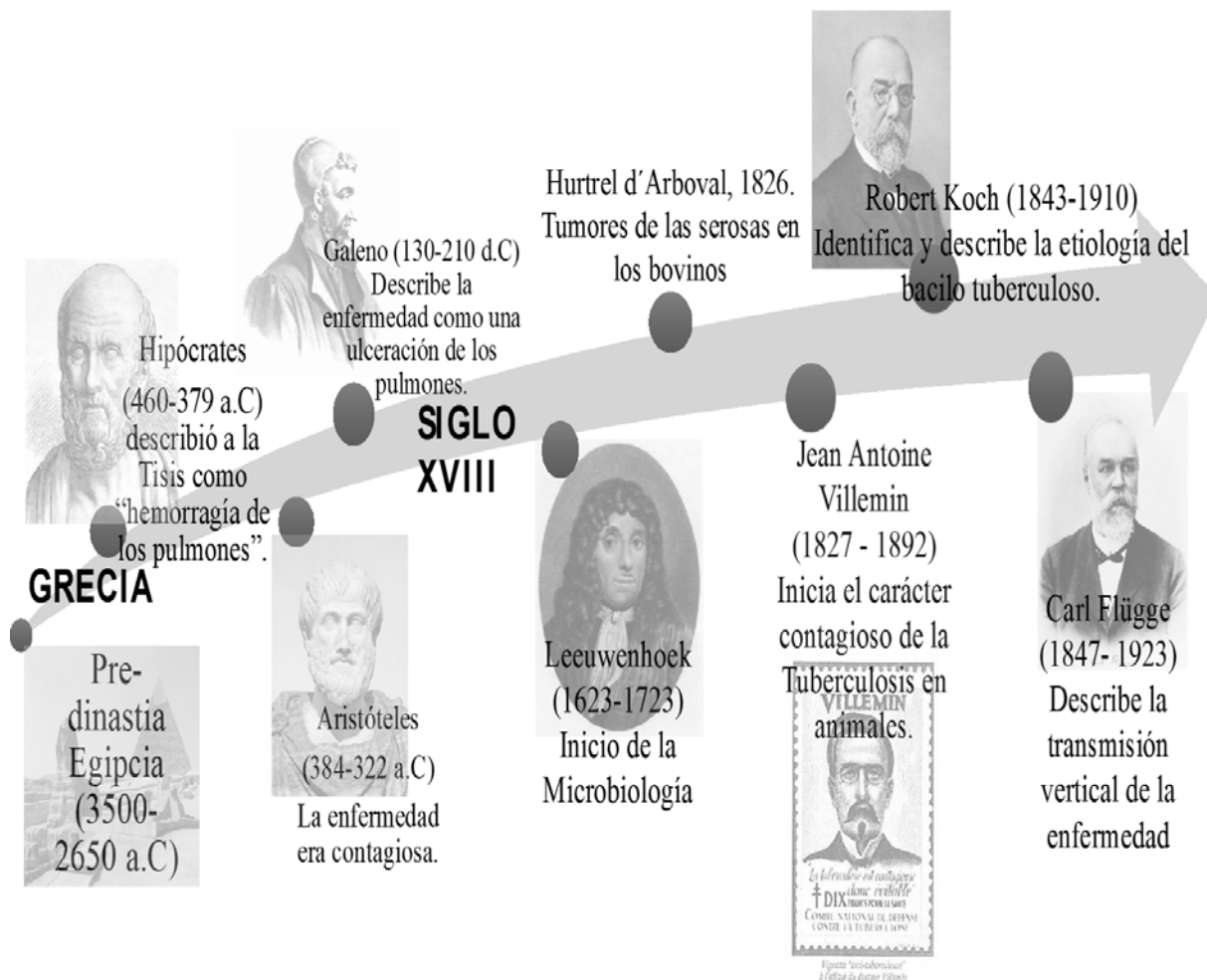
**Figura 1.** Producción Nacional de leche de bovino 2012 - 2016 (Miles de litros).  
Tomada de: [http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure\\_leche\\_DIC2015.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure_leche_DIC2015.pdf)

En la actualidad, la ganadería contribuye con aproximadamente el 40% de la producción de alimentos y las actividades ganaderas dependen cerca de mil millones de personas en todo el mundo, o que durante los últimos 20 años la ganadería ha sido uno de los sectores más dinámicos de la agricultura (FAO, 2016). Durante los últimos 15 años, el sector ganadero en México ha crecido a un ritmo aproximado de 4% anual (SAGARPA, 2015).

## 1.2 Historia de la Tuberculosis Bovina (TBb)

La Tuberculosis producida por *M. bovis*, probablemente haya aparecido como enfermedad endémica, primero en animales, antes que en el humano. Mientras que *M. tuberculosis*, microorganismo que posee la capacidad de infectar diferentes especies de primates, se considera que apareció primero en primates no humanos y posteriormente en humanos. El complejo evolucionó como patógeno humano en el Este del continente africano y su dispersión a otras regiones pudo haber ocurrido con las primeras migraciones humanas. El desarrollo de la tuberculosis se propició a una serie de condiciones como: el aumento de la población, la domesticación de animales, la estratificación social y la ingestión de una dieta menos variada. A continuación, se muestra la línea del tiempo de la enfermedad (Figura 2) (Myers, *et al.*, 1998; Gutiérrez, *et al.*, 2005; Mostow y Behr, 2005; Hershkovitz, *et al.*, 2008; Díaz y Jaramillo, 2012; Cartes, 2013).

A la enfermedad varios nombres, tales como tísis (phtisis) por los antiguos griegos, consunción (consumption), Tuberculosis y peste blanca (white plague) (Myers, *et al.*, 1998).



**Figura 2.** Línea de tiempo del descubrimiento de la Tuberculosis bovina (TBb) (Gurrola, 2017).

En sus estudios Koch describe la tinción, aislamiento, cultivo del bacilo y reproducción de la enfermedad a través de la inoculación del bacilo en animales de experimentación en cobayos y recuperó el bacilo nuevamente en los animales infectados (Carrillo, 2007). Define a la tuberculosis como una enfermedad infecciosa que cumple con los postulados de Koch-Henle:

1. La bacteria patógena debe aislarse siempre de animales enfermos y nunca de animales sanos.
2. Cuando un animal está enfermo la bacteria debe aislarse en cultivo puro.
3. Si la bacteria se inocula a otro individuo debe reproducirse la enfermedad.
4. La bacteria debe aislarse nuevamente en un cultivo puro (Koch, 1882; Monaghan, *et al.*, 1994).

A partir de los hallazgos de Koch y al desarrollo alcanzado por la bacteriología, se descubrieron nuevas especies de Micobacterias; *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. kansasii* y *M. bovis* (Thoen, *et al.*, 2006).

### 1.3 Salud pública

La Tuberculosis (TB), es uno de los principales problemas de salud pública, que provoca anualmente dos millones de muertes a nivel mundial. En México la participación de *M. bovis* en humanos ha sido estimada en un 7 %, mientras que en sur de los Estados Unidos de Norteamérica (EUA) llega al 40 % (Ortíz, 2015; SENASICA, 2016).

La tuberculosis en humanos también puede ser causada por *M. bovis*, pero esta es menos frecuente en países donde se produce leche pasteurizada y se implementan programas de control y erradicación de tuberculosis bovina, la alta prevalencia en el ganado favorece la exposición aerógena o digestiva al bacilo por el consumo de leche cruda y así como de quesos frescos, lo que incrementa el riesgo de salud pública (Milián, *et al.*, 2012; OMS, 1992); se ha descartado que el consumo de carne de animales tuberculosos pueda transmitir el agente, ya que, cuando se presentan lesiones en la carne en canal esta se decomisa y no llega a consumo (OMS, 1992).

La incidencia es mayor entre los ganaderos, los empleados de rastros y personas que trabajan con el ganado bovino. Además, los humanos pueden contagiarse por la exposición a otras especies; se han producido infecciones documentadas en cabras y animales silvestres y ciervos de granja (Milián, *et al.*, 2012; OMS, 1992).

### 1.4 Clasificación de las *Micobacterias*

Las micobacterias se engloban dentro del género *Mycobacterium*, único dentro de la familia *Mycobacteriaceae* y pertenecen al orden *Actinomycetales*. Se encuentran relacionadas con el género *Corynebacterium* y *Nocardia* (Granados y Villaverde, 2011).

Se conocen 54 especies de micobacterias dentro del género, de acuerdo al Manual de Bergey; algunas de las especies tienen entre sí un grado de homología muy elevada, tanto estructural como fisiológica. En este sentido se destaca el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*) y el Complejo *Mycobacterium avium* (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*), donde se encuadran los agentes etiológicos de la tuberculosis, por ello denominados también: bacilo de la tuberculosis humana (*M. tuberculosis*), bovina (*M. bovis*) y aviar (*M. avium*) (Thoen y Barletta, 1995; Díaz y Ferran, 2001; Appleyard y Clark, 2002).

#### 1.4.1 *Mycobacterium bovis*

*M. bovis* es una bacteria en forma de bacilo Gram positivo, aerobio obligado (microaerófilo), con tamaño entre 0,2-0,7 x 1-10 micras ligeramente curvados, sin movilidad, de crecimiento muy lento (16 a 20 horas tiempo de replicación) (Haagsma, 1993).

Sus características esenciales son: a) presentan ácido alcohol resistencia, es decir que no se decoloran con soluciones al 3% de ácido y 95% de etanol una vez teñidos con colorantes básicos, es positiva a la tinción de Gram; b) no forman esporas, conidios o cápsula (no presenta

polisacáridos); c) es inmóvil; d) es anaerobia y e) morfológicamente son bacilos rectos o curvados, aunque a veces presentan forma cocobacilar, filamentosos o ramificados (Butler, *et al.*, 1986; Appleyard y Clark, 2002).

#### 1.4.2 Resistencia ambiental

Es sensible al calor, a los rayos ultravioleta y al sol directo, presenta resistencia a ácidos, alcoholes, álcalis, desinfectantes y a la desecación; además es naturalmente resistente a muchos antibióticos debido principalmente a la envoltura celular altamente hidrofóbica que actúa como una barrera permeable lo que hace difícil su tratamiento (OMS, 1992; Marchal, 1993; O'Reilly y Daborn, 1995; Milián, *et al.*, 2000).

A continuación, se presenta el Cuadro 2 en el que se resumen los tiempos de sobrevivencia del *M. bovis* en diversos sustratos y bajo diferentes condiciones ambientales.

**Cuadro 2.** Sobrevivencia de *M. bovis* en el medio ambiente.

Sustrato	Tiempo	Referencia
Agua estancada (pH 4-5)	203-260 días	(Yssel, <i>et al.</i> , 1992)
Rayos solares	16-23 días	(Dannenberg, 1991)
Heces con exposición al sol	37 días a 6 meses dependiendo de la época del año	(Yssel, <i>et al.</i> , 1992; Milián, <i>et al.</i> , 2000; Francis, <i>et al.</i> , 1978)
Materia orgánica en las instalaciones a temperatura de 28 °C.	31-37 días	(Pérez, <i>et al.</i> , 2008)
Instalaciones	71-84 días	(Pérez, <i>et al.</i> , 2008)
Animales enterrados a la sombra	2 años	(Aranaz, <i>et al.</i> , 1996; Rivas-Santiago, <i>et al.</i> , 2005; Rodgers, <i>et al.</i> , 2008;)
Suelo húmedo	4 a 8 meses	(Ramakrishnan, 2012)
Agua	400 días	(Johnson, <i>et al.</i> , 1998)
Solución Salina Fisiológica	300-400 días	(Waters, <i>et al.</i> , 2011)

#### 1.4.3 Hospedadores

*M. bovis* tiene uno de los más amplios rangos de hospedadores de todos los patógenos conocidos, se ha demostrado la infección en bovinos, borregos, perros, gatos, monos, simios, primates, hombre, cerdos, elefantes, rinocerontes, pericos, venados, zorros, tapires, camellos, bisontes, llamas, elefantes marinos, zarigüeyas y jirafas. (Francis, 1991; O'Reilly y Daborn, 1995; Díaz, *et al.*, 2006).

#### 1.4.4 Transmisión

La principal vía de transmisión de la Tuberculosis es la aerógena, del 80 al 90% por inhalación de aerosoles, tos o exhalación de un animal infectado que elimina dosis elevadas del microorganismo. Por medio de descargas nasales los animales clínicamente enfermos, eliminan una gran cantidad de gotas de diversos tamaños las cuales provienen principalmente de bronquios, que contienen moco, leucocitos y los bacilos (Francis, 1991; Ozyigit, *et al.*, 2007).

Otra vía de ingreso es la digestiva, por el consumo de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, materia fecal, semen, orina, descargas vaginales, uterinas y linfonodos supurantes, que contengan la bacteria (OMS, 1992; Hermoso de Mendoza, 1992; Palmer, *et al.*, 2003; Ozyigit, *et al.*, 2007).

La transmisión vertical de *M. bovis*, ocurre congénitamente en el útero a través del cordón umbilical, siendo esta vía poco común (O'Reilly y Daborn, 1995; Palmer, *et al.*, 2003; Ozyigit, *et al.*, 2007). La transmisión horizontal durante la monta, puede ocurrir si los órganos reproductivos están infectados, no obstante, esta vía es extremadamente rara (Williams y Hoy, 2000).

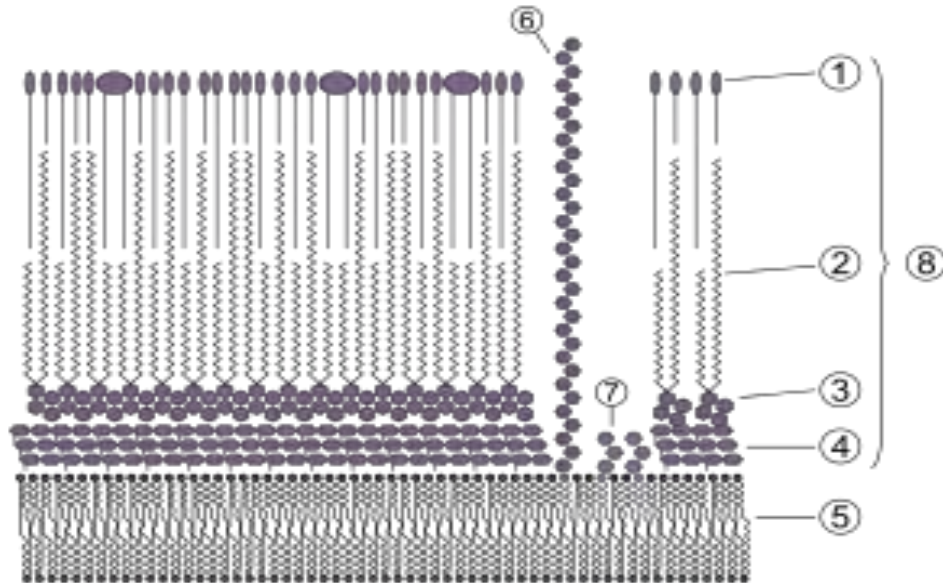
La ingestión de leche contaminada con bacilos constituye una fuente de infección para los animales lactantes y para el hombre. El insuficiente procesamiento de la leche de rebaños afectados puede propagar la enfermedad a otros rebaños, debido a que de 1% a 2% de las vacas infectadas eliminan el microorganismo en la leche (Ozyigit, *et al.*, 2007).

Estudios experimentales han demostrado la exposición de *M. bovis* por diferentes vías (intratraqueal, oral, intravenosa e intraperitoneal) demuestran que las lesiones tuberculosas se diseminan y son fuente de infección (Milián, *et al.*, 2000). Los abscesos cutáneos pueden ser fuente de infección en una gran variedad de animales domésticos y de vida silvestre (Palmer, *et al.*, 2003).

#### 1.4.5 Pared celular

Presenta una membrana citoplásmica (Figura 3) cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos (60% del peso de la pared celular), formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglicolípidos; tal estructura, que le brinda una apariencia cerosa, le confiere una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes, a un buen número de antibióticos, a las tinciones habituales y tiene afinidad por la tinción ácido alcohol resistente de Ziehl Neelsen (Hermoso de Mendoza, 1992; Milián, *et al.*, 2000; Pérez, *et al.*, 2008).

La propiedad de resistencia es debido al alto contenido en sulfolípidos de la pared celular micobacteriana, que funcionan como evasinas; es decir, moléculas que facilitan que la bacteria escape de la acción de los macrófagos inhibiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo cual puede explicar su éxito como parásitos intracelulares (Lanelle y Daffe, 1991; Nigou, *et al.*, 1999; Zahrt y Thomas, 2003; Díaz y Jaramillo, 2012).



**Figura 3.** Estructura y componentes que conforman de la pared celular de las micobacterias:  
 1) Lípidos externos; 2) Ácido micólico; 3) Polisacáridos (Arabinogalactado); 4) Peptidoglicano (PGL); 5) Membrana plasmática; 6) Lipoarabinomano (LAM) y 7) Fosfatidilinositol manosido.  
 Tomada de: <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/teo6.pdf>

El peptidoglicano protege a la micobacteria, ocasiona lisis por cambios osmóticos y por lisozimas. El ácido micólico forma una barrera impermeable que impide el acceso de sustancias hidrofílicas y fármacos, induce la producción de TNF en los macrófagos y formación del granuloma, bloquea el efecto de IFN- $\gamma$ , IL-1 y TNF, inhibe la unión del fagosoma con el lisosoma en macrófagos. Y LAM activa células T vía TLR y CD1 (Díaz y Jaramillo, 2012).

Sus principales antígenos proteicos son: CFP-10 y MPT-64, las cuales disminuyen la expresión de cofactores en CPA, aumentan la secreción de TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10; e inhibe la producción de óxido nítrico, esto evade los mecanismos inmunes que se desarrollan durante la infección (Rodgers, *et al.*, 2007).

De acuerdo a la clasificación de Runyon *et al.*, (1959) agrupó a las micobacterias atípicas en base a su pigmentación, la morfología de las colonias y velocidad de crecimiento. En todos los casos el rango de temperatura óptimo de crecimiento para las micobacterias se establece entre los 28 °C y 45 °C (Barcenás, *et al.*, 2008).

*M. bovis* se encuentra dentro del grupo III que corresponden a las micobacterias no cromógenas y de crecimiento lento; necesita una incubación de 80 a 90 días para producir colonias visibles (O'Reilly y Daborn, 1995; Díaz, *et al.*, 2006).

## 1.5 Estructura genómica

Los primeros datos del genoma micobacteriano identificado, indicaron que el contenido en G+C (polymorphic G+C Rich secuencias, PGRSs) era del 65.6% de *M. bovis* (4, 345,492 pb del aislado virulento bovino AF2122/97) y 99.95% identificado de *M. tuberculosis* (4.411.532 pb del aislado humano H37Rv) (Thoen, *et al.*, 2006).

La primera descripción de un plásmido micobacteriano se debió a Crawford y Bates, 1979, a partir de *M. avium*; consiste en un único cromosoma en forma de lazo. Se ha descubierto la existencia de plásmidos micobacterianos, pequeños fragmentos de ADN con unos pocos genes, frecuentemente implicados en la resistencia a antibióticos o a otros agentes antimicrobianos (Dean, *et al.*, 2005; Appleyard y Clark, 2011).

El estudio del genoma micobacteriano comenzó más tarde que la mayoría de las bacterias, debido en primer lugar a que la lentitud de su crecimiento las hacía poco deseables para la realización de estudios generales del genoma bacteriano y en segundo lugar, a que los elementos de intercambio de material genético entre micobacterias, como por ejemplo los plásmidos, eran desconocidos (Grange, 1995).

De las especies del Complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. avium*, *M. caprae* y *M. africanum*) comparten una homología del 85 al 100% DNA-DNA (Thoen, *et al.*, 2006).

Una aproximación indirecta al estudio del genoma micobacteriano, se logró gracias al uso de hibridaciones ADN-ADN entre los genomas de diferentes especies para conocer el grado de homología del ADN y con ello, el grado de parentesco evolutivo de las micobacterias (Humblet, *et al.*, 2009). El fundamento del proceso consiste en someter el genoma de dos especies micobacterianas a desnaturalización y mezcla, comprobando después los tramos de hebras de diferentes especies acopladas entre sí. De este modo se conoce que el porcentaje de homología de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG es del 97% (Thoen, *et al.*, 2006). Además, *M. bovis* no tiene nuevo material genético para compararlo con *M. tuberculosis*. Así, estas mutaciones en el DNA de *M. bovis* es la mayor contribución para estas diferencias, aunque más de 2000 nucleótidos polimorfos simples han sido encontrados (Brosch, *et al.*, 2002; Whelan, *et al.*, 2010).

Por ejemplo, *M. bovis* tiene un punto de mutación que lo hace resistente a la pirazinimidasa. Se ha encontrado el gen que codifica para la secreción de proteínas involucradas a la adhesión de la pared celular. También el locus TbD1 (presente en *M. bovis*, pero ausente en *M. tuberculosis*), codifica para la transportación de proteínas y sintetizas involucradas en el tráfico de lípidos y la biosíntesis de glucolípidos (Waters, *et al.*, 2011).

El análisis del genoma de *M. bovis* desafía la hipótesis epidemiológica natural como *M. tuberculosis* es una adaptación humana de *M. bovis* es adquirida del ganado lechero. Se hizo un análisis indicando que *M. canettii* es el ancestro de las especies del Complejo *M. tuberculosis*. La eliminación de DNA, empezó con la pérdida de la región RD9 (Posición RD de las regiones de diferencia), originaron *M. africanum* (grupo heterogéneo de cepas aisladas principalmente en África), con propiedades

intermedias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*; *M. microti* (causante de la tuberculosis en roedores y pequeños mamíferos) y *M. avium* (Díaz, 2013; Waters, *et al.*, 2011).

Además, *M. bovis* BCG o Bacilo Calmette-Guérin, fue una adaptación in vivo derivada de una cepa patógena de *M. bovis*, durante la experimentación. Esta cepa es claramente aerobia y crece bien en medios de glicerol a diferencia de las cepas convencionales de *M. bovis*. Su origen se remonta a 1908 cuando Albert Calmette, médico y Camille Guérin, veterinario, iniciaron la tarea de atenuar una cepa aislada de una vaca con tuberculosis. Para lograrlo, realizaron 230 pases seriados de dicha cepa en un medio de cultivo a base de papa con adición de bilis, considerando finalizado el proceso en 1919 al asegurarse que la cepa era avirulenta para cobayos, conejos, vacas y caballos. Aunque tradicionalmente se considera que la cepa madre pertenece a la especie *M. bovis*, se ha cuestionado que la concentración de varios antígenos de *M. bovis*, como MPB64 y MPB70, varía de sobremanera en los filtrados dentro de las cepas hijas BCG (Brosch, *et al.*, 2002; Waters, *et al.*, 2011).

## 1.6 Regiones de diferencia del genoma

El análisis comparativo entre genomas permite estudiar la evolución de una cepa virulenta a variante atenuada. Si bien *M. tuberculosis*, así como *M. bovis* y *M. bovis* BCG presentan un alto grado de conservación a nivel de su genoma, se ha detectado la presencia de regiones de polimorfismo (Brosch, *et al.*, 2002).

Los aislados del complejo de *M. tuberculosis* pueden ser diferenciados por el polimorfismo de secuencias largas o regiones de diferencia (RD, por sus siglas en inglés) y de acuerdo con su distribución en el genoma; la presencia o ausencia de deleciones particulares ha sido propuesto como un punto discriminativo, como lo es la falta de la región RD12 para *M. bovis* (Díaz, 2013).

Estas corresponden a 16 regiones ausentes en *M. bovis* BCG, que representan un total de 61 ORF's. Nueve de estas regiones están ausentes también en cepas virulentas de *M. bovis*. Las deleciones, por sí solas no explican el fenotipo atenuado de BCG, ya que en cepas complementadas no se restablece un grado de virulencia comparable a la de *M. tuberculosis* o de *M. bovis*. Sin embargo; la reintroducción de la región RD1 en BCG, resulta en la represión de al menos 10 proteínas y en la inducción de tres proteínas adicionales (Brosch, *et al.*, 1998).

Esto condujo a la generación de un patrón de expresión proteica en BCG, muy similar al exhibido por cepas virulentas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis*. Esos datos sugieren que BCG, al tener delecionada RD1, carece de un control regulatorio sobre distintos loci. La participación de los genes codificados en el segmento RD1 concuerda con un rol de regulación global asociado a virulencia (Cuadro 3) (Manharias, *et al.*, 1996; Parsons, *et al.*, 2002; Das, *et al.*, 2007).

Estas regiones de diferencia (RD) a menudo representan cambios irreversibles en la composición genética que probablemente sean resultado de los errores en la replicación del ADN o del cambio de elementos genéticos suelen ser cambios neutrales o mutaciones positivas, como la deleción de *katG* como un medio de resistencia adquirida hacia el fármaco isoniazida en algunas cepas de *M. Tuberculosis* (Díaz, 2013).



**Cuadro 3.** Regiones de Diferencia presentes y ausentes entre *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Manharias, *et al.*, 1996; Parsons, *et al.*, 2002; Das, *et al.*, 2007).

	RD1	RD2	RD3	RD4	RD5	RD6	RD7	RD8	RD9	RD10	RD11	RD12	RD13
<i>M. tuberculosis</i>	✓	✓	×	✓	×	×	✓	✓	×	✓	×	✓	✓
<i>M. bovis</i>	✓	✓	✓	×	✓	✓	✓	✓	✓	✓	×	×	×
<i>M. bovis</i> BCG	×	✓	✓	×	×	×	×	×	✓	×	✓	×	×

Una comparación entre los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* revela que las secuencias RD1, RD2 y RD3 están presentes en *M. bovis* y que el antígeno de secreción ESAT6 (*Rv3875*) y la proteína de filtrado de cultivo CFP10 (*Rv3874*) han sido identificadas como antígenos inmunodominantes encontrados en RD1, la proteína 21 (CFP21) y la proteína MPT64 de *M. tuberculosis* en RD2, antígenos que han mostrado ser blancos importantes para estudios de reactividad inmune en varios modelos de investigación (Brosch, *et al.*, 1998; Ganguly, 2008; Jonge, 2007).

Existen loci's independientes que ayudan a una identificación rápida de micobacterias patógenas incluyendo a *M. tuberculosis* de aislados de cultivo o bien directamente de muestras clínicas (Díaz, 2013). La pérdida de la región RD1 en la cepa BCG ha sido implicada en la atenuación de los mecanismos de mutación (Thoen y Barletta, 2006).

## 1.7 Epidemiología

Es el estudio de los patrones de la enfermedad de la tuberculosis que existen en condiciones de campo, así como la evaluación de la frecuencia, distribución y de los determinantes de salud - enfermedad en las diferentes poblaciones. Entendiéndose por determinante a las causas de la enfermedad que puede ser cualquier factor de riesgo que al ser alterado origina cambios en la frecuencia o en las características de la enfermedad (SENASICA, 2015).

### 1.7.1 Factores de riesgo

Existen una gran cantidad de factores de riesgo y que pueden ser determinantes para la presentación y diseminación de la enfermedad como el estado de salud del animal, función zootécnica, la edad, el manejo, deficiente condición corporal o malnutrición; por ejemplo cuando los terneros se alimentan con leche cruda proveniente de vacas enfermas ya que entre el 1% a 2% pueden eliminar la bacteria en la leche, también puede influenciar la susceptibilidad del animal a la TBb (Neill, *et al.*, 1994; Ozyigit, *et al.*, 2007; Millian, *et al.*, 2011).

La mala condición corporal puede ser una consecuencia del estado clínico avanzado de la enfermedad, más que un factor de riesgo como tal (Cook, *et al.*, 1996; Costello, *et al.*, 1998). En animales malnutridos, se han demostrado niveles significativamente bajos de linfocitos (Monaghan,

*et al.*, 1994), haciéndolos más susceptibles a la infección por *M. bovis*. Esto también ocurriría en animales pre-infectados con virus inmunosupresores como el de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y la Inmunodeficiencia Bovina (Griffin, *et al.*, 1993).

En relación al sexo como factor de riesgo, las hembras productoras de leche normalmente permanecen más tiempo en las unidades de producción permitiendo con esto que se establezca y se desarrolle la enfermedad (Costello, *et al.*, 1998). En países en vías de desarrollo que mantienen machos como animales de trabajo por periodos largos de tiempo y por lo tanto, se incrementa el riesgo de exposición (Cook, *et al.*, 1996).

Lo mismo sucede con las diferencias en la susceptibilidad entre razas, las cuales es probable que estén más relacionadas a la intensidad de la producción a las que son sometidas (Menzies y Neill, 2000). No obstante, se ha demostrado que en razas como la Holstein-Friesan, la prevalencia y severidad de la enfermedad es mayor en comparación a la raza cebú o sus cruces, aún mantenidos bajo las mismas condiciones de manejo (Kazwala, *et al.*, 2001).

Los animales mantenidos en confinamiento y en alta densidad, tienen mayor riesgo que los animales que están a pastoreo, considerando que la principal vía de transmisión es la respiratoria (Kazwala, *et al.*, 2001). La alta densidad animal junto con una alta humedad ambiental, proveen las condiciones ideales para la diseminación del organismo (Ameni, *et al.*, 2007). Es posible que las instalaciones que favorezcan el contacto entre los animales, como el alojamiento en cubículos o la ocupación de un patio de alimentación, pudiera ser un factor que aumente el riesgo de transmisión (Espejo, 2004).

Con respecto al tipo de producción, se ha descrito que el ganado lechero, tiene mayor riesgo de infectarse que el ganado de carne (Espejo, 2004), lo cual, puede ser explicado en primer lugar por las condiciones de manejo al que están sometidos los animales, ya que en el ganado lechero tiene mayor estrés por las grandes producciones y mayor tiempo de vida productiva dentro del establo, además de que las posibilidades de contacto son mayores, por ejemplo durante la ordeña, pudiendo aumentar la susceptibilidad de estos animales y la compra de animales es una práctica común en este tipo de hatos, lo que aumenta el riesgo (Costello, *et al.*, 1998; Ameni, *et al.*, 2007; Humblet, *et al.*, 2009).

## 1.8 Signología

La tuberculosis bovina es una enfermedad de curso crónico inaparente y lenta, ya que la signología puede tardar meses o años en aparecer; un solo ejemplar puede transmitir la enfermedad a muchos otros animales del rebaño antes de manifestar los primeros signos clínicos los cuales son inespecíficos (disminución de la producción lechera y deterioro del estado general de salud). Sin embargo; en ocasiones la bacteria permanece en estado latente en el organismo hospedador sin desencadenar la enfermedad (Menzies, *et al.*, 1993; Neill, *et al.*, 1994; Díaz y Jaramillo, 2012). Las terneras pueden contagiarse al ingerir leche cruda procedente de vacas enfermas y pueden pasar meses o incluso años hasta que el animal infectado muere (OIE, 2015).

Los signos clínicos que pueden manifestarse durante la enfermedad son muy variados, al igual que la gran variedad de lesiones, pudiendo observarse:

- debilidad progresiva,
- pérdida de apetito,
- pérdida de peso,
- fiebre fluctuante;
- aceleración de la respiración (taquipneas), dificultad de respirar (disnea),
- sonidos anormales en la auscultación y percusión,
- diarrea,
- ganglios linfáticos grandes y prominentes
- muerte.

## 1.9 Patogenia

Cuando las micobacterias ingresan al huésped pueden acontecer varios sucesos: resistencia, infección o enfermedad. La infección ocurre por la ingestión o inoculación directa a través de la inhalación de pequeñas gotas de 1-2  $\mu\text{m}$  que llegan a la parte final de los bronquiolos (20  $\mu\text{m}$ ) y a los alveolos, en cantidades comprendidas entre  $10^3$  a  $10^4$  UFC, se considera que son capaces de iniciar la respuesta inmune celular, como respuesta primaria, así como una posterior hipersensibilidad tardía (DTH). De tal manera que, la primera defensa que tiene que ser abatida es la de los Neumocitos tipo III, siendo esto un punto crucial para el desarrollo de los subsecuentes eventos. La respuesta inmune inicia con la llegada de las células citotóxicas y macrófagos que también pueden ser activados de manera inespecífica (Lanelle y Daffe, 1994).

Las micobacterias evitan los mecanismos microbicidas de los macrófagos por medio de: a) inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, b) destrucción de la membrana del fagosoma; *M. bovis* tiene la capacidad de formar el factor cordón: iniciando con la intervención de los sulfolípidos 6-6'trehalosa dimicolato, reduciendo la actividad respiratoria fosforilativa de las mitocondrias, así como, la separación de los ribosomas del retículo endoplasmático y c) producción y liberación de la enzima Superóxido Dismutasa (SOD); protege a la micobacteria de los efectos de los radicales de oxígeno generados durante el estallido oxidativo por los macrófagos (McNeill y Brennan, 1991; Lanelle y Daffe, 1994; Thoen y Barletta, 1995).

Desde el punto de vista patológico la hipersensibilidad retardada (Tipo IV), la tuberculosis puede ser definida como el proceso que se destruyen a los macrófagos inactivados que contienen y donde se multiplican los bacilos tuberculosos. Simultáneamente la respuesta celular puede definirse como el proceso donde las células mononucleares (macrófagos y neutrófilos) pueden ingerir y destruir al bacilo para destruirlo. Ambas respuestas pueden detener la multiplicación del bacilo; cuando el crecimiento bacilar ocurre en los macrófagos no destruidos, este es el componente que predomina en la necrosis caseosa, delimitando la infección (Dannenberg, 1993).

La presentación del antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA), son muy importantes para permitir el procesamiento antigénico y facilitar su unión con la proteína del

Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y ser reconocidos por los linfocitos T subtipos CD4 y CD8, responsables de la resistencia (Ramakrishnan, 2012). La enfermedad se desarrolla en cuatro etapas.

Primera etapa: al llegar los bacilos al pulmón son fagocitados por los macrófagos alveolares y, si no son destruidos, inicia la destrucción del macrófago y proliferan los bacilos. Al iniciarse la respuesta de tipo celular, los linfocitos T sensibilizados secretan linfocinas (IFN-  $\gamma$ , TNF e IL-1) que atraen más macrófagos (Dannenberg, 1993; Trigo, *et al.*, 1998; Díaz y Jaramillo, 2012).

Segunda etapa: el granuloma se desarrolla al inicio y se forma la estructura que delimitara a la infección; al llegar los macrófagos activados secretan TNF y se transforman en células epitelioides (llamadas así por su semejanza con las células epiteliales); estas células contienen múltiples bacilos en su citoplasma. Simultáneamente se fusionan algunos macrófagos para constituir células gigantes y formar el centro del granuloma; mientras que en la periferia se organizan linfocitos y células plasmáticas. Con el tiempo se produce necrosis central del granuloma, así como necrosis periférica.

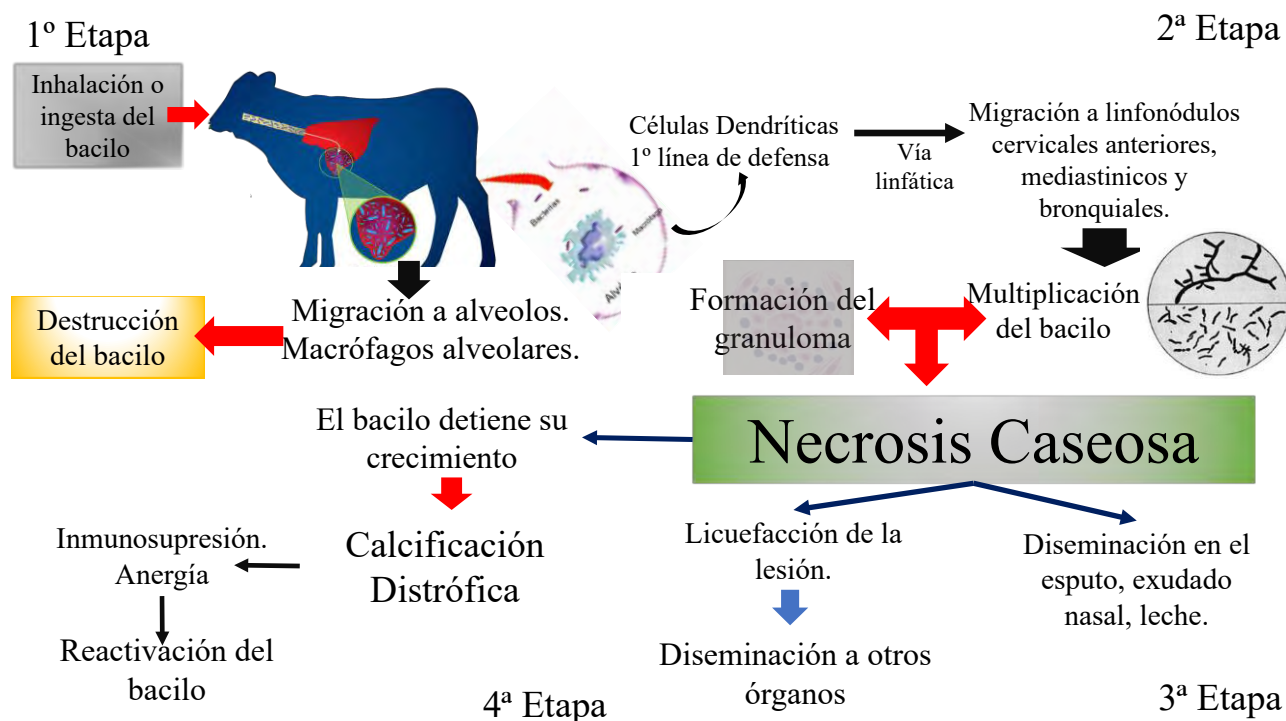
Tercera etapa: las lesiones son encapsuladas por fibrinógeno y acumulan prominentes depósitos de calcio. Las lesiones nodulares son duras de 1 – 2 cm de diámetro, de color blanco-amarrillenta, semiblanda con exudado serofibrinoso o grumoso con aspecto de queso cottage. Puede estar encapsulada o bien circunscrita formando el granuloma, puede presentar calcificación y crepitar al corte, (Neill, *et al.*, 1994; Trigo, *et al.*, 1998; Arraiz, *et al.*, 2007; Rodgers, *et al.*, 2007). La apariencia microscópica de un granuloma focal (granuloma), pierde la arquitectura del órgano y el detalle celular, se aprecia un material granular rodeado de células inflamatorias mononucleares que predominan macrófagos, células epitelioides, linfocitos y granulocitos activados. Puede presentar calcificación distrofica, local y se presenta cuando los niveles plasmáticos de calcio son normales (Aranaz, *et al.*, 1996; Trigo, *et al.*, 1998).

La hipersensibilidad celular que se desarrolla, contribuye a la destrucción del tejido. Las interacciones entre los linfocitos T y los macrófagos pueden ser potencialmente benéficos o dañinos para el huésped dependiendo de las circunstancias específicas locales. Aunque el bacilo tuberculoso sigue siendo viable por varios años en el material caseoso sólido, estos son incapaces de multiplicarse en estas condiciones. Los bacilos liberados por macrófagos inmaduros pueden ser tomados y controlados por los macrófagos activados por los linfocitos T, para que posteriormente se acumulen células epitelioides (secretoras de IL) alrededor del material caseoso y así prevenir se extensión (McNeill y Brennan, 1991).

Cuarta etapa: desafortunadamente, la hipersensibilidad retardada es asociada a la licuefacción del material caseoso, el bacilo encuentra un microambiente favorable y se multiplica exponencialmente hacia el espacio extracelular. Resultando que el tejido resulte dañado y sufra su erosión hacia los bronquios, seguido por la formación de las cavitaciones hacia otras partes del pulmón, extendiendo la infección y ocasionando bronconeumonía y la muerte del individuo (Trigo, *et al.*, 1998). Aunque los bacilos se diseminan por todo el pulmón, las consecuencias más importantes ocurren en la cavidad, donde los mecanismos de defensa no son eficaces, los macrófagos no sobreviven al material licuado o incluso caseoso, debido a la sensibilización de antígenos micobacterianos presentes en altas concentraciones y los bacilos comienzan a replicarse (Thoen y Barletta, 1995).

Las células fagocíticas son atraídas por los bacilos liberados, restos celulares y factores quimiotácticos del hospedero, como C5a (componente del complemento) y la proteína

quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Dannenber, 1991). 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, edad, entre otros y, la inmunosupresión favorece la diseminación de la enfermedad en el huésped (Díaz y Jaramillo, 2012) (Figura 4).

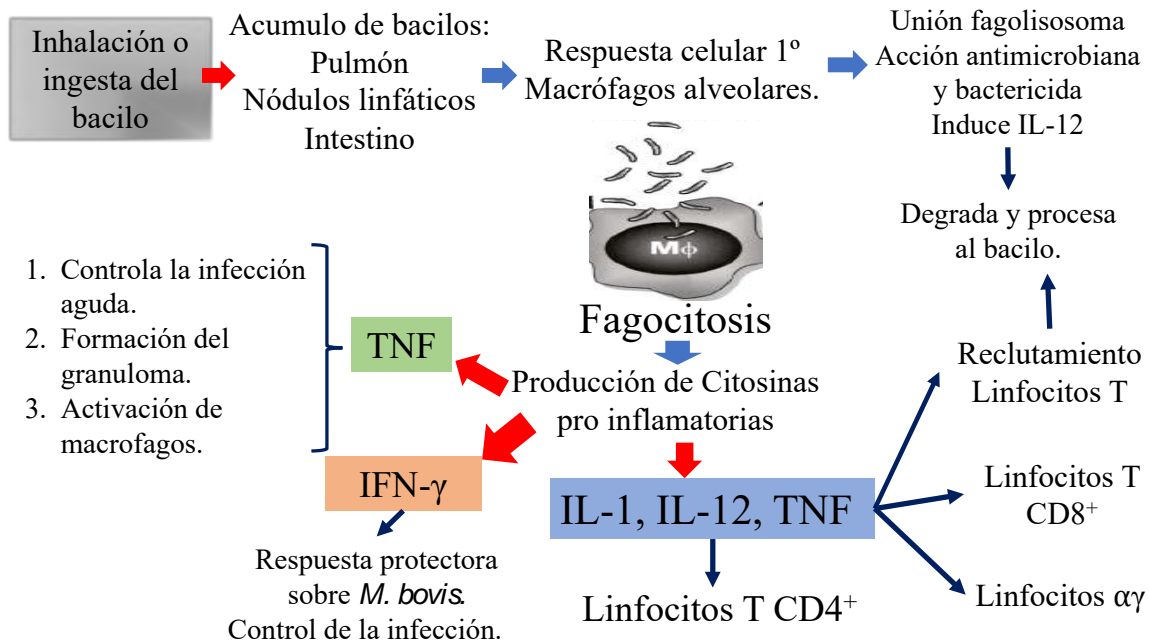


**Figura 4.** Patología de la Tuberculosis bovina y las cuatro etapas de su infección (Gurrola, 2017).

### 1.10 Inmunidad

La resistencia a los patógenos bacterianos intracelulares facultativos como *Mycobacterium* depende de la inmunidad adquirida mediada por células, caracterizada por la activación de linfocitos T (LT) y subsecuente activación de macrófagos para incrementar la muerte de tales organismos (Rivas-Santiago, *et al.*, 2005).

En este proceso immuno-patológico la respuesta inmunológica específica tanto humoral como mediada por células hacia un antígeno se inicia con la participación de las células T, a través del reconocimiento de porciones de antígenos proteicos (péptidos), unidos a moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-II) en la superficie de las CPA's. Tras la activación por el antígeno específico (antígenos micobacterianos) estas células secretan citocinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la linfotóxina que activan a los neutrofilos y células endoteliales; mientras que la interleucina-5 (IL-5) causa activación, crecimiento y diferenciación de las células B, promoviendo la producción de anticuerpos; el interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) activa a los fagocitos mononucleares; y la interleucina-2 (IL-2) activa a las células NK así como a los linfocitos T y B (Neill, *et al.*, 1993) (Figura 5).



**Figura 5.** Mecanismos inmunológicos de la tuberculosis bovina (Gurrola, 2017).

La primera respuesta para destruir al bacilo es la hipersensibilidad retardada y la inmunidad celular. En esta hipersensibilidad retardada el bacilo es inhibido extracelularmente junto con los sitios de necrosis caseosa y la licuefacción, ocasionando el daño tisular de los tejidos afectados, especialmente cuando las concentraciones de antígenos son altos.

La IL-2 produce una proliferación autocrina y paracrina de los Linfocitos T activados. Existe un aumento en la producción de IFN- $\gamma$ , TNF y LT. El IFN- $\gamma$  actúa sobre las CPA, (células endoteliales o macrófagos), aumentan su capacidad para eliminar el antígeno por medio de la fagocitosis y los mecanismos bactericidas, aumenta la expresión de moléculas clase II del CMH, aumentando la eficacia de la presentación antigénica de las células T CD4<sup>+</sup> *in situ*. El TNF, actúan sobre células endoteliales, induce la activación de leucocitos y de la respuesta inflamatoria (Yssel, *et al.*, 1992).

La pérdida de la respuesta DTH a antígenos que se encuentran en forma universal, es indicio de una función deficiente de células T, situación conocida como anergia (ausencia de la respuesta celular). Los animales anérgicos son extremadamente susceptibles a la infección por microorganismos intracelulares. La producción de cantidades significativas de IL-2 e IFN- $\gamma$  por los linfocitos T esta disminuida o nula y predomina la respuesta tipo Th2, donde la producción de IL-4 e IL-10 y TGF- $\beta$  es mayor. Esta respuesta limita la respuesta inmunológica contra otros patógenos lo cual puede provocar una respuesta fallida a la infección (Johnson, *et al.*, 1998).

## 1.11 Métodos de diagnóstico

La Norma Oficial Mexicana 031-ZOO-1995. Campaña Nacional de Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina, menciona que el diagnóstico se lleva a cabo por medio de la prueba de tuberculina utilizando un derivado proteico purificado (PPD), así como análisis bacteriológico e histopatológico y la observación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en laboratorio. La toma de muestras para estudios histopatológicos y bacteriológico se realiza en órganos que presenten lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis o secreciones sugestivas.

En México, los programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina se basan en la tuberculinización y eliminación de los animales reactivos; sin embargo, el comportamiento epidemiológico de la prueba ha sido una preocupación constante por sus parámetros irregulares de sensibilidad (40 a 90%) y especificidad (78 a 96%), lo que predispone a la presencia de resultados falsos positivos y falsos negativos (Waters, *et al.*, 2011).

Los métodos directos (Cuadro 4) son aquellas técnicas que se basan en la detección del agente etiológico como cultivo e identificación bioquímica y Tuberculina.

**Cuadro 4.** Métodos directos usados en el diagnóstico de tuberculosis bovina (SAGARPA, 1995).

<b>Prueba</b>	<b>Muestra</b>	<b>Descripción</b>
Cultivo	Tejido fresco conservado en solución saturada de Borato.	Siembra del material sospechoso en medios especiales como Stonebrink y Lowenstein Jensen. La temperatura óptima de crecimiento es a 37 °C. Morfología colonial
Identificación bioquímica	Tejido fresco conservado en solución saturada de Borato	Diferentes técnicas para distinguir <i>M. tuberculosis</i> de <i>M. bovis</i> en el laboratorio: determinación de la fotoreactividad, acumulación de niacina y reducción de nitratos, actividad de catalasa, hidrólisis de Tween 80.
Tuberculina	<i>In vivo</i> en el animal	Tuberculinas autorizadas para efectos de la campaña son: PPD bovino, elaborado con la cepa AN5 de <i>M. bovis</i> y PPD aviar, elaborado con la cepa D4 de <i>M. avium</i> . Prueba de pliegue caudal, prueba cervical simple y prueba cervical comparativa.

Los métodos indirectos (Cuadro 5) son aquellas técnicas basadas en la detección de la respuesta inmune del animal ante la presencia del microorganismo, histopatología, PPD (prueba de tuberculina), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), Detección de INF- $\gamma$  (Gamma Interferon) y Spoligotyping, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Neill, *et al.*, 1994). El

diagnóstico actual es logrado a través de métodos indirectos principalmente PPD. Desde 1917, la prueba tuberculina ha sido para el diagnóstico de la tuberculosis bovina (Milián, *et al.*, 2000). Detecta la respuesta inmune de aquellos individuos que han estado o actualmente están en contacto con *M. bovis*, sin embargo; no es 100% específica ni sensible. Se están estudiando las respuestas inmunológicas a las infecciones del ganado por *M. bovis* para desarrollar métodos de diagnóstico mejorados o alternativos, ya que, a veces, las pruebas cutáneas presentan inconvenientes prácticos. Sin embargo, no existe una prueba sanguínea para la tuberculosis en el ganado u otros animales que sea de aceptación universal (Rhotel, *et al.*, 1992).

**Cuadro 5.** Métodos indirectos usados en el diagnóstico de la TBb (Neill, *et al.*, 1994; NOM-031-ZOO-1995; Milián, *et al.*, 2000; Luque y Herráez, 2002; Díaz y Jaramillo, 2012).

<b>Prueba</b>	<b>Muestra</b>	<b>Descripción</b>
Histopatología	Tejidos sospechosos y sugestivos	Se utiliza la tinción Hematoxilina-Eosina (H&E). Permite identificar la presencia de granulomas característicos y se emplea junto con la tinción Ziehl-Neelsen para observar a los bacilos.
Tinción de BAAR	Colonias de micobacterias	Mediante la tinción de Ziehl-Neelsen: se observan microorganismos ácidos alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso o bien en laminillas con tejidos sospechosos. Se observan a los bacilos de color rojo.
ELISA	Suero sanguíneo	Empleada para la detección de anticuerpos, mediante el uso de antígenos específicos de micobacterias unidos a una fase sólida, conjuntamente empleando anticuerpos unidos a una enzima, para identificar por color.
Spoligotyping	Leche, sangre, exudado nasal, tejido fresco con lesiones o sugestivas de animales reactivos.	Tipificar y diferenciar genéticamente los aislados del Complejo <i>M. tuberculosis</i> . Se basa en un polimorfismo de ADN presente en un locus cromosomal, la región de repetición directa, la cual está presente únicamente en las bacterias del Complejo <i>M. tuberculosis</i> .
Detección de Interferón-g (IFN- $\gamma$ )	Sangre completa con Heparina	Detecta la producción de interferón gamma <i>in vitro</i> , inducida por los antígenos específicos en linfocitos previamente sensibilizados. Posee una sensibilidad de entre el 70 y 94% con una especificidad que varía entre un 97 y 99%.



PCR simple	Leche, sangre, exudado nasal ADN de tejido fresco sugestivo con lesiones.	Basado en la síntesis enzimática de un fragmento de ADN específico del microorganismo. Se basa en el uso de dos oligonucleótidos artificialmente sintetizados (primers) que hibridan las hebras opuestas y flanquean la región de interés de ADN blanco. Una serie repetida de ciclos que involucran la desnaturalización del templado, la hibridación de los primers de las cadenas de templado y la extensión de los primers, por la ADN polimerasa lo que resulta en una acumulación exponencial del fragmento específico.
PCR anidada	ADN	La especificidad puede aumentarse realizando una segunda reacción de PCR, con dos cebadores nuevos que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par, dando así lugar a productos de PCR más cortos, pero más específicos.
PCR inversa	ADN	Esta variante se emplea para clonar las regiones desconocidas de un DNA situadas en posición vecinal a secuencias diana conocidas. Es decir, en lugar de amplificar la región interna, flanqueada por dos cebadores (PCR convencional), se amplifica la región externa, que flanquea a los cebadores.
RT-PCR	RNA	Se trata de una amplificación de RNA (especialmente mRNA) a través de la síntesis previa de su cDNA (DNA complementario al RNA), que después se amplifica por PCR. Es decir, no se obtienen copias del RNA en partida, sino de DNA, aunque se conserva obviamente la secuencia.
PCR-Multiplex	ADN	Hay múltiples pares de primers (hasta 8) lo que da una serie de productos. Éstos pueden verse como múltiples bandas en un gel de agarosa. Se usa frecuentemente en diagnóstico médico. Ahorra templado, tiempo y gastos. Requiere una cuidadosa optimización.

## 2. Justificación

La incidencia y prevalencia de la Tuberculosis bovina (TBb) varían de acuerdo al tipo de sistema de producción a la que están sometidos los animales y al área geográfica. En México, la prevalencia de la tuberculosis en ganado lechero es del 16% y de 2.9% en ganado de carne y las pérdidas económicas se calculan en más de 250 millones de pesos. En países desarrollados la transmisión de la TBb a través de la leche se ha reducido considerablemente, gracias a la introducción de la pasteurización y programas de control de la enfermedad. En nuestro país no se han podido llevar a cabo los programas de control y erradicación de la TBb de manera adecuada, debido a las implicaciones que conlleva en la parte pecuaria y en cuanto a la parte de salud pública, ya que esta enfermedad constituye en un riesgo para el humano, pues se ha determinado que *M. bovis* es responsable de aproximadamente entre un 3% - 10% de los casos de tuberculosis humana a nivel mundial, debido a las costumbres que prevalecen por el consumo de leche y derivados lácteos sin pasteurizar.

El suero de leche es un subproducto de la industria quesera que representa del 80% a 90% del volumen total de leche procesada; este contiene concentrados de proteína del 40% al 80%, lo que permite un amplio uso de estos productos, principalmente en la industria alimentaria; dentro de sus aplicaciones más comunes es usado como sustituto de otros ingredientes y componentes como son: bebidas, el yogur, los quesos untables (requesón), en embutidos, la panificación, la confitería, inclusive en la industria farmacéutica y también como fuente de alimentación animal.

Este estudio tuvo como finalidad la implementación de una PCR múltiplex para detectar *M. bovis* a partir de suero de leche, debido a la importancia que esta enfermedad tiene y así poder implementar programas de control, prevención y erradicación de manera oportuna y efectiva.

### **3. Hipótesis**

Si las vacas están cursando con una infección producida por *M. bovis* y la están eliminando en leche, estas podrán ser detectadas en el suero mediante la técnica de PCR múltiplex.

### **4. Objetivo**

#### GENERAL

Determinar la presencia de *Mycobacterium bovis* a partir de suero de leche empleando PCR-M.

#### PARTICULARES

1. Obtener muestras de leche de ganado bovino en Sistemas de producción de lechería familiar.
2. Detectar los genes RD1 y RD9 para identificar *Mycobacterium bovis* a partir de suero de leche.
3. Realizar el aislamiento y tipificación bioquímica de micobacterias a partir de muestras de suero de leche.

## 5. Metodología

### Toma de muestras

Las muestras de la leche se colectaron después del despunte de la ubre de las vacas, las cuales fueron previamente desinfectadas con una torunda de algodón impregnada de alcohol, se tomaron aproximadamente 50 ml de leche. Se colectaron un total de 259 muestras de leche de vaca (233 muestras individuales y 26 muestras de tanques de acopio); procedentes Sistemas de producción de lechería familiar, de diversos estados de la República Mexicana (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de muestras de leche individuales y de tanque evaluadas.

Estado de la República	Muestras Individuales	Muestras de Tanque
Querétaro	30	2
Hidalgo	32	0
Guanajuato	92	22
San Luis Potosí	20	1
Coahuila	59	1
<b>Total</b>	<b>233</b>	<b>26</b>

Las muestras se colectaron en tubos estériles de tipo Falcón de 50 ml, para su transporte al laboratorio se colocaron en una hielera con refrigerantes, procesándose dentro de las 24 - 48 horas siguientes a su obtención, las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Tuberculosis del CENID-Microbiología Animal del INIFAP.

### Reacción de la Cadena de la Polimerasa (PCR-M)

La obtención del suero de la leche se colocaron 10 ml de leche en un tubo falcón y se le agregaron 50 µl de solución de quimiosina al 1%, las muestras se incubaron en baño maría a 36 °C durante 30 min, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos.

Para la extracción del ADN a partir del suero de la leche se colocaron 2 ml de suero de la leche en microtubos y se centrifugaron a 12000 rpm, se quitó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionaron 500 µl de amortiguador TE1X y 100 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Se agregaron 75 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y SDS (10%), se incubó a 64 °C por 10 minutos, se agregaron 100 µl de NaCl 5M y CTAB (5 M) /NaCl (5M) y se incubó a 64 °C por 10 minutos; se adicionaron 750 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo de 2 ml y se agregaron 250 µl de isotiocinato

de guanidina (5 M) y 250 µl de acetato de amonio (7.5 M) y se mantuvieron a 8° C por 20 minutos. Se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa en un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante y a la pastilla obtenida se le agregó 500 µl de alcohol isopropílico se incubó a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos, se quitó el sobrenadante, se lavó con etanol al 70% por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente, se hidrató el ADN con 100 µl de agua grado biología molecular y se almacenaron a -20° C hasta su uso (Talbolt, *et al.*, 1997; Milián, *et al.*, 2000; Rodríguez, *et al.*, 2014).

Se determinó la presencia de *M. bovis* a partir del ADN de las muestras del suero de la leche obtenidas. La detección de los genes RD1 y RD9 se realizó mediante PCR-M empleando los primers de la Tabla 2.

**Tabla 2.** Primers utilizados mediante PCR-M en muestras de suero de leche.

Gen	Primers	Secuenciación	Peso Molecular	Ref.
RD1	ET1 ET2 ET3	5'-AAG-CGG-TTG-CCG-CCG-ACC-GAC-C-3' 5'-CTG-GCT-ATA-TTC-CTG-GGC-CCG-G-3' 5'-GAG-GCG-ATC-TGG-CGG-TTT-GGG-G-3'	150 pb	Talbolt, <i>et al.</i> , 1997; Rodríguez, <i>et al.</i> , 2014
RD9	RD FF RD Int RD FW	5'-GTG-TAG-GTC-AGC-CCC-ATC-C-3' 5'-GCT-ACC-CTC-GAC-CAA-GTG-TT-3' 5'-GCT-ACC-CTC-GAC-CAA-GTG-TT-3'	206 pb	Díaz, 2013; Rodríguez, <i>et al.</i> , 2014

La reacción empleada fue: 12.5 µl de PCR MasterMix (4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM de cada dATP, dGTP, dCTP, 400 µM dUTP, 0.05 UI ADN polimerasa), 1 µl de cada uno de los iniciadores ET1 (5 pmol), ET2(25 pmol), ET3 (5 pmol), 5 µl de agua libre de nucleasas, 10 µl del ADN (6 ng/µl.) obtenido del suero de la leche. Se incluyeron como controles el ADN de *M. bovis* y de *M. bovis BCG*.

El programa del termociclador empleado fue: un ciclo a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 65 °C y 40 segundos a 72 °C, y un paso de Extensión final a 72 °C 40 s, manteniendo las reacciones a 4 °C. Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Visualizados en el transiluminador marca KODAK.

#### Cultivo Bacteriológico del suero de la leche

Posteriormente se realizó una descontaminación de las muestras del suero de leche, obtenido previamente con el tratamiento de la quimiosina en los tubos de Falcón con una cantidad de 8 ml se les añadió ácido clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen de la leche y de 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1% (hasta obtener un color naranja), se agitaron los tubos ligeramente el tubo dejándolos reposar en la campana de extracción por 20 minutos. Se añadió una solución de NaOH 2N hasta que

el indicador virará a un color entre lila y morado. Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 20 min, se decantaron los tubos y el sobrenadante se desechó. El sedimento del tubo se utilizó para el cultivo bacteriológico (Balandrano, *et al.*, 1996).

Las muestras fueron sembradas por duplicado en dos medios de cultivo denominados Lowenstein-Jensen y Stonebrink. Dejando los tubos en una bandeja o bote con fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Se llevaron a la estufa de cultivo con la tapa floja para que se evapore la parte líquida de la siembra y se dejaron incubar durante 6 – 8 semanas a una temperatura de 37 °C.

Los tubos se revisaron diariamente durante los primeros 3 días y revisado que no hubiera contaminación, se ajustó el tapón y se colocaron en posición vertical dentro de la estufa. En los tubos que se observaron crecimiento de colonias de crecimiento lento (a partir de la cuarta semana) se realizó un frotis y se tiñeron con la técnica de Ziehl-Neelsen.

#### Tipificación Bioquímica

De los tubos inoculados en donde se observó la presencia de colonias, se envolvieron los tubos con una hoja de aluminio. También se expusieron a luz fuerte con una lámpara de tungsteno de 100 vatios por 3 a 5 días. Después de este tiempo se volvieron a poner en la incubadora bacteriológica y se examinó de 24 a 48 horas después para comprobar si hay desarrollo de un pigmento anaranjado o amarillo. Pigmentación: la presencia de pigmento amarillo en las micobacterias fotocromógenas es el resultado de la producción de cristales anaranjado amarillentos de caroteno por parte de las micobacterias de metabolismo activo, luego de ser expuestas a una luz brillante. No se conoce el tipo de pigmento producido por las micobacterias en la oscuridad (Balandrano, *et al.*, 1996).

Se hicieron las técnicas bioquímicas correspondientes: Prueba de Niacina, Prueba de reducción de Nitratos a Nitritos, Prueba de Catalasa y Prueba de Hidrólisis de Tween 80.

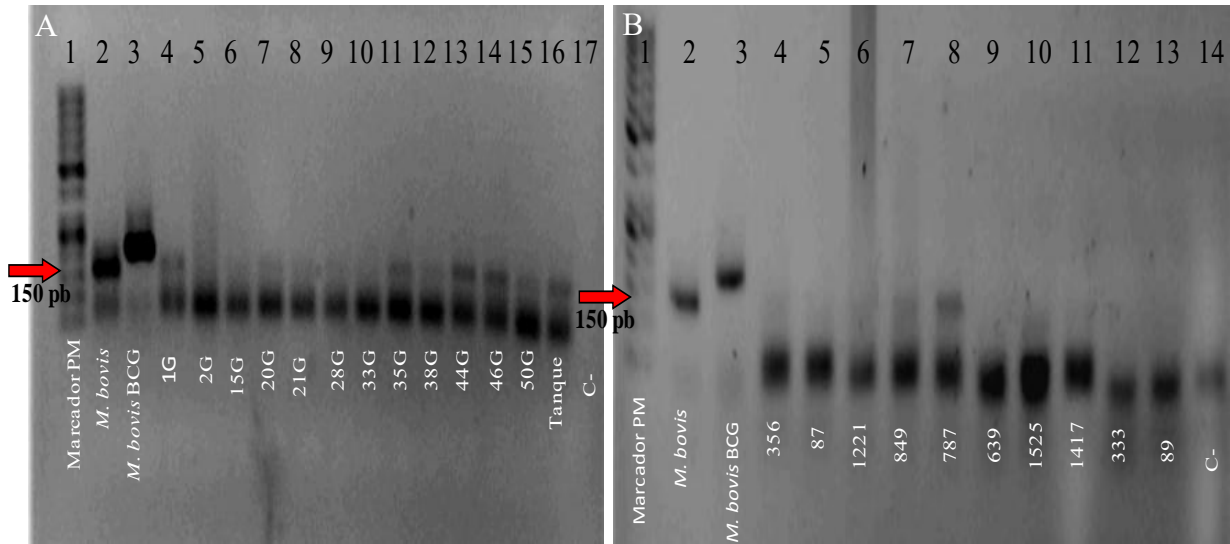
## 6. Resultados

A partir de la PCR-M se detectaron genes RD1 y RD9 de *M. bovis*.

La identificación de *M. bovis* se realizó mediante la detección de los genes PCR-M RD1 y PCR-M RD9 a partir de muestras de leche procedentes de los estados de Guanajuato, Torreón y San Luis Potosí.

Se realizó la detección de la región RD1 para identificar al Complejo Tuberculosis. De la PCR-M se obtuvieron productos de amplificación de 150 pb que corresponde a la región RD1, de las cuales el 14.59% (34/233) es de las muestras individuales de leche (Figura 6, 7 y Tabla 3) y el 15.38% (4/26) es de las muestras de tanque (Tabla 4 y Figura 8).

Se realizó la detección del gen RD9 para identificar *M. bovis* en las muestras que fueron positivas en la PCR para la detección de RD1. Se obtuvo un producto de amplificación de 206 pb en las 38 muestras procesadas (individuales y de tanque). Como Control positivo se utilizaron cepas de referencia *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Figura 9, 10 y Tabla 5).



Figuras 6 y 7. Amplificación del gen RD1. Gel de Agarosa 2% teñidas con bromuro de etidio de las muestras de suero de leche individuales de Guanajuato (A) y Torreón (B). Carril 1 Marcador de tamaño (Thermo Scientific® GeneRuler 50bp DNA Ladder); carril 2 Control positivo *M. bovis* 150 pb; carril 3 *M. bovis* BCG; carril 4 a 16 muestras positivas a *M. bovis* (A); carril 7, 8 y 10 muestras positivas a *M. bovis* (&); carril 14 y 17 control negativo sin DNA.

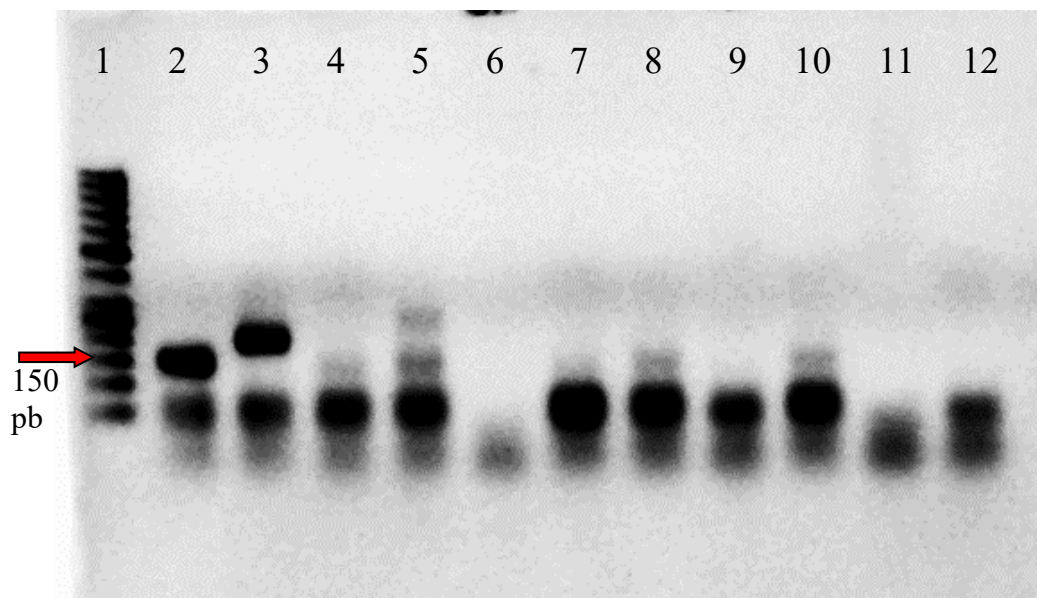
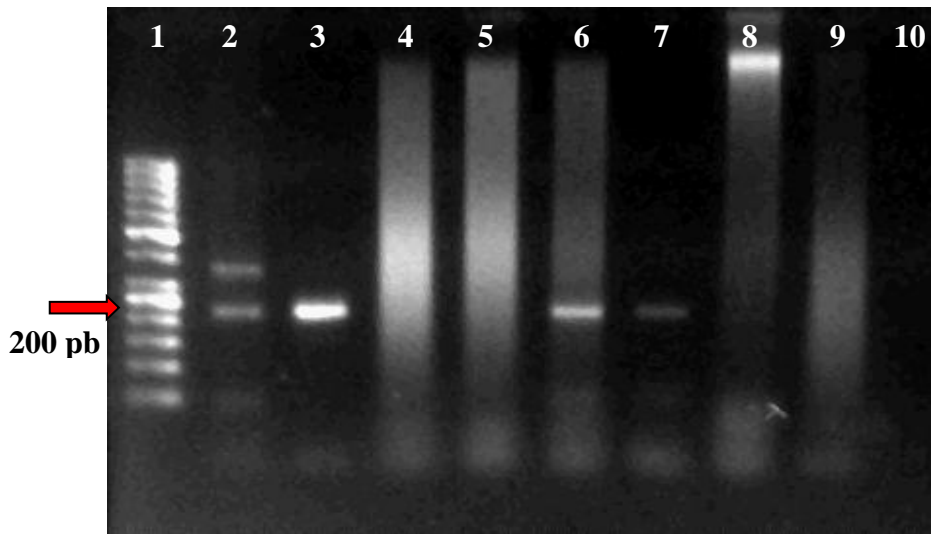


Figura 8. Amplificación del gen RD1. Gel de Agarosa 2% teñido con bromuro de etidio de las muestras de suero de leche de tanques de Guanajuato. Carril 1 Marcador de tamaño (Thermo Scientific® GeneRuler 50bp DNA Ladder); carril 2 control positivo *M. bovis* 150 pb; carril 3 *M. bovis* BCG 200 pb; carril 4, 5, 8 y 10 muestras positivas a *M. bovis*; carril 6, 7, 9 y 11 muestras negativas y carril 12 Control negativo sin DNA.





Figuras 9. Amplificación del gen RD9. Gel de Agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio de muestras las de suero de leche individuales. Carril 1 Marcador de tamaño (Thermo Scientific® GeneRuler 50bp DNA Ladder); carril 2 control positivo *M. tuberculosis*, carril 3 control positivo *M. bovis* 206 pb; Carril 6 y 7 muestras positivas a *M. bovis* y Carril 4, 5, 8 y 9 muestras negativas y Carril 10 control negativo sin ADN.



Figuras 10. Amplificación del gen RD9. Gel de Agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio de muestras las de suero de leche individuales. Carril 1 Marcador de tamaño (Thermo Scientific® GeneRuler 50bp DNA Ladder); carril 2 control positivo *M. tuberculosis*, carril 3 control positivo *M. bovis* 206 pb; carriles 7, 8, 9, 11 y 13 muestras positivas a *M. bovis*; carriles 4, 5, 6, 10 7,9 y 11muestras negativas y carril 14 control negativo sin ADN.

## Cultivo Bacteriológico

En el cultivo bacteriológico se obtuvieron seis aislamientos, de las 259 muestras; cuatro en muestras de suero leche individuales y dos de las muestras de tanque (Foto 1). Los aislamientos tuvieron un desarrollo a partir de las cuatro semanas, fueron positivos a la tinción de Ziehl Neelsen (Foto 2), se les clasificó como Bacilos Ácido Alcohol Resistentes (BAAR).

Tabla 3. Resultados de las muestras de suero leche individuales.

<b>Estado de la República</b>	<b>Muestras Individuales</b>	<b>PCR RD1</b>	<b>PCR RD9</b>	<b>Cultivo <i>M. bovis</i></b>
<b>Querétaro</b>	30	0	0	0
<b>Hidalgo</b>	32	0	0	0
<b>Guanajuato</b>	92	18	18	4
<b>SLP</b>	20	4	4	0
<b>Torreón</b>	59	12	12	0

Tabla 4. Resultados de las muestras de tanques de acopio.

<b>Estado de la República</b>	<b>Muestras de Tanque</b>	<b>PCR RD1</b>	<b>PCR RD9</b>	<b>Cultivo <i>M. bovis</i></b>
<b>Querétaro</b>	2	0	0	0
<b>Hidalgo</b>	0	0	0	0
<b>Guanajuato</b>	22	4	4	2
<b>SLP</b>	1	0	0	0
<b>Torreón</b>	1	0	0	0

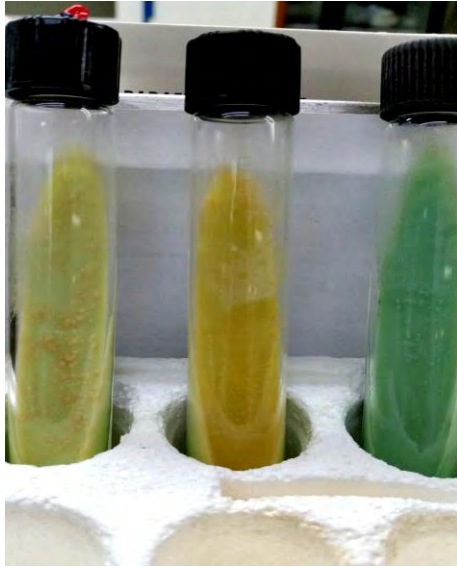


Foto 1. Cultivo bacteriológico del suero de las leches, tanto individuales como de tanque. Se observó el crecimiento de las colonias a partir de la 3 semana

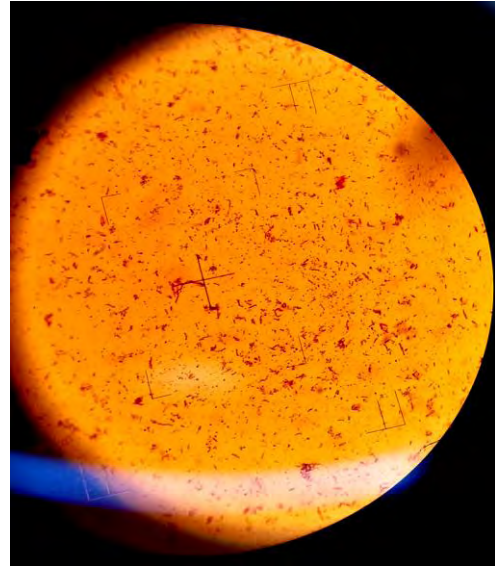


Foto 2. Frotis de BAAR a partir de las colonias observadas en los medios de cultivo de las muestras de suero de la leche.

### Tipificación Bioquímica

La tipificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas: Catalasa, Hidrolisis de Tween 80, Nitratos y Niacina (Balandrano, *et al.*, 1996), y con los resultados obtenidos fueron clasificados como *M. bovis* (Tabla 5, Foto 3, 4, 5 y 6).

**Tabla 5.** Tipificación bioquímica de las cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*

	Catalasa		Tween 80	Nitratos	Niacina
	R	L			
<i>M. bovis</i>	-	+	-	-	-
<i>M. Tuberculosis</i>	+	-	+	+	+



Foto 3. Prueba de Catalasa. Los microorganismos que producen la enzima catalasa, tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. *M. bovis* produce burbujas de forma lenta.

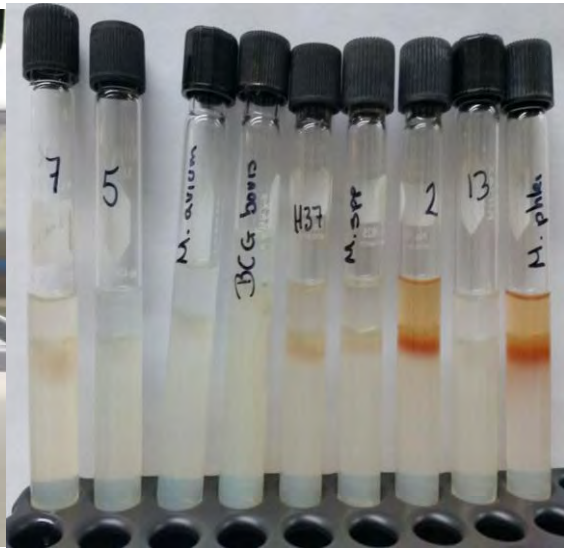


Foto 4. Prueba de Hidrólisis de Tween 80. La liberación de mayor o menor cantidad de ácido oléico media la actividad enzimática de las micobacterias. *M. bovis* no presenta la coloración a la hidrolización al Tween 80

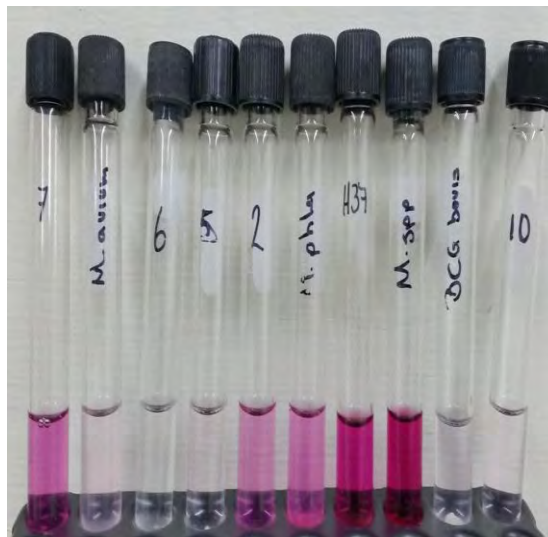


Foto 5. Prueba de Nitratos a Nitritos. Algunas micobacterias (entre ellas *M. tuberculosis*) utilizan nitratos como fuentes de nitrógeno. Se detecta la presencia de nitritos cuando se forma un colorante rojo. *M. bovis* no presenta coloración.

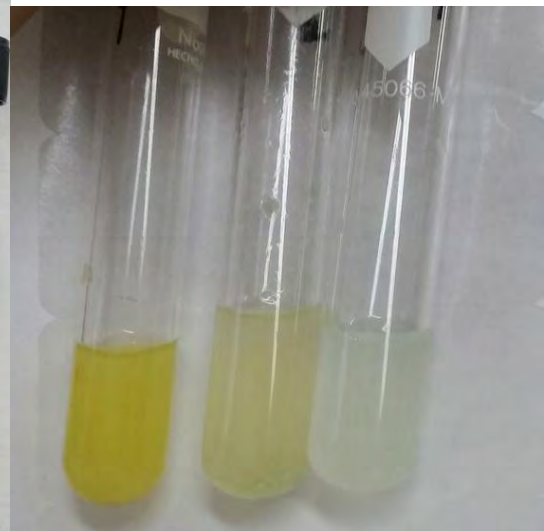


Foto 6. Prueba de Niacina. Todas las micobacterias producen algo de niacina (ác. Nicotínico), solo *M. tuberculosis* produce y acumula en gran cantidad. *M. tuberculosis* produce un fuerte color amarillo Y *M. bovis* no presenta coloración.

## 7. Discusión

La tuberculosis bovina es una enfermedad reemergente de difícil control. Esto debido a que el bacilo es capaz de persistir en el hospedero evadiendo la respuesta inmune. La transmisión de tuberculosis bovina a humanos ocasionada por *M. bovis*, se ha atribuido al contacto directo con animales infectados o el consumo de leche no pasteurizada proveniente de estos animales, ya que, varios autores Espinoza, *et al*, 2005; Sánchez, 2015; han demostrado que ese proceso reduce con efectividad o elimina a los microorganismos patógenos, como *Mycobacterium* y *Brucella*.

Rendón, *et al.*, 2008; refiere que la posibilidad de obtener un cultivo positivo a partir de muestras de leche de bovinos, generalmente es muy baja, como lo obtenido en el presente estudio, pues menciona para que se de esta situación, el animal tendría que estar cursando con una infección generalizada y linfonodos abiertos, tener afección de la glándula mamaria o de los linfonodos mamaros, pues observó que al menos del 3% de las vacas que cursan con tuberculosis y eliminan el bacilo en leche.

El porcentaje de aislamiento de *M. bovis*, en el presente estudio fue del 1.7 % en las muestras individuales y del 7.7% de las muestras provenientes de tanque; el aislamiento de las micobacterias depende de muchos factores entre ellos que el agente este siendo eliminado en la muestra obtenida, su viabilidad y adaptabilidad. Durante la revisión de cultivos, se observó la presencia de contaminantes; aun cuando el porcentaje de aislamientos obtenidos pueda ser considerado bajo, la importancia de esta prueba es confirmar que el animal está eliminando bacterias viables en leche y que pueden ser un foco de infección en animales y al humano.

El aislamiento micobacteriano es lento y se requiere, por lo menos, de tres a cuatro semanas para presentar un desarrollo visible sobre el medio de cultivo y se requiere que permanezcan hasta de nueve semanas en incubación para poder descartar que no haya desarrollo bacteriano o contaminación con otros agentes. Se debe considerar la descontaminación como sugiere Balandrano, *et al.*, 1996, para que permita eliminar a todos los microorganismos que pudieran interferir con el crecimiento de *M. bovis*. Pues las muestras pueden contener una flora bacteriana mixta y se debe reducir una probable contaminación con otras bacterias. A las 259 muestras de leche

procesadas, se les realizó la descontaminación utilizando la técnica de Zephiran al 0.2% el aislamiento fue del 2.3 % del total de las muestras, y el crecimiento se observó después de las nueve semanas y en el 98.44% no fue posible obtener el aislamiento, esto se puede atribuir a que la viabilidad de las bacterias excretadas en las muestras no era la suficiente para el crecimiento o que resultaron contaminadas con otro tipo de bacterias, probablemente porque el método de descontaminación no fue el adecuado. Existen otras técnicas de descontaminación como el Método de Petroff (el hidróxido de sodio al 4%), pero es tan fuerte que puede matar o dañar seriamente a las micobacterias de la muestra, haciendo que su desarrollo sea lento o nulo (Cernoch, *et al.*, 1994; Balandrano, *et al.*, 1996; Rojas y González, 2006; Koneman, *et al.*, 2008).

Los métodos de diagnóstico oficial para la detección de tuberculosis bovina que se establecen en la NOM 031-ZOO 1995, son la prueba de tuberculina y el análisis microbiológico e histopatológico. Actualmente, se ha hecho la sugerencia por parte del CONASA, en el Comité de Salud y Producción Bovina; que el uso de las herramientas de biología molecular pueda ser utilizadas como alternativa para determinar la presencia de la *M. bovis* ya que estas pruebas tienen una alta sensibilidad y especificidad.

Para alcanzar las estrategias de control y eliminación más eficaces, se requiere disponer de técnicas diagnósticas de vanguardia que sean rápidas, sensibles y específicas. Las técnicas de análisis de ácidos nucleicos se han vuelto viable. La aplicación de la PCR; es de gran apoyo en el diagnóstico de la tuberculosis bovina porque permite la identificación oportuna y precisa de *M. bovis* en muestras clínicas, sin sacrificar al animal, en este caso las muestras de leche, como al igual que lo reporta Rendón, *et al.*, 2008

Diversos autores como Manharias, *et al.*, 1996; Talbolt, *et al.*, 1997; Brosch, *et al.*, 2002; Arraiz, *et al.*, 2007; han trabajado en el establecimiento de técnicas de PCR-M, con la finalidad de tener una prueba diagnóstica diferencial que permita distinguir entre la especie de micobacteria y la cepa que está presente en los animales afectados, sin embargo; la sensibilidad que presentaron sus pruebas no rebasan el 60%.

La PCR necesita la elección correcta de la secuencia blanco del microorganismo que se desea identificar. Las diferencias en la secuencia de genes pueden ser una herramienta útil para la tipificación de diferentes cepas y serotipos de una misma especie (Rojas y Gonzales, 2006). En el presente estudio, se realizó una PCR - Múltiplex para el diagnóstico de tuberculosis bovina que tiene una Sensibilidad del 95% y una Especificidad del 100%, está basada en la identificación dos Regiones de Diferencia (RD) de *M. bovis*, con la cual se logró identificar y diferenciar la presencia del ADN de *M. bovis* en el 14.7 %. Con esta prueba, se logra la detección de *M. bovis* en leche en un tiempo de tres días comparado con la prueba de “oro” el aislamiento bacteriano cuyo crecimiento puede llegar a tardar más de ocho semanas (Balandrano, *et al.*, 1996)

A menudo hay problemas con la manipulación en la mayoría de los protocolos de extracción de ADN (Small, *et al.*, 1993; Rojas y Gonzales, 2006) lo cual, los hace propensos a la contaminación de las muestras, la calidad del ADN, las degradaciones parciales y el tiempo que duran los protocolos, además es necesario utilizar reactivos y procedimientos agresivos que eventualmente podrían conducir a la pérdida del material genético presente en la muestra. Otros factores que pueden afectar a la sensibilidad y especificidad de la técnica como lo describe Moran, *et al*, 2000; son la viabilidad biológica y la amplificación inespecífica. El ADN fue visualizado en geles de agarosa, observándose de buena calidad.

Otras pruebas alternativas empleadas en el diagnóstico de tuberculosis bovina en complemento con las descritas en la NOM-031-ZOO-1995 son: ELISA, Prueba de IFN- $\gamma$ , Spoligotyping y PCR.

La prueba de Spoligotyping, permite la diferenciación simultánea de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Dannenberg, 1991; De Armas, *et al.*, 2006). El método está basado en el polimorfismo de ADN de la bacteria en una región que contiene múltiples secuencias repetidas de 36 pb separadas por secuencias no-repetidas de 34 a 41 pb conocidas como región de repetición directa (DR). Se puede realizar con muestras obtenidas *post mortem* y *ante mortem* (exudado nasal, leche y sangre) y es utilizada como una herramienta molecular complementaria en zonas de baja prevalencia y hatos de erradicación. Es específica para cada tipo de cepa del complejo *M. tuberculosis*. Puede usarse directamente el ADN extraído sin necesidad de hacer aislamiento. Su especificidad y sensibilidad es del 98% (Milián, *et al.*, 2000; Díaz, *et al.*, 2006).

González-Llamazares, *et al.*, 1999 especifica que dentro de los métodos de prevención y control de las enfermedades está el considerar a la vacunación como una alternativa, sin embargo; en el caso de la TBb en México no existe la vacunación. De forma experimental se ha realizado la vacunación empleando la cepa *M. bovis* BCG como una alternativa para el control de la enfermedad. Pero para que esta pueda ser considerada es necesario contar con pruebas de diagnóstico que permitan diferenciar animales infectados con *M. bovis* de campo, de animales vacunados con *M. bovis* BCG. Con la PCR-múltiple empleada en este estudio permite diferenciar entre cepas de *M. bovis* y *M. bovis* BCG, convirtiéndola en una alternativa diagnóstica que puede ser empleada para establecer programas de seguimiento epidemiológico de una manera más certera en caso de que se decidiera llevar a cabo la vacunación con *M. bovis* BCG.

La presencia de los genes RD1 y RD9 para la identificación de *M. bovis* mediante la PCR-M empleada en este estudio, puede ser una alternativa para llevar a cabo el diagnóstico a partir de la obtención de muestras biológicas (hisopado nasal) o del suero de leche, como ha sido demostrado Brosch, *et al.*, 1998, realizó una PCR en dos etapas basado en regiones genómicas de diferencia (RD1, RD9 y otras regiones), con el objetivo de diferenciar especies de *Mycobacterium* como *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis* y *M. bovis* BCG; tanto en veterinaria como en medicina humana con este método se logra una diferenciación rápida, lo que lo hace ser un método que puede ser utilizado en laboratorios de rutina y con fines de vigilancia.

Diversos autores Brosch, *et al.*, 1998; Ameni, *et al.*, 2007; Arraiz, *et al.*, 2007; Dean, *et al.*, 2011; han descrito la RD1 que codifica la secreción de las proteínas ESAT-6 y CFP-10, las cuales juegan un papel importante en los mecanismos de patogenicidad de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, que disminuyen la expresión de los cofactores en CPA (B7) y promueven la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células CD4 y CD8 sensibilizadas. En el estudio de Talbolt, *et al.*, 1997; Parsons, *et al.*, 2002; encontraron que el gen RD1 está ausente de todas las cepas de *M. bovis* BCG, pero está presente en todas las cepas del complejo *M. tuberculosis* y *M. bovis*. En este estudio se identificó el gen RD1 en el 14.59% de las muestras individuales de leche y el 15.38% de las muestras de tanque. Para esta prueba se utilizó como control positivo *M. bovis* BCG y la cepa de referencia AN5 de *M. bovis* observándose claramente la diferencia entre las cepas control.



En la PCR-M RD9 del presente estudio se emplearon los iniciadores reportados por Parsons, *et al.*, 2002; Díaz, 2013; para detectar el gen RD9 que amplifica un producto de 206 pb para *M. bovis* y de 333 pb para *M. tuberculosis*. De las 38 muestras individuales y de tanque, positivas a la PCR, se obtuvo el producto esperado de 206 pb, esto indica que hay animales que están eliminando *M. bovis*, y esto es un foco de infección para otras vacas y humanos.

Actualmente muchos laboratorios están incorporando la técnica de PCR a sus métodos de investigación y diagnóstico de bacterias patógenas en alimentos, lo hacen buscando rapidez y simplicidad. Con esta técnica se puede detectar animales que presentan tuberculosis crónica y que están eliminando la bacteria en leche, con lo cual se puede llevar a cabo las medidas para implementar un programa de control y su posterior erradicación de manera más fácil a los animales reactivos; o mantener a los animales en producción controlada y su eliminación y sacrificio como lo establece la NOM 031-ZOO-1995.

## 7. Conclusiones

- Con la PCR múltiplex utilizando la identificación de los genes RD1 Y RD9, se detectaron animales que estaban eliminando *M. bovis* en leche.
- Se obtuvo el aislamiento de *M. bovis* en el 1.7% de las muestras de suero leche de animales provenientes de lecherías familiares.
- PCR-Multiplex empleada en este estudio, es una prueba diagnóstica rápida que puede detectar animales verdaderos positivos a tuberculosis bovina en un menor tiempo pudiendo así proponer la implementación de programas de control, prevención y erradicación.

## 8. Referencias

1. O'Reilly LM, Daborn CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in Animals and Man: A Review. INTERVET. vol. 76 Supplement 1. Holland. Pp 1 - 46.
2. Pérez-Guerrero L, Milián SF, Arriaga DC, Romero TC, Escartín ChM. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en Querétaro, México. Rev Sal Púb Méx 2008;(50):1- 6.
3. Thoen, CO, Barletta, RG. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. 2° edition. Blackwell Publishing. USA, 1995. Pp 18 – 31.
4. Mendoza ESE y Morilla GA. Temas selectos de la evolución de las enfermedades infecciosas. 1° edición. FES Cuautitlán, UNAM. México, 2008
5. Rodgers JD, Connery NL, McNair J, Welsh MD, Skuce RA, Bryson Dg, McMurray DN, Pollock JM. 2007. Experimental exposure of cattle to a precise aerosolised challenge of *Mycobacterium bovis*: A novel model to study bovine tuberculosis. Tuberculosis. 87: 405-414.
6. González-Llamazares OR, Gutiérrez CB, Álvarez ND, de la Puente RVA, Domínguez RL, Rodríguez-Ferri EF. 1999. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. Vet. Microbiol. 70: 55-66.
7. Rodríguez HE, Pizano MOE, Milián SF, Cantó AGJ, Anaya EAM, Rubio VY, Nava VA. Manual de procedimientos para la identificación molecular y genotipificación de *M. bovis*. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. México, 2014.
8. FAO. The state of food and agriculture. Roma, Italia; 2009:166.
9. SIAP, Producción Ganadera 2015 - Bovinos de Leche Disponible: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/165998/bovlech.pdf>
10. SIAP. SAGARPA. Panorama de la Leche en México. Diciembre 2015: 1-3. Disponible: [http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure\\_leche\\_DIC2015.pdf](http://infosiap.siap.gob.mx/opt/boletlech/Brochure_leche_DIC2015.pdf)
11. SAGARPA. Agriculture and Food Policy Center Food and Agricultural Policy Research Institute. Proyecciones para el Sector Agropecuario de México. México:60.
12. Myers JA, Green T and Warren H. 1998. Tuberculosis. A half Century of Study and Conquest. University of Minnesota. USA.
13. Cartes PJC. Breve Historia de la Tuberculosis. Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXX. 2013:(605) pág 145-150 Disponible: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2013/rmc131z.pdf>
14. Mostowy S, Behr MA. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Chest Med. 2005; 26: 207-216.
15. Hershkovitz I, Donoghue H., Minnikin D, Besra G, Lee O, Gernaey A, Galili E., Eshed V, Greenblatt Ch, Lemma E, Bar-Gal G, Spigelman M. Detection and Molecular Characterization of 9000- Year- Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. PloS One. 2008.

16. Carrillo, FC. Los postulados de Koch: Revisión Histórica y Perspectiva Actual. Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM. RCCV Vol. 1 (2). 2007. Pp 263.
17. Koch, R. Die Antologie der Tuberculose (Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März cr. Gehaltene Vortrage). Berliner klin, 1882. 13(10): 469-475.
18. Monaghan, ML, Doherty, ML, Collins, JD, et al. The tuberculin test. ELSEVIER. Veterinary microbiology 40 (1994) PP 111-124.
19. Gutiérrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis* PLoS Pathog. 2005; 1(1): 55-56.
20. Díaz OF y Jaramillo ML. Tuberculosis Bovina de Robert Koch a nuestros días. Libro Científico No.1. INIFAP, CENID Microbiología Animal. México. 2012.
21. Thoen, CO, Steele JH, Gilsdorf, M. *Mycobacterium bovis* Infection in animals and Humans. 2° edition. Blackwell Publishing. USA, 2006.
22. Plan Estratégico de la Campaña Nacional de la Tuberculosis Bovina en México, 2008-2012. Dirección General de Salud Animal. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina. Disponible: <http://www.senasica.gob.mx/?id=801>
23. Ortiz MEP. La Tuberculosis Bovina: un problema aún sin resolver. INIFAP, México Libro Técnico N° 13, ISBN: 978-607-37-0106-8 339 pp., México, 2015.
24. Milián SF, García CL, Romero TC; et al. 2012. Diversidad Genética y distribución regional de las cepas de *Mycobacterium bovis* del ganado en México. Rev. Mex. Ciencias Pec, vol 3, núm 4, oct-dic. INIFAP. Morelos, México 2012. pp 459-471.
25. OPS – OMS. 1992. Desarrollo de Programas de Salud Pública Veterinaria. Plan de acción para la erradicación de la Tuberculosis bovina en las Américas. Disponible: [http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=54](http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=54)
26. Guía para el seguimiento epidemiológico de la tuberculosis bovina. Departamento de Tuberculosis bovina y Brucelosis de los animales. 4° versión. SAGARPA. SENASICA. Julio 2015. Disponible: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/150601/10\\_GUIADESEGUIMIENOTEPIDEMIOLOGICO09-07-2015.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/150601/10_GUIADESEGUIMIENOTEPIDEMIOLOGICO09-07-2015.pdf)
27. Granados PR, Villaverde PMC. Microbiología Tomo I. Bacteriología. Características y clasificación bacteriana. Características y técnicas bioquímicas. 1° edición. Editorial Paraninfo. España, 2007: 157.
28. Butler R, Ahearnd, DD, Kilburn JO. High-Performance Liquid Chromatography of Mycolic Acids as a Tool in the Identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* species. Journal of clinical microbiology, Vol. 23, No. 1. Jan. 1986, p. 182-185.
29. Haagsma J. Working Paper on Recent Advances in the Field of Tuberculosis Control and Research. World Health Organization Meeting on Zoonotic Tuberculosis with Particular Reference to *Mycobacterium bovis*. 15 November 1993, Geneva, Switzerland.
30. Appleyard, GD, Clark, EG. Histologic and genotypic characterization of a novel *Mycobacterium* species. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 40 No. 7, 2002.

31. Lanelle G, Daffe MM. 1991. Mycobacterium cell wall and pathogenicity; A lipidologist's view. *Res Microbiol.* 142: 433-437.
32. Zahrt T; Thomas C. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microb Infect.* 2003;5:3
33. Hermoso de Mendoza, SM. Tratado de Veterinaria práctica. Tuberculosis Bovina. Madrid, España. 1992.
34. Milian SF, Salman MD, Ramírez CIC, Payeur JB, Rhyan JC, Santillan FMA. 2000. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in México. *Am. J. Vet, Res* 61(1): 86-89.
35. Nigou J, Gilleron M, Puzo G. 1999. Lipoarabinomannans: characterization of the multiacylated forms of the phosphatidyl-myo-inositol anchor by NMR spectroscopy. *Biochem J.* 337:453-460.
36. Marchal, G. 1993. El resurgir de la Tuberculosis. *Mundo Científico.* 136: 520-528.
37. Bárcenas MG, Rosales, ME, Fernández RGA. Patogénesis de Micobacterias. Temas selectos de la evolución de las enfermedades infecciosas. 1° edición. FES Cuautitlán, UNAM. México, 2008.
38. Díaz OF, Santiago, CJR Arriaga DC; et al. Tópicos de Interés en Inmunología Veterinaria. 1° edición. INIFAP, CENID Microbiología Animal. México, 2006.
39. Dean G, Rhodes S, Coad M, Whelan A, Cockle P, Clifford D, Hewinson R, Vordermeier H. Minimum Infective Dose of *Mycobacterium bovis* in Cattle. *Infect Immun* 2005; 73:6467-6471.
40. Grange, JM. Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Part I. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State University Press /ames. 1995. Pp 29-46.
41. Humblet M, Boschioli M, Saegerman C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res* 2009; 40:50.
42. Brosch R, Gordon SV, Marniesse M. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. SCI USA* 2002; 99:3684-3689.
43. Whelan AO, Coad M, Cockle PJ, Hewinson G, Vordermeier M, and Gordon SV. "Revisiting host preference in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: experimental infection shows *M. tuberculosis* H37Rv to be avirulent in cattle," *PLoS One*, vol. 5, no. 1, article e8527, 2010. Disponible: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0008527>
44. Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S. 2011. Tuberculosis immunity: Oportunities from studies with cattle. *Clin Dev Immunol.* Disponible: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2011/768542/>
45. Díaz, ACI. Regiones de diferencia en genomas de cepas de *Mycobacterium bovis* prevalentes en Chile. Tesis de grado para optar el grado de Licenciado en Bioquímica y Título Profesional de Bioquímico. Valdivia-Chile. 2013.
46. Brosch R, Gordon S. V, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C, Barrell, BG, Cole ST. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Bacterial Artificial Chromosome Library for Genome Mapping, Sequencing, and Comparative Genomics. *Infection and Immunity* (1998): 66, 2221–2229.

47. Parsons LM; Brosch R; Cole ST; Somoskövi A; Loder A; Bretzel G; Soolingen D; Hale YM; Salfinger M. 2002. Rapid and simple approach for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2339–2345. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120548/>
48. Das S; Chandra DS; Verma R. Occurrence of RD9 Region and 500 bp fragment among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Microbiol. Immunol.*, 51(2), 231–234, 2007.
49. Mahairas, GG., Sabo P. J., Hickey MJ., Singh DC., and Stover CK. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* 178:1274–1282.
50. Ganguly N, Siddiqui I and Sharma P. “Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence,” *Tuberculosis*, vol. 88, no. 6, pp. 510–517, 2008.
51. de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM. “ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity,” *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 16, pp. 6028–6034, 2007. Disponible: <http://jb.asm.org/content/189/16/6028>
52. Francis J, Eilis RJ, Wlilkie YW, O’Boyle D, Lurnsden MJ, et al. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and another tuberculins. *Vet. Rec.* 103: 420-425.
53. Ozyigit M, Senturk S, Akkoc A. Suspected congenital generalised tuberculosis in a newborn calf. *Vet Rec* 2007; 160:307-308.
54. Palmer, MV, Waters, WR, Whipple, DL. 2003. Aerosol exposure of whitetailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis* 39:817-23.
55. Williams R and Hoy W. Viability of *B. tuberculosis* (bovinus) on pasture land, in stored faeces and in liquid manure. *J Hyg* 2000; 30:413-419.
56. Neill S, Cassidy J, Hanna J, Mackie D, Pollock J, Clements A, Walton E, Bryson D. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test negative cattle using an assay for bovine interferon-gamma. *Vet Rec* 1994; 135:134-5.
57. Millian A, Rushton S, Shirley M, Murray A, Smith G, Delahay R, McDonald R. Farm-scale risk factors for bovine tuberculosis incidence in cattle herds during the Randomized Badger Culling Trial. *Epidemiol Infect* 2011; 25:1-12.
58. Cook A, Tuchili L, Buve A, Foster S, Godfrey-Faussett P, Pandey G, McAdam K. Human and bovine tuberculosis in the Monze district of Zambia: a cross-sectional study. *Br Vet J* 1996; 152:37-46.
59. Costello E, Doherty M, Monaghan M, Quigley F, O’Reilly P. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J* 1998; 155:245-250.
60. Griffin J, Hahsey T, Lynch K, Salman M, McCarthy J, Hurley T. The association of cattle husbandry practices, environmental factors, and farmers characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy cattle in Republic of Ireland. *Prev Vet Med* 1993; 17:145-160.
61. Menzies F, Neill S. Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *Vet J* 2000; 160:92-106.

62. Kazwala R, Kambarage D, Daborn C, Nyange J, Jiwa S, Sharp J. Risk factors associated with the occurrence of bovine tuberculosis in cattle in Southern Highlands of Tanzania. *Vet Res Commun* 2001; 25:609-622.
63. Ameni G, Aseffa A, Engers H, Young D, Gordon S, Hewinson G, Vordermeier M. High prevalence and increased severity of pathology of bovine tuberculosis in Holsteins compared to zebu breeds under field cattle husbandry in central Ethiopia. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14:1356-1361.
64. Espejo G. Análisis Epidemiológico de Tuberculosis en Rebaños Lecheros de Chile (Regiones de Valparaíso, de O' Higgins, del Maule y Región Metropolitana) 2004.
65. Dannenberg Jr, AM. 1993, Delayed type hypersensitivity and cell mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today*. 12: 228-232.
66. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology* 12, 352-366 (May 2012) Disponible: <http://www.nature.com/nri/journal/v12/n5/full/nri3211.html>
67. Arráiz NR., Romay BZ. y Faría MN. 2007. Evaluación de un ensayo de RPC múltiple para diferenciar micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en un laboratorio de referencia. *Rev Chil Infect*; 24 (2): 99-105
68. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L, Novoa C. Tuberculosis respiratoria en bóvidos. *Formación Continua en Veterinaria*. 1996:1(4): 3-13.
69. McNeil MR, Brennan PJ. 1991. Structure, function and biogénesis 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.
70. Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P y Araujo Z. Respuesta de inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar. Revisión. Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. *Invest. clín* v.46 n.4 Maracaibo dic. 2005. Disponible: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0535-51332005000400009](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332005000400009)
71. Yseel H, de Wall Malefyt R, Roncarolo MG, Abrans JS, Lahesmaa R. 1992. IL-10 is produced by subsets of humans CD4 T cell clones and peripheral blood T cells. *J. Immunol*. 149: 2378-2384.
72. Johnson CM, Cooper A, Frank AA, Orme IM. 1998. Adequate expression of protective immunity in absence of granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice with a disruption in the intracellular adhesion molecule 1 gene. *Infect. Immun*. 66: 1666-1670.
73. Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Disponible: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4874790&fecha=08/03/1996](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4874790&fecha=08/03/1996)
74. Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Austr Vet J*. 69: 1-4.
75. Luque, CJ, Herráez SA. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. ELSEVIER SCIENCE. España, 2002. Pp: 190-199.

76. Talbot EA, Williams DL, and Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J. Clin. Microbiol. 1997;35:566-569. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229628/pdf/350566.pdf>
77. Rodríguez HE, Pizano MOE, Milián SF, Cantó AGJ, Anaya EAM, Rubio VY, Nava VA. Manual de procedimientos para la identificación molecular y genotipificación de *M. bovis*. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. México, 2014.
78. Balandrano, CS, Anzaldo FG, Peña FGP, Betancurt MX. 1996. Tuberculosis: Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR., México. Pp 100-145.
79. Espinoza OA, Alvarez MA, Del Valle M, Chauvete M. La economía de los sistemas campesinos de producción de leche en el Estado de México. Téc Pecu Méx 2005; 43(1):39-56.
80. Sánchez AC. ¿Vacuna BCG contra la Tb en ganado lechero? AMVEB Laguna. Enero 2015. Disponible: <http://www.agromeat.com/160991/vacuna-bcg-contra-la-tb-en-ganado-lechero>
81. Rendón AH, Ríos TJJ, Cezares SS, Amarrillas BLA, Molina BCE, Ochoa RLA, Velarde FJS. 2008. Detección de *Mycobacterium tuberculosis* basada en una prueba de ADN. Sociedad Médica del Hospital General de Culiacán “Dr. Bernardo J. Gastélum” Vol.II No.3 p.99-102.
82. Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenber D. 2008. Diagnóstico Microbiológico. Micobacterias. 6° edición. Editorial Panamericana. Pp 403-424.
83. Rojas HAR., González FT. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de polimerasa. Vol 31 No 2 pp 69-76.