

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TÍTULO

Implementación de la prueba de PCR para el diagnóstico de tuberculosis en tejidos de bovinos infectados.

POR

MARTHA MARCELA GARZA FRANCO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO  
DE QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., A  
OCTUBRE DEL 2001

TL  
SF967  
.T8  
G37  
c.1



1080117232

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TITULO

Implementación de la prueba de PCR para el diagnóstico de tuberculosis en tejidos de pulmón de bovinos infectados.

POR

MARTHA MARCELA GARZA FRANCO

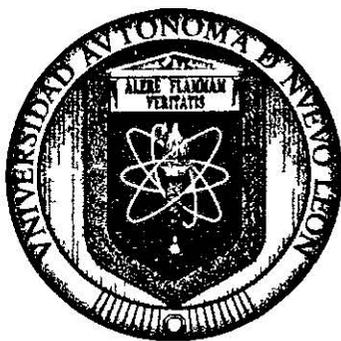
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE QUÍMICO BACTERIOLOGO PARASITOLOGO

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

OCTUBRE DE 2001

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L., A  
OCTUBRE DEL 2001.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TITULO**

**Implementación de la prueba de PCR para el diagnóstico de  
tuberculosis en tejidos de bovinos infectados.**

**POR**

**MARTHA MARCELA GARZA FRANCO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR EL GRADO DE QUÍMICO  
BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.**

**OCTUBRE DE 2001**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Implementación de la prueba de PCR para el diagnóstico de  
tuberculosis en tejidos de bovinos infectados.**

COMISIÓN DE EXAMEN

**Dr. Luis J. Galán Wong**  
PRESIDENTE

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Luis J. Galán Wong", written over a horizontal line.

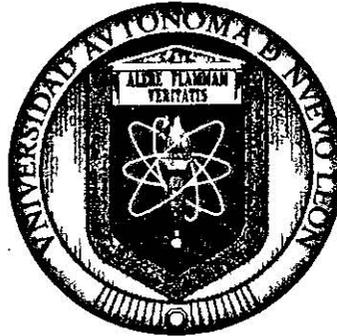
**Dra. Katiushka Arevalo Niño**  
SECRETARIO

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Katiushka Arevalo Niño", written over a horizontal line.

**Dra. Lilia H. Morales Ramos .**  
VOCAL

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Lilia H. Morales Ramos", written over a horizontal line.

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Implementación de la prueba de PCR para el diagnóstico de  
tuberculosis en tejidos de bovinos infectados.**

COMISIÓN DE APROBACIÓN DE TESIS:

**Dr. Alberto Morales Loredo**  
Director de Tesis

**MC. Irma O. Martínez Vázquez**  
Director de Tesis

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N. L.

OCTUBRE DEL 2001

# ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	I
DEDICATORIA .....	IV
AGRADECIMIENTOS .....	V
ÁREA DE TRABAJO .....	VI
LISTA DE FIGURAS .....	VII
LISTA DE TABLAS .....	VIII
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA .....	IX

## Capítulo 1.

### INTRODUCCIÓN

1.1. Hipótesis .....	2
1.2. Objetivos. ....	2

## Capítulo 2.

### ANTECEDENTES

2.1. Características generales del género <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
2.2. Modo de transmisión de la tuberculosis .....	4
2.3. Patogénesis de la infección causada por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
2.3.1. Definición. ....	6
2.3.2. Patogenia .....	6
2.3.3. Periodo Primario ó tuberculosis primaria .....	6
2.3.4. Periodo posprimario ó tuberculosis secundaria.....	8
2.4. Inmunopatogenia .....	8
2.5. Pérdidas económicas.....	10
2.6. Importancia de tuberculosis bovina en hombre.....	12

2.7. Control y Erradicación de la tuberculosis .....	12
2.8. Métodos de diagnóstico de la tuberculosis en animales. ....	14
2.8.1 Diagnóstico Clínico .....	14
2.8.2 Pruebas oficiales.....	15
2.8.3. Métodos Moleculares .....	17

### Capítulo 3.

#### **METODOLOGÍA**

3.1. Material biológico .....	20
3.2. Selección de iniciadores y análisis con secuencias reportadas en bancos de genes .....	20
3.3. Simulaciones de PCR mediante el programa Amplify 1.2 .....	20
3.4. Extracción de DNA de cepas de referencia .....	20
3.5. Extracción de DNA a partir de tejido embebido en parafina .....	21
3.5.1. Método de extracto crudo .....	21
3.5.2. Método Fenol-Cloroformo .....	21
3.6. Reacciones de PCR.....	22
3.7. Electroforesis en geles de agarosa.....	23

### Capítulo 4.

#### **RESULTADOS**

4.1. Selección de iniciadores y análisis con secuencias reportadas en bancos de genes. ....	24
4.2. Simulación de PCR.....	25
4.3. Obtención de DNA de cepa y tejido .....	26
4.4. Reacción de PCR.....	27

Capítulo 5.

**CONCLUSIONES** ..... 33

**LITERATURA CITADA** ..... 34

## **DEDICATORIA**

**A TI SEÑOR. GRACIAS.**

**A MIS PADRES SR. REYNALDO GARZA Y SRA. MARTHA FRANCO LES AGRADEZCO EL ESFUERZO Y APOYO QUE ME BRINDARON PARA OBTENER UNA CARRERA PROFESIONAL. LOS QUIERO.**

**A MIS HERMANOS POR SU COMPAÑÍA.**

**REYNALDO**

**IDIRA**

**JORGE, SU ESPOSA LULY Y A LA PEQUEÑA SOFI.**

**A GUILLERMO CON CARÍÑO.**

**A TODA MI FAMILIA, TÍOS, TÍAS, PRIMOS, PRIMAS ETC. POR SU HOSPITALIDAD Y AMISTAD. GRACIAS**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **M.C. Irma Olivia Martínez Vázquez** por haberme brindado el apoyo y la oportunidad de realizar este proyecto. Por su paciencia y compartir siempre sus conocimientos. Gracias.

A el **Dr. Alberto Morales Loredo** le agradezco mucho la asesoría, ayuda y tiempo dedicado a este trabajo.

A el **Ing. José G. Muraira Gutiérrez** le agradezco el apoyo brindado así como la oportunidad de haber formado parte del Laboratorio del CFPPNL.

A el **Dr. Luis J. Galán Wong** a quien admiro por ser una persona de constante trabajo y éxitos. Gracias por su apoyo.

A la **Dra. Lilia H. Morales Ramos, Dra. Katiushka Arévalo Niño y Dr. Hugo A. Luna Olvera** por formar parte de la comisión de comité.

A mis amigos de laboratorio **Janet Burguete, Nelly González, Laura Hernández, Itza Luna, Víctor Bermúdez y Moisés Franco**. Les agradezco la amistad y el apoyo.

Se agradece el financiamiento recibido por parte de la **Fundación Produce Nuevo León, A.C. y SIREYES-CONACyT**. Además al **INIFAP y CFPPNL** por las facilidades otorgadas en la realización de la tesis.

**A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL COMITÉ LES AGRADEZCO LA AYUDA BRINDADA.**

## **ÁREA DE TRABAJO**

**ESTA INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL COMITÉ PARA EL FOMENTO Y PROTECCIÓN PECUARIA DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN. (CFPPNL) UBICADO EN LOS TERRENOS DE LA EXPOSICIÓN GANADERA EN CIUDAD GUADALUPE NUEVO LEÓN**

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Simulación de PCR mediante el programa Amplify 1.2.....	24
Figura 2. Simulación del PCR mediante el programa Amplify 1.2.....	25
Figura 3. Amplificaciones de cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> (AN5).....	26
Figura 4. Electroforesis de productos de PCRs con iniciadores de Miller y cols., en gel de poliacrilamida al 12 %.....	28
Figura 5. Electroforesis de productos de PCRs con iniciadores de Wilson y cols., en gel de agarosa al 1.5 %.....	29

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Resultados (%) de las pruebas utilizadas para diagnóstico de tuberculosis (80 muestras) .....	30
Tabla 2. Sensibilidad (%) del PCR con respecto a histopatología y aislamiento 12 % .....	32
Tabla 3. Resultados (%) de aislamiento y PCR de las muestras sugestivas en histopatología .....	32

## LISTA DE ABREVIATURA

cm	Centímetros
cols.,	Y colaboradores
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dNTPs	Desoxinucleósidos trifosfatados
<i>et al.</i> ,	Y colaboradores
g	Gramos.
GIBCO	Grand Island Biological Company
h	Horas
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.
M	Concentración molar
m	Marcador de peso molecular
mA	Miliamperios
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Concentración milimolar
ng	Nanogramos
NL	Nuevo León
°C	Grados celsius
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
pH	Potencial hidrógeno
pmol	Picomoles
rpm	Revoluciones por minuto
SAGAR	Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
seg	Segundos
SEVAG	Mezcla de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 v/v.
sp.	Especie
spp.	Especies
<i>Taq</i>	Enzima que polimerisa DNA proviene de <i>Thermus aquaticus</i>
TB 294	Iniciador Externo
TB 850	Iniciador Externo
TB 670	Iniciador Interno
TB 505	Iniciador Interno
TBE Buffer	Buffer tris-boratos-EDTA
TE Buffer	Buffer tris-EDTA
U	Unidades de actividad enzimática
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León.
V	Voltios
Vol	Volumen
µl	Microlitros.
%	Por ciento (medida de cantidad)

## Capítulo 1.

### 1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad de importancia en México en donde el agente causal más común en el ganado es *Mycobacterium bovis*. Esta enfermedad es producida por bacterias incluidas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual está formado por *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. bovis*. Aunque el hombre es el huésped natural de *M. tuberculosis* y los bovinos de *M. bovis*, cuando éste último se transmite accidentalmente al hombre es tan patógeno como *M. tuberculosis*, por lo cual la tuberculosis es considerada una zoonosis.

En los animales la tuberculosis provoca pérdida crónica de peso, fiebres fluctuantes y disminución en la producción de leche hasta en un 17%. Esta es una enfermedad crónica infecciosa que se caracteriza por la formación de pequeños nódulos no vasculares (tubérculos) en distintos órganos del animal. Se encuentra con mayor frecuencia en los pulmones, pleura, hígado, bazo, peritoneo y ganglios linfáticos regionales.

La enfermedad afecta a los animales en diferentes zonas del país, por lo tanto, se restringe la movilización (traslado de animales, productos o subproductos de un animal de un lugar a otro), la comercialización y/o exportación de bovinos que no tengan por lo menos una prueba oficial vigente negativa a tuberculosis. Por lo anterior se han implementado campañas nacionales que ayudan al control y erradicación de esta zoonosis, como lo indica la Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO).

Para diagnóstico de la tuberculosis en bovinos, se utiliza la tuberculina como prueba oficial, la cual tiene una sensibilidad del 72% y puede dar falsos positivos debido a reacciones antigénicas cruzadas con otras micobacterias. El aislamiento del agente etiológico es una prueba confirmatoria, pero éste es un

proceso largo, pues se trata de un microorganismo que crece lentamente y puede requerir semanas o meses para que sus colonias sean notorias. Debido a las limitaciones que presentan los métodos de diagnóstico para tuberculosis actualmente utilizados, existe la necesidad de incorporar nuevos métodos que permitan mejorar la sensibilidad, especificidad y rapidez del diagnóstico. Una alternativa es el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante la cual se puede detectar de manera específica en sólo unas horas el DNA del organismo a identificar. De esta manera se obtendrá un diagnóstico específico y temprano, el cual permitirá iniciar acciones fundamentales en los programas de prevención y control de esta enfermedad.

Por todo lo anteriormente descrito se planteó la siguiente hipótesis y objetivos.

### **1.1. HIPÓTESIS**

La prueba de PCR permitirá detectar organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejidos infectados, con mayor rapidez y sensibilidad que las pruebas oficiales actuales.

### **1.2. OBJETIVOS**

1. Estandarizar la técnica de PCR para la detección de especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejidos infectados embebidos en parafina.
2. Comparar la sensibilidad de la prueba de PCR con respecto a la histopatología y el aislamiento microbiológico establecidos en la Norma Oficial Mexicana.

## Capítulo 2.

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1. Características generales del género *Mycobacterium*

*M. tuberculosis* y *M. bovis* pertenecen al orden de los *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*. Actualmente se considera a *M. tuberculosis* como un complejo que incluye las especies *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. microti* y *M. africanum*, causantes de tuberculosis.

El complejo *M. tuberculosis* está conformado por micobacterias no fotocromógenas de crecimiento lento. Estos organismos causan una enfermedad similar caracterizada por la formación de granulomas. *M. tuberculosis* afecta al hombre y tiene una distribución mundial, en cambio *M. bovis* causa tuberculosis en el ganado, primates, gatos, cerdos y cotorros; en humanos causa un padecimiento que es indistinguible del que ocasiona *M. tuberculosis*. *M. africanum* causa tuberculosis en bovinos y humanos en gran parte del continente Africano (1, 2). *M. microti*, produce una tuberculosis generalizada en aves de rapiña y lesiones localizadas en cobayos, conejos y becerros. La diferenciación de estos microorganismos se basa en algunas pruebas fisiológicas y pruebas bioquímicas (3).

En la actualidad se conocen más de 50 especies micobacterias "atípicas" para lo cual en 1959 Runyon sugirió una clasificación en cuatro grupos basada en la velocidad de su desarrollo y pigmentación. Dentro de estos cuatro grupos no se incluyen las especies típicas y las no cultivables: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. lepraemurium*, *M. microti* y *M. paratuberculosis* (4, 5).

Los bacilos son ácido-resistentes, no formadores de esporas y sin cápsula. Con la tinción de Ziehl-Neelsen los bacilos aparecen como bastones de color rojo brillante contra un fondo azul. Poseen una gruesa pared celular de

naturaleza lipídica, compuesta de peptidoglicanos, glicolípidos y ácido micólico. La propiedad hidrofóbica de la pared, le otorga permeabilidad restringida, gran resistencia a agentes antibióticos, a muchos desinfectantes y también a colorantes de laboratorios como los de Gram y Giemsa. Una vez teñidos, los bacilos se muestran resistentes a la decoloración con soluciones ácidas, de ahí el nombre o calificativo de ácido-resistentes (4, 5). En una coloración de Gram, las micobacterias pueden ser confundidos con actinomicetes aerobios o corinebacterias ya que posee una pared celular lipídica. Puesto que la pared celular micobacteriana es compleja y estos microorganismos son delicados, la mayoría de las micobacterias crecen con lentitud y se dividen de 12 a 24 h (6).

Hace mas de 100 años, Robert Koch describió con brillante precisión la etiología de la tuberculosis, así como la metodología básica para el aislamiento del bacilo tuberculoso, sin embargo en nuestro país esta enfermedad es todavía un grave problema de salud pública veterinaria, por lo que es necesario insistir en el reforzamiento de los conocimientos que son indispensables para su control y eventual erradicación (7, 8).

## **2.2. Modo de transmisión de la tuberculosis.**

La tuberculosis parece no afectar poblaciones de animales salvajes, mientras no existan contactos con el ganado bovino o con el hombre. La transmisión del bacilo entre los bovinos se hace fundamentalmente por vía respiratoria, al igual que en el hombre. La prueba de ello es que la mayor parte de las lesiones observables en ganado bovino en mataderos, se hallan en ganglios del tracto respiratorio y en el parénquima pulmonar (9, 10).

La vía aerógena es la principal vía de contagio del 80 al 90% de los casos es por medio de secreciones nasofaríngeas. Al mugir el bovino elimina microgotas con aproximadamente 100 a 200 bacilos, al estornudar o toser produce pequeñas microgotas. La vía digestiva es la segunda vía de contagio entre 10 y 20% de los casos, ya sea al mamar el ternero de una vaca

tuberculosa, del suelo, pasto o aguas contaminadas con el bacilo por heces u orines infectados. Existen otras vías de transmisión de menor importancia que la respiratoria y digestiva, que hay que tener en cuenta, como la vía genital en la cual los toros se enferman por contacto sexual con vacas con metritis tuberculosa. La transmisión más importante se produce por medio de la inseminación artificial al utilizar semen de toros infectados. También por heridas por introducción del bacilo en lesiones de piel con material infectado.

Los animales jóvenes son más propensos a adquirir la infección y las hembras por factores estresantes como la preñez avanzada, parición y alta producción lechera. Cuando se intensifica la producción ganadera, aumenta la densidad de la población en los establecimientos, por consiguiente la tuberculosis se expande con mayor rapidez. Esto ocurre especialmente en el ganado lechero, donde el riesgo de infectarse y enfermarse se aumenta con la vida útil y con el estrés productivo. Por lo tanto, en ausencia de medidas de control sanitario, o cuando éstas son inadecuadas, la mayor incidencia de tuberculosis se encuentra en el ganado lechero. Además, la concentración en áreas tales como fuentes de agua, transportes, ferias y mercados (comercialización intensiva), aumentan la probabilidad de transmisión respiratoria de la tuberculosis en todo el ganado (11, 12).

Vale decir, que el avance de la industria ganadera, si no va unida a medidas sanitarias, puede tener resultados explosivos. La infección tuberculosa, que en condiciones de ganadería extensiva, se mantiene aparentemente estable (avanzando lentamente) durante décadas, adquiere una nueva dinámica al industrializarse la producción. Se impone entonces la necesidad de implementar un programa de control y erradicación de la tuberculosis, con las estrategias que ya han probado su eficacia en los países más desarrollados (11).

## **2.3. Patogénesis de la infección causada por *M. tuberculosis***

### **2.3.1. Definición**

Es una enfermedad de transmisión directa e indirecta, febril, de curso típicamente crónico, que afecta a todos los animales, incluido el hombre. Es producida principalmente por *M. tuberculosis*, *M. bovis* y el complejo *M. avium* (constituido por las especies *M. avium*, *M. intracelulare* y *M. scrofulaceum*). Se caracteriza anatomopatológicamente por un granuloma específico con tendencia a la caseificación (13-15).

### **2.3.2. Patogenia**

Se trata de una enfermedad cíclica, que cumple su proceso evolutivo en distintos períodos, caracterizados por síntomas y lesiones propios para cada uno de ellos. La evolución de los mismo, está condicionada a diversos factores ligados al huésped (estado inmunitario, edad, nutrición, genética, etc.), al bacilo (número, virulencia, etc.) y al medio ambiente (15, 16).

### **2.3.3. Período primario o tuberculosis primaria**

El primer contacto del bacilo tuberculoso con un organismo virgen, origina una lesión inflamatoria inespecífica llamada "chancro de inoculación". Su localización dependerá de la puerta de entrada (generalmente respiratoria o digestiva). Los bacilos son transportados dentro de los macrófagos o libres por vía linfática a los nódulos linfáticos regionales, ocasionándoles una lesión del mismo tipo que la inicial (adenitis o linfagitis satélite). La asociación entre la lesión inicial en la puerta de entrada y el nódulo regional constituyen lo que se denomina "complejo primario". Este puede ser incompleto o disociado, cuando uno de los elementos está ausente o pasa desapercibido a la simple observación (15, 17).

El complejo primario puede evolucionar de diversas formas, una de ellas puede ser hacia la cura; esto sucede generalmente en el hombre, pudiendo

dejar o no cicatriz y es cuando se dice que hay cura bacteriológica. Otra es la estabilización (foco latente), en donde el proceso evolutivo puede detenerse y permanecer así durante meses, años e incluso durante toda la vida del individuo. Aquí no hay cura bacteriológica, ya que hay bacilos virulentos enquistados en las lesiones. Es necesario recordar que por diferentes circunstancias, puede producirse una reactivación de este proceso latente y evolucionar entonces hacia el período secundario o posprimario.

Se puede presentar también la generalización precoz inmediata, que es la forma resultante de la diseminación bacilar por vía linfática o hemática a todo el organismo, produciendo lesiones tuberculosas en diversos órganos, siendo la lesión en los nódulos linfáticos una constante. A su vez, este período de generalización precoz inmediata, según diversos factores (estado de resistencia, especie, etc.) puede manifestarse de dos maneras:

a) Generalización precoz aguda: se presenta cuando la resistencia es baja, la diseminación del bacilo se hace así simultáneamente en diversos órganos dando lugar a lesiones uniformes (con el mismo estado evolutivo). Son típicas las lesiones de tuberculosis miliar aguda (pequeños tubérculos, grises o amarillos similares a los granos de mijo). Se presentan en forma más común en pulmón, o en otros órganos. También puede haber lesiones exudativas (neumonía, meningitis), con desenlace fatal. Esta es la forma más común en carnívoros, aves y equinos.

b) Generalización precoz moderada o lenta: se manifiesta cuando hay resistencia parcial, la diseminación linfohemática es de pocos bacilos y se realiza en forma de sucesivas oleadas, dando origen a lesiones polimórficas en diversos órganos (nodulares, caseocalcáreas, fibrosas, exudativas, etc.). Son típicas la "tuberculosis nodular", la "tuberculosis perlada" (lesiones nacaradas, nodulares, pedunculadas, del tamaño de lentejas o garbanzos en pleura

parietal o visceral). Esta forma puede estabilizarse o evolucionar hacia un período secundario o posprimario (en bovinos y cerdos) (2, 14, 15, 18).

#### **2.3.4. Período posprimario o tuberculosis secundaria**

Este período representa la evolución de formas estabilizadas del período primario. Se observa generalmente en bovinos y cerdos. La diseminación del bacilo es por vía canalicular (bronquios y bronquiolos en pulmón, túbulos renales en riñón, conductos galactóforos en glándula mamaria, etc.). Las lesiones asientan en un sólo órgano (aquel lesionado en el período primario), razón por la cual se denomina "tuberculosis crónica de órgano". Son características las lesiones caseosas o las reblandecidas, con formación de úlceras y nódulos.

En el hombre se producen también cavernas en este período. Los nódulos satélite no están comprometidos. Esta forma puede estabilizarse, sin compromiso inmediato de la vida del sujeto. Pero como consecuencia de la pérdida total de la resistencia (estrés, nutrición, lactancia, enfermedad, etc.) puede evolucionar hacia una generalización aguda tardía, diseminándose el bacilo por vía linfohemática, con compromiso de los nódulos regionales. Son características la "tuberculosis miliar tardía" y la "tuberculosis acinosa galopante", con la consecuente muerte del animal (14, 15, 19, 20).

#### **2.4. Inmunopatogenia**

La llegada de los bacilos tuberculosos por inhalación a los alvéolos pulmonares producen una reacción inflamatoria inespecífica. Los macrófagos alveolares fagocitan y destruyen a la mayor parte de los bacilos, transportándolos eventualmente a los nódulos regionales. Los microorganismos que sobreviven, se multiplican intracelularmente en forma logarítmica en macrófagos reclutados del torrente sanguíneo y los destruyen. Liberados nuevamente, atraen por mecanismos quimiotácticos a monocitos y macrófagos, formándose un

"tubérculo primario" inicial. Entre la segunda y tercer semana, el tubérculo presenta un pequeño centro caseoso necrótico (formado por la destrucción de los macrófagos cargados de bacilos), con acumulación de macrófagos parcialmente activos. A partir de la tercer semana empiezan a ponerse en marcha los mecanismos de inmunidad mediada por células y de hipersensibilidad retardada (15, 16, 21).

En los nódulos linfáticos, los macrófagos infectados hacen la presentación de los antígenos que tienen las micobacterias a los linfocitos T. Estos linfocitos tienen receptores en sus membranas, algunos de los cuales pueden corresponderse con la configuración molecular de algún antígeno del bacilo. Cuando esto ocurre, el linfocito T se activa y libera una serie de mediadores y linfoquinas (entre ellas la interleucina 2) que atraen, sensibilizan y activan a numerosos linfocitos T, los que ahora serán reconocedores específicos del mismo antígeno. Todos ellos liberan una serie de sustancias de actividad biológica que ejercen una acción sobre los macrófagos, activándolos, aglutinándolos y transformándolos en potentes agentes contra los bacilos tuberculosos.

Estos macrófagos activados, disponen de una maquinaria de síntesis que les permite producir enzimas proteolíticas capaces de provocar la destrucción intracelular de los bacilos. Por lo tanto, los macrófagos son por una parte inductores de la respuesta inmune, al presentar los antígenos a los linfocitos T y efectores de la inmunidad retardada al ser activados por las linfoquinas liberadas por esos mismos linfocitos T (14, 15, 22).

Puede suceder que los bacilos dentro de los macrófagos sean demasiado numerosos como para ser destruidos por el proceso de inmunidad celular, o éste demore, o sea frenado por los factores supresores de la inmunidad. Entonces el proceso de hipersensibilidad puede irrumpir el

crecimiento logarítmico de los microorganismos, al destruir los macrófagos cargados de bacilos. Esto da lugar al centro caseoso del tubérculo, que aumenta de tamaño produciendo la consecuente destrucción tisular. Este centro caseoso sólido, carece de oxígeno, su pH es ácido y no es apto para la multiplicación de los bacilos. En este tejido, algunos bacilos se destruyen y otros permanecen con vida latente durante años (15, 17, 23).

Afortunadamente, el cociente entre inmunidad celular (macrófagos activados) e hipersensibilidad retardada (necrosis caseosa) es superior en animales resistentes que en aquellos estresados, con alguna enfermedad recurrente, mala nutrición o edad extrema. Sin embargo, en ciertas ocasiones la hipersensibilidad retardada se asocia a la licuefacción del foco caseoso (pudiendo también estar implicada la inmunidad celular), mediante el cual el organismo intenta desembarazarse de tejidos muertos liberando enzimas proteolíticas que licuan es el foco caseoso. En este material líquido, los bacilos vuelven a encontrar un ambiente favorable y se multiplican activamente por primera vez a nivel extracelular. La elevada dosis resultante de antígenos bacilares, da lugar a una intensa destrucción tisular secundaria a la hipersensibilidad retardada. Se producen erosiones, que en el caso de la vía de entrada respiratoria, aparecen en los bronquiolos adyacentes, seguidas por la formación de cavidades. Se diseminan así, a través del árbol bronquial, a otras zonas pulmonares, o al ambiente exterior, constituyendo una fuente de infección para otros animales (14, 15, 20, 22, 24).

## **2.5. Pérdidas económicas**

La tuberculosis bovina (TB) causa pérdidas a la ganadería debido a la disminución de carne y leche y al sacrificio de animales infectados. Además de constituir una barrera para la exportación de ganado en pie, se considera también una zoonosis ya que *Mycobacterium bovis*, el microorganismo causante de esta enfermedad puede infectar al hombre. La prevalencia de

tuberculosis en la parte norte de México, se ha estimado en 2.1% para el ganado lechero y en 0.1% para el ganado de carne. En la zona centro y sur de México, estos valores son mas elevados, en estas regiones se han detectado establos lecheros con prevalencias mayores de 25% de tuberculosis (25, 26).

De acuerdo a diferentes estudios, la producción de leche disminuye en una vaca tuberculosa, en promedio, entre 10 y 18% con respecto al animal sano. El promedio de 270 días en la primera lactancia se reduce a la mitad en la séptima lactancia (131 días). La esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre el 5 y 10% y en consêcuencia se producen menos terneros (27, 28).

Los animales con tuberculosis ganan menos peso a lo largo de su vida y ello puede significar una pérdida del 15% en la tasa de conversión alimentaría. Hay mayores costos de reemplazo por año de producción, debiéndose contabilizar las diferencias entre el valor global de un animal productivo y su precio en carne (27, 28).

Las pérdidas por decomisos en mataderos, debidos a lesiones macroscópicamente semejantes a tuberculosis, se calculan por el porcentaje de animales que sufren decomisos parciales y totales. Un estudio realizado en los Estados Unidos de Norteamérica reportó la identificación de mycobacterias en 1,300 canales por medio del diagnóstico del laboratorio en lesiones sospechosas remitidas del ganado inspeccionado al sacrificio. La pérdida de acuerdo a este reporte ascendió a \$ 1,300,000.00 dólares durante los 10 últimos años. Cuando la sensibilidad diagnóstica de la inspección veterinaria es alta, como ocurre generalmente en los países exportadores de carne y hay tuberculosis endémica, esos porcentajes pueden alcanzar un 5% global (26-28, 29, 30).

Las consecuencias sobre el comercio nacional e internacional de ganado y de sus productos es evidente e importante para los países productores-exportadores. Hay un descrédito y las barreras sanitarias comerciales son fácilmente impuestas (30-33).

## **2.6. Importancia de la tuberculosis bovina en el hombre**

*M. bovis* es responsable de un porcentaje de los casos de tuberculosis humana en los países con infección en su ganado, que varía con la aplicación de medidas higiénico sanitarias de protección, tales como la pasteurización de la leche y el control del trabajador expuesto. No obstante, entre un 2 y 8 % de los casos humanos de tuberculosis son debidos al bacilo bovino en estos países (34).

Se estima que en América Latina y el Caribe se producen unos 340,000 casos nuevos de tuberculosis cada año, por lo tanto entre 7,000 y hasta 27,000 de ellos podrían ser debidos a *M. bovis*. Esto ubica a la tuberculosis bovina entre las zoonosis más importantes del hemisferio. Es cierto que con los actuales esquemas de tratamiento, salvo en los casos de multi-resistencia, la tuberculosis se puede curar, ya sea debida a *M. tuberculosis* o a *M. bovis* (32). Sin embargo, también es cierto que, si no se erradica la tuberculosis bovina, ésta se mantiene como una fuente constante de infección para el hombre, aún cuando las medidas de control de la tuberculosis en salud pública hayan logrado éxito. El objetivo de eliminación de la TB en el hombre no es factible, si no se erradica también la tuberculosis bovina (32).

## **2.7. Control y erradicación de la tuberculosis**

Para lograr la acreditación de un país como libre de TB bovina, es necesario que la inmensa mayoría de los productores estén convencidos de la conveniencia y necesidad de erradicar. Existen normas y guías publicadas por Organismos Públicos de Salud (OPS), Organización Mundial de la Salud (OMS) y Oficina Internacional de Epizotias (OIE), que se basan en la

experiencia de los países que han logrado erradicar la tuberculosis bovina y en los que las ventajas obtenidas por esa erradicación han sido bien comprobadas (30, 33, 35, 36).

En México, la Secretaría, de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) tiene como función fomentar la producción pecuaria y consecuentemente cuidar la prevención, control y erradicación de las plagas y enfermedades que como la tuberculosis afectan a la ganadería nacional tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos. Por lo que es necesario mantener un control estricto sobre la tuberculosis bovina que permita a la ganadería nacional desarrollarse en mejores condiciones sanitarias así como mantener e incrementar la exportación de ganado bovino en pie hacia otros países, entre los que se encuentran Estados Unidos de América. Por lo que se estableció la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina (37).

Se han hecho predicciones basadas en modelos matemáticos que muestran que, con una "transmisión constante" (sin intensificación de la producción) en un país cuya prevalencia de infección por tuberculosis en el ganado fuera inicialmente 3%, ésta llegaría a 5% en unos 25 años. Pero con la intensificación del sector lechero, mejora genética, creciente concentración y tamaño de los rodeos, se aumentan la susceptibilidad y el riesgo a 30% (10 veces más que la inicial) en el mismo período de 25 años. Es cierto que las variaciones climáticas y el peso relativo de la industria lechera en el conjunto de la producción, entre otras causas, influyen en el intervalo de variación de estos porcentajes (28). En los Estados Unidos de América se consideraba, en los años 20, que si no se efectuaban intervenciones de control la prevalencia se duplicaría cada 30 años (11).

Las estrategias con las que se ha logrado el control y la erradicación de la tuberculosis en el ganado se basan en la prueba tuberculina, seguida del sacrificio de los animales reactivos positivos. En una primera etapa esos animales pueden ser separados, e inclusive organizarse "hatos sanitarios" con ellos, pero su destino final debe ser el sacrificio. Estas estrategias, cuando la prevalencia de infección de hatos es muy baja (menos de 1%), se reemplazan eficazmente por el rastreo desde mataderos, hasta los establecimientos de origen de los animales en los que se detectaron lesiones de tuberculosis. Esto exige la identificación de cada animal y una alta calidad en la inspección veterinaria (11, 12, 30, 31, 35).

Una vez localizado el hato de origen del animal o animales tuberculosos, éste es saneado y se prosigue el rastreo de otros hatos "contactos" a los que pudo haberse transmitido la infección, en los que se efectúan pruebas de tuberculina y saneamiento donde se localice infección. Otra medida de control incluye el comprar animales en establecimientos oficialmente libres de tuberculosis, separar las crías de las vacas positivas y suministrar calostro de vacas negativa, sustituto lácteo o leche en polvo. Controlar la introducción de animales al hato mediante la cuarentena (aislamiento) realizando en ella una prueba de tuberculina, separar en los establecimientos en saneamiento las distintas categorías de animales, separando las vaquillonas de las vacas viejas. Evitar el uso común de bebederos y comederos por animales enfermos y sanos (28, 33).

## **2.8. Métodos de diagnóstico de la tuberculosis en animales**

### **2.8.1. Diagnóstico clínico**

Todo animal que presenta enflaquecimiento progresivo debe despertar siempre sospecha de padecimiento de tuberculosis. La mayoría de las veces la tuberculosis bovina tiene un curso crónico y limitado al pulmón. En estos casos los animales presentan tos crónica, casi nunca fuerte, que suele presentarse

como uno o dos golpes, en forma apagada, húmeda, sin mucha fuerza y cada tanto expulsan con ella una secreción mucopurulenta. Suele presentarse fiebre, hay una disminución paulatina de la producción láctea en períodos avanzados de la enfermedad (15, 38).

Algunas vacas enfermas de tuberculosis presentan mastitis tuberculosa, la cual se caracteriza por un endurecimiento y una hinchazón que al principio se desarrolla en la parte superior de la ubre, observándose en ciertos casos los ganglios linfáticos mamarios duros y aumentados de volumen. Esta mastitis tuberculosa es de gran importancia, no solo por ser fuente de transmisión por medio de la leche al ternero, sino también para el hombre. Cuando los ganglios linfáticos afectados de tuberculosis comprimen el esófago, puede haber timpanismo y alteraciones en la rumia (38).

Tanto en las lesiones tuberculosas pleurales como en las pericárdias se pueden auscultar ruidos de frote. En la tuberculosis de localización abdominal no se producen grandes manifestaciones clínicas y pueden palparse por vía rectal las lesiones tuberculosas cuando asientan en los órganos genitales y en el intestino. Cuando la lesión asienta en el hígado o en el bazo puede haber un gran aumento de tamaño de estos órganos. Lo más fácilmente demostrable clínicamente es el compromiso de los ganglios linfáticos superficiales, que en este caso de estar afectados por tuberculosis pueden encontrarse aumentados en su tamaño hasta 20 veces (38).

### **2.8.2. Pruebas oficiales**

Las pruebas oficiales para la detección de la tuberculosis bovina en nuestro país son aquellas autorizadas por la SAGARPA establecidas en la (NOM-031-ZOO-1995) para la Campaña Nacional contra tuberculosis bovina. Oficio publicado en el Diario Oficial de la federación el 8 de marzo de 1996. Estas pruebas oficiales son: la prueba de la tuberculina, el estudio histopatológico y

el aislamiento microbiológico por cultivo (37).

La prueba de la tuberculina, incluye la prueba del pliegue caudal y la prueba cervical comparativa. La prueba caudal se aplica de rutina, quien la realiza es un médico veterinario capacitado y debe ser caracterizada por él mismo. Para efectuarla, se limpia la zona del pliegue caudal y se introduce la aguja en toda su longitud haciendo un ángulo de 45° y se aplica 1 ml del biológico intradermicamente, con lo cual aparece un abultamiento en el lugar de la aplicación. Esta prueba se emplea en hatos que estén en contacto con hatos infectados directa o indirectamente. La lectura se tomará en las siguientes 72 h. La prueba se considera negativa cuando no se palpa ni se ve abultamiento alguno en el sitio de la aplicación. Se toma como positiva cuando se ve o se toca algún engrosamiento, rubor, calor, ardor, dolor o necrosis. Un animal que da la prueba positiva se conoce como reactor (37).

Adicionalmente, se hace una prueba cervical comparativa en los animales reactivos 10 días después de la prueba caudal. Esta se realiza de forma similar, pero se aplica en el tercio medio superior del cuello inoculando 1 ml de Derivado Proteico Purificado bovino (DPP) y 1 ml de DPP aviar en dos puntos diferentes y la respuesta se mide a las 72 h con ayuda de un cutímetro para determinar el grosor de la reacción (37).

El cultivo consiste en sembrar el material sospechoso, previo sometimiento de éste a un proceso denominado homogenización sulfúrica, consistente en el molido de la muestra con ácido sulfúrico al 10 %, ácido oxálico al 5 % o bien por el método de Petroff (hidroxido de sodio al 4 %), para destruir los gérmenes contaminantes, centrifugar, neutralizar y sembrar el sedimento en medios especiales de Lowenstein-Jensen, Stonebrink, Dorset, Dubos, Sauton ó Middlebrook e incubar a 37 °C por un periodo máximo de 60 días. Las primeras observaciones deben hacerse a las 48 h, el desarrollo de

colonias antes de las 48 h es indicio de contaminación secundaria. Las observaciones posteriores se realizan semanalmente. El aspecto típico de las colonias se verifica de 15 a 30 días después de la siembra. Se observan opacas, redondeadas brillantes de color crema y de fácil desprendimiento en medio sólido, formando una película fina que luego se hace rugosa en medio líquido (15, 37).

El análisis directo consiste en realizar un extendido con el material sospechoso para realizar la coloración de Gram y Zhihl-Neelsen (Z-N) para bacterias ácido alcohol resistentes. El material para realizar este diagnóstico debe ser tomado de la parte mas joven del tubérculo o sea de la superficie interna de la cápsula, de este modo podrá verse por medio de la coloración de Gram, bacilos delgados en pareja o grupos pequeños Gram (+) de color azul y con la técnica de Zhihl-Neelsen se verán bacilos delgados ácido alcohol resistente de color rosado (15, 37).

Existen otras pruebas adicionales para el diagnóstico de la tuberculosis bovina como la prueba de detección de interferón gamma (gINF), el cual se eleva considerablemente en plasma en caso de una respuesta inmune mediada por células. Esta prueba se basa en la reacción del gINF con anticuerpos monoclonales marcados. También está la de ELISA en donde se puede investigar la presencia de antígenos ó anticuerpos en los animales afectados (26).

### **2.8.3. Métodos moleculares**

Debido a los inconvenientes que presentan las técnicas oficiales de identificación de las micobacterias, se han diseñado alternativas de diagnóstico, entre los que destacan los métodos moleculares. Diversos investigadores han utilizado la PCR para detectar la presencia de micobacterias en muestras de diferente origen, no sólo del complejo *M.*

*tuberculosis*, sino también otras de importancia médica o veterinaria. Se han utilizado como blanco para la amplificación, regiones específicas del cromosoma de estos microorganismos, entre las que se encuentran las secuencias de inserción IS6110, IS1081, genes que codifican proteínas como la MPB70 o MPB65 y se han empleado numerosos métodos para la extracción del DNA a partir de diferentes tipos de muestras.

Cousins y cols., en 1991, publicó una técnica de PCR capaz de detectar micobacterias del complejo *M. tuberculosis* mediante la amplificación de un segmento de 372 pares de bases (pb) del gene de la proteína MPB70 y obtuvo una reacción positiva con 84 cepas de *M. bovis* probadas y negativa con cepas de otras especies de micobacterias y de otros géneros bacterianos(39).

Wilson y cols., en 1993 probaron dos métodos de extracción de DNA a partir de muestras de esputo, además de probar la especificidad del PCR para la detección del complejo *M. tuberculosis* a partir de la secuencia de inserción IS6110. Compararon el método de detección con el cultivo y demostraron que el PCR tiene mayor especificidad, sensibilidad y rapidez que el cultivo y microscopía de rutina (40).

Wards y cols., en 1995 desarrollaron un PCR aplicable a muestras de tejido, amplificando un fragmento de 248 pb de la secuencia de inserción IS1081 y pudieron detectar hasta 10 organismos a partir de cultivos puros y de 200 a 500 bacterias a partir de tejidos inoculados en el laboratorio. Ellos encontraron una buena concordancia con el cultivo en muestras obtenidas de animales para el diagnóstico de tuberculosis(41).

Liébana y cols., en 1995 diseñaron otra técnica de PCR con la cual detectaron el 71% de los casos en cultivos positivos de hatos afectados y obtuvieron resultados negativos en animales provenientes de hatos libres los

cuales fueron también negativos por cultivo. Estos investigadores sugieren utilizar la PCR como prueba tamiz complementaria al diagnóstico bacteriológico de rutina (42).

Miller y cols., en 1997 reportaron el uso del PCR para amplificar un fragmento de 123 pb de la secuencia de inserción IS6110 que es común para el complejo *M. tuberculosis* en tejidos embebidos en parafina de bovinos y alces. En este estudio se observaron resultados positivos en 93% de los tejidos de casos de tuberculosis y negativos en 31 tejidos de animales con granulomas no tuberculosos o lesiones granulomatosas producidas por otras micobacterias como *M. paratuberculosis* y *M. avium* (43).

Otras técnicas moleculares hacen posible además la diferenciación entre cepas de *M. bovis* y *M. bovis*-BCG de otras micobacterias incluyendo *M. tuberculosis* y existen numerosos métodos para detectar bacterias del grupo de *M. tuberculosis* en cepas y muestras clínicas de humanos, las cuales podrían ser aplicadas al estudio del padecimiento en animales (44-46).

## Capítulo 3.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material biológico**

Se trabajó con tejidos de bovinos embebidos en parafina y diagnosticados por histopatología como negativos, positivos y/o presuntivos. Con diagnosticados por cultivo como negativos o positivos. Se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia de *M. bovis* AN5 y *M. tuberculosis* H37rv las cuales fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE).

#### **3.2. Selección de iniciadores y análisis de secuencias reportadas en bancos de genes para el complejo *M. Tuberculosis***

Se realizó una búsqueda de iniciadores reportados para amplificar secuencias del genoma del complejo *Mycobacterium*, se revisó en el Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina/Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica. Se analizaron también las secuencias reportadas para el complejo *Mycobacterium*.

#### **3.3. Simulaciones de PCR computacional mediante el programa Amplify 1.2**

Se realizaron las simulaciones de PCR con los iniciadores seleccionados y las secuencias para el complejo *M. tuberculosis*, utilizando el programa Amplify 1.2.

#### **3.4. Extracción de DNA de cepas de referencia**

A partir de crecimientos sobre agar, se realizaron las extracciones de DNA de cepas correspondientes al complejo *M. tuberculosis*, usando el método fenol-cloroformo adecuado por Martínez-Vázquez, 1997 (47), el cual incluye desnaturalización enzimática de proteínas y precipitación de impurezas con acetato de amonio.

### **3.5. Extracción de DNA a partir de tejido embebido en parafina**

Se utilizaron muestras de tejido embebidos en parafina, con lesiones características de organismos ácido alcohol resistentes. El DNA se obtuvo mediante el método de extracción de extracto crudo y el de fenol-cloroformo.

#### **3.5.1. Método de extracto crudo**

Para los tejidos embebidos en parafina se llevo acabo el método descrito por Miller y cols., 1997 (43). De cada tejido embebido en parafina se hizo un corte de 5 micras (0.1g) se pasaron los cortes a tubos eppendorf y se centrifugaron por 1 min a 10,000 rpm. Al tejido compactado se les agregó 200  $\mu$ l buffer conteniendo Tween 20 al 5 %. Posteriormente las muestras se pusieron a ebullición por 10 min pasándose inmediatamente a congelación en nitrógeno líquido. Este paso de ebullición congelación se repitió 2 veces más. Los tubos se centrifugaron 20 min a 7,000 rpm. Del sobrenadante se tomaron 7  $\mu$ l para la reacción de PCR.

#### **3.5.2. Método fenol-cloroformo**

Del tejido embebido en parafina se hicieron tres cortes de 5 micras cada uno, se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5  $\mu$ l de capacidad y se les agregó 200 $\mu$ l de buffer TE pH 8.0, posteriormente se colocaron en baño de agua a 70  $^{\circ}$ C por 10 min los cuales se agitaron por lo menos 2 veces durante el calentamiento. Se retiraron del agua hirviendo, se les dio un toque de centrifuga, para eliminar la parafina y el sobrenadante. Se repitieron estos dos pasos y al precipitado se le agregó 200 $\mu$ l de buffer de extracción (50 mM Tris HCl, EDTA pH 8.0 y Tween 20 al 0.5 %) y Proteinasa K (0.2 mg/ml). Se incubaron toda la noche a 42  $^{\circ}$ C y después se congelaron en etanol absoluto más hielo seco (CO<sub>2</sub>) o en nitrógeno líquido. Posteriormente se pusieron a hervir en agua durante 10 min. El tejido residual se colectó centrifugando a 7000 rpm por 10 min, los sobrenadantes se pasaron cada uno a su respectivo tubo limpio y se les agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico

(SEVAG), se homogeneizaron y centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio. Se le adicionó 0.6 volúmenes de isopropanol, se incubando a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por lo menos 2 h, después se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante, se agregó al tubo un mililitro de etanol 70 % frío y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. El DNA se resuspendió en  $50\text{ }\mu\text{l}$  de buffer TE pH 8.0 y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 3.6. Reacciones de PCR

Se utilizó el método descrito por Wilson y cols., 1993 (40), en el cual se utilizaron dos pares de iniciadores que reconocen la secuencia de inserción IS 6110 de organismos del complejo *M. tuberculosis*. En la primera reacción de PCR se utilizaron los iniciadores externos que amplifican un fragmento de 583 pb. En una segunda reacción utilizando como templado el producto de PCR de la reacción anterior y los iniciadores internos, se amplificó un fragmento de 183-202 pb.

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de  $25\text{ }\mu\text{l}$ , utilizando 25 pmoles de cada iniciador,  $200\text{ }\mu\text{M}$  de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL),  $1.0\text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1X de Buffer 10X ( $200\text{ mM}$  Tris-HCl pH 8.0  $500\text{ mM}$  KCl) y 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Promega) y  $7\text{ }\mu\text{l}$  del DNA templado (extracto crudo)

Las condiciones del PCR se llevaron a cabo en un termociclador marca Ericomp®. Las condiciones para los iniciadores externos fueron un ciclo 2 min/ $93\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido de 35 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a  $93\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 45 seg, alineamiento de iniciadores a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min y una extensión a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min, con una extensión final de 10 min/ $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizó la reacción de PCR para la amplificación con iniciadores internos en un volumen de  $25\text{ }\mu\text{l}$ , utilizando 25 pmoles de cada

iniciador, 200  $\mu$ M de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 1.0 mM de  $MgCl_2$ , 1X de Buffer 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.0 500 mM KCl), 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Promega) y 5  $\mu$ l de producto de PCR de iniciadores externos.

Las condiciones para la amplificación con iniciadores internos fueron: desnaturalización inicial de 93 °C/2 min seguido de 50 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 93 °C/45 seg, alineamiento de los iniciadores a 48 °C/45 seg, polimerización a 72 °C/ 45 seg y por último una extensión final a 72 °C/10 min.

Para el método de Miller y cols., las condiciones para el PCR fueron: un ciclo de 2 min/93 °C, seguido de 50 ciclos de dos pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 93 °C por 45 seg, alineamiento de iniciadores y extensión a 72 °C por 1.25 min con una extensión final de 10 min/72 °C (43).

### **3.7. Electroforesis en geles de agarosa**

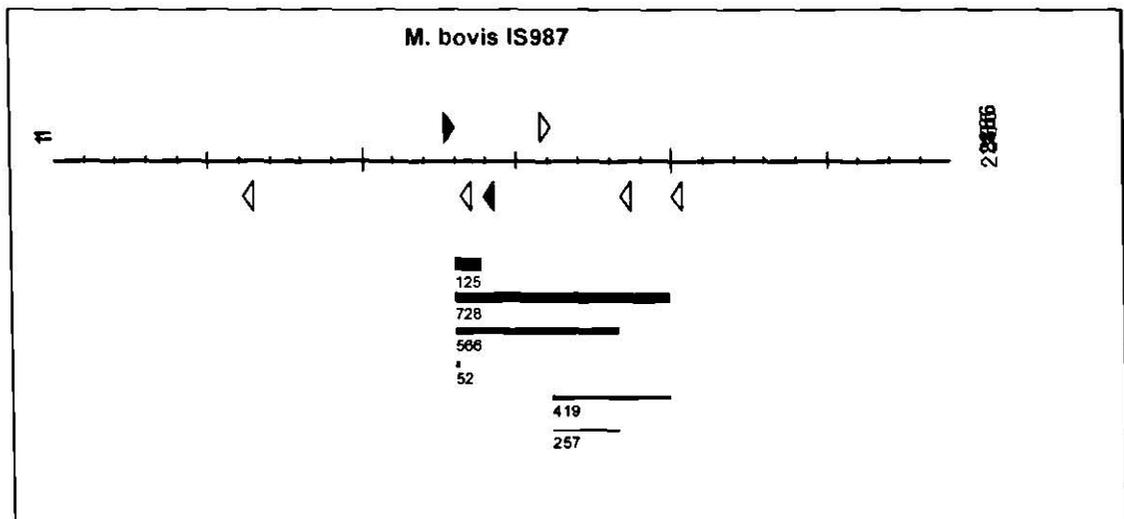
Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa 1.5% y analizados mediante fotografía tomadas con cámara Polaroid y película A667 adaptada con filtro para luz ultravioleta

## Capítulo 4.

**4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN****4.1. Selección de iniciadores y análisis con secuencias reportadas en bancos de genes.**

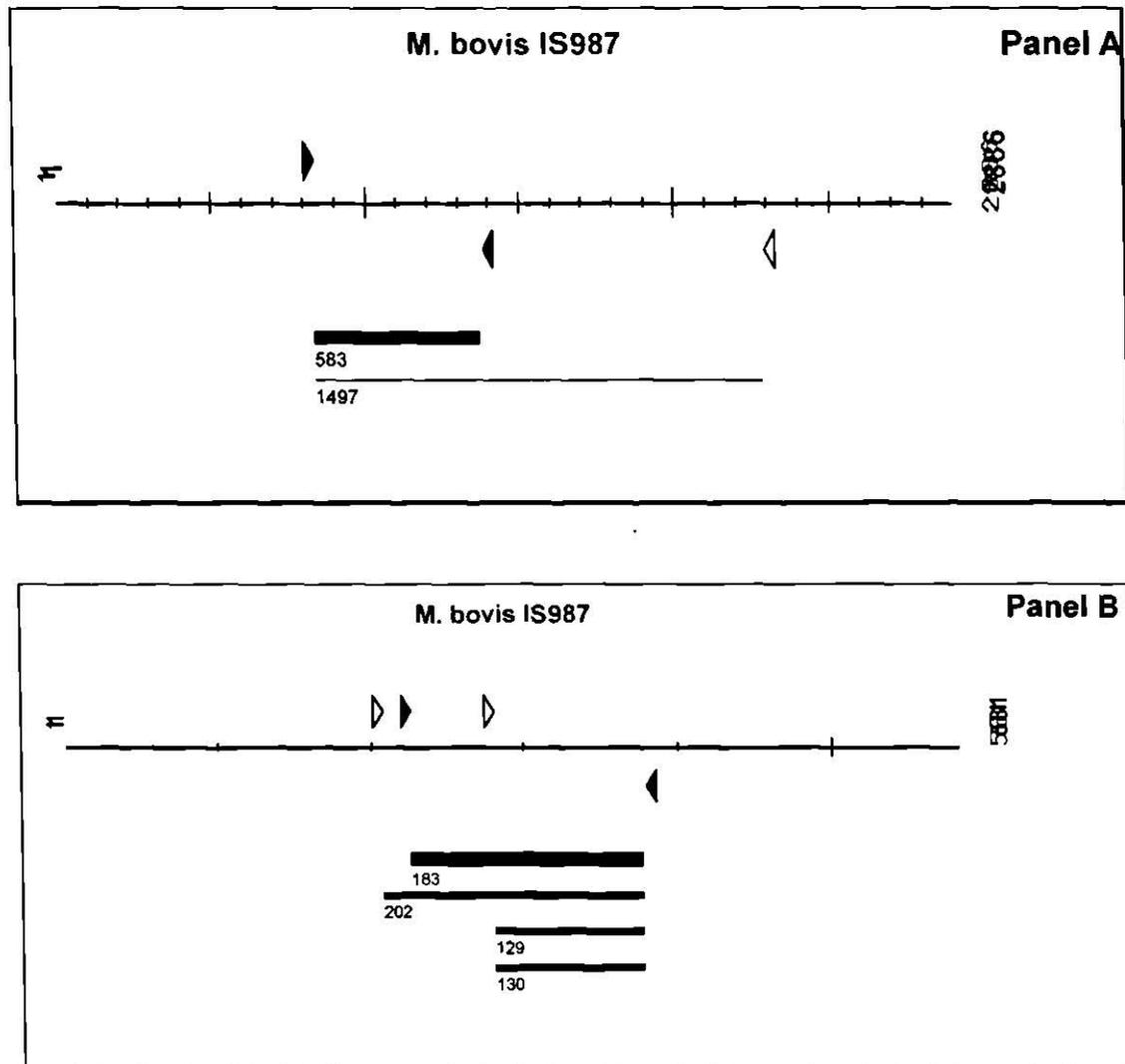
De los iniciadores reportados para amplificar secuencias del genoma del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se seleccionaron para sus síntesis los reportados por Miller y cols., 1997 (M1 y M2) y Wilson y cols., 1993 (TB294, TB850, TB670 y TB505). Con la secuencia de inserción IS987 de *M bovis* (número de acceso X57835) se realizaron las simulaciones de PCR.

Con los iniciadores reportados por Miller y cols., la simulación del PCR mostró la amplificación de 6 fragmentos, de los cuales el de 125 pb indica una mayor posibilidad de amplificación en una reacción *in vitro*. Lo anterior puede ser inferido por el grosor de la línea que representa el fragmento amplificado y a una mayor complementariedad de los iniciadores con la secuencia DNA blanco indicado por los triángulos rellenos en color que representan los iniciadores (Figura 1).



**Fig. 1. Simulación de PCR mediante el programa Amplify 1.2.** Simulación de PCR con los iniciadores reportados por Miller y cols., 1997. Se utilizó la secuencia de inserción de *M. bovis* con un tamaño de 2853 pb. Los triángulos sobre la recta (Isecuencia de inserción) representan los iniciadores y las líneas gruesas horizontales representan los fragmentos amplificados.

En la simulación de la amplificación con los iniciadores reportados por Wilson y cols., 1993, se amplificó un fragmento de 583 pb con los iniciadores TB294 y TB850, panel A de la figura 2. Este fragmento se utilizó como templado para una segunda amplificación con los iniciadores TB670 y TB505 con los que se obtuvieron 4 fragmentos de 201, 183, 129 y 130 pb, como se observan en el p nel B de la misma figura.

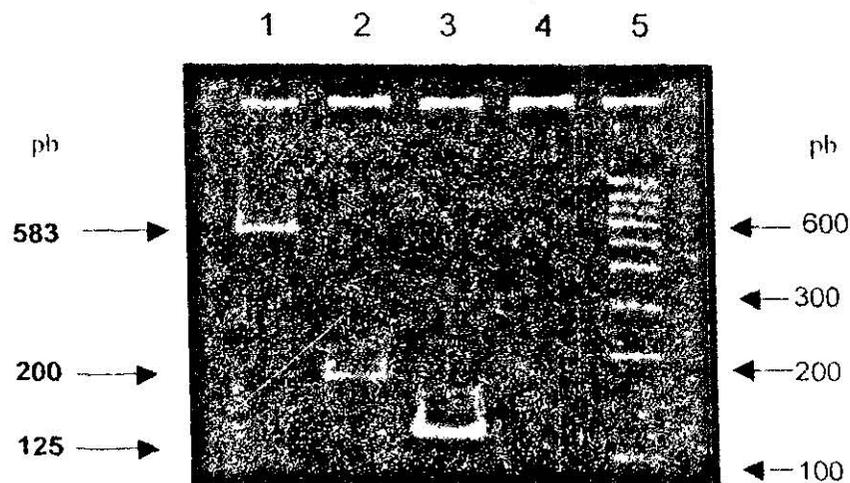


**Fig. 2. Simulación del PCR mediante el programa Amplify 1.2.** En el panel A se presenta el PCR con los iniciadores TB294 y TB850 y en el panel B con los iniciadores TB670 y TB505 de Wilson y cols., 1993. Se utilizó la secuencia de inserción de *M. bovis* representada por la línea horizontal. Los triángulos sobre la línea horizontal (secuencia de inserción) representan los iniciadores y las líneas gruesas horizontales representan los fragmentos amplificados.

#### 4.2. Reacciones de PCR con DNA de cepas de referencia de *Mycobacterium*

Con los iniciadores de Miller y cols , se obtuvo un fragmento de DNA mayor de 100 pb que corresponde al fragmento de 125 pb generado en la simulación de PCR (Fig. 3, carril 3). Con los iniciadores TB294 y TB850 de Wilson y cols., 1993, se amplificó un fragmento de 583 pb en *M. bovis* y *M. tuberculosis*, especies del complejo *M. tuberculosis* (Fig. 3, carril 1). A partir de esta primera amplificación se realizó una segunda amplificación con los iniciadores TB670 y TB505 y se observaron dos fragmentos de aproximadamente 200 pb (Fig. 3, carril 2). Estos dos fragmentos pueden corresponder a 202 y 183 que se generaron en la simulación de PCR, pero no se observaron los de 129 y 130 pb que se generaron en la misma simulación.

Los resultados obtenidos de las reacciones *in vitro* utilizando DNA de cepas de referencia concordaron en parte con las simulaciones generadas con los programas computacionales.



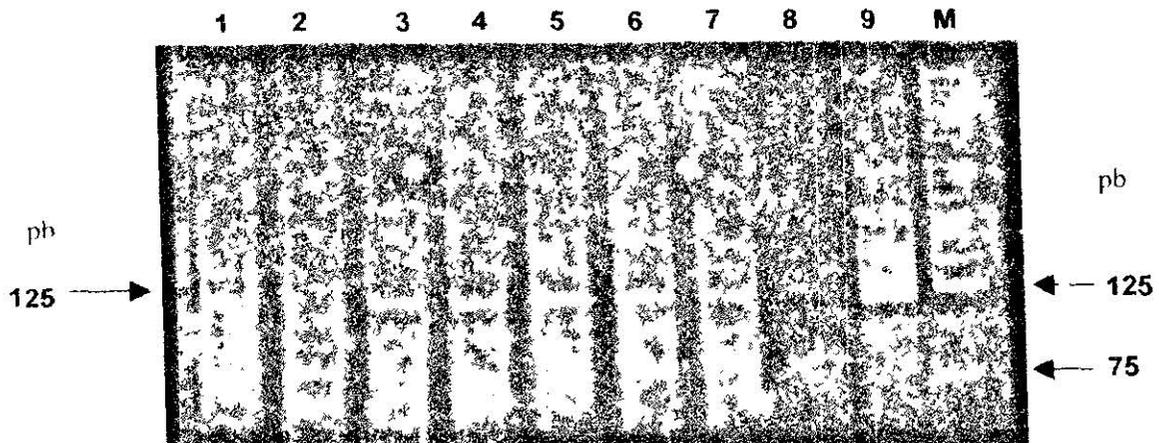
**Fig. 3. Amplificaciones de cepas de *Mycobacterium bovis* (AN5).** Carril 1 = Iniciadores TB294 y TB850 de Wilson y cols , carril 2 = Iniciadores TB670 y TB505 de Wilson y cols , carril 3 = Iniciadores de Miller y cols , carril 4 = negativo y carril 5 = Marcador Ladder 100

### 4.3. Reacciones de PCR con DNA obtenido de tejido embebido en parafina

Con los iniciadores reportados por Miller y cols., y DNA de tejido, se obtuvo un fragmento de 125 pb que indica la amplificación de una parte del genoma de organismos del complejo *M. tuberculosis*, en las muestras analizadas más no el control positivo de cepa, se observan amplificaciones inespecíficas abajo del fragmento de 125 pb (Figura 4, carriles 1-7)

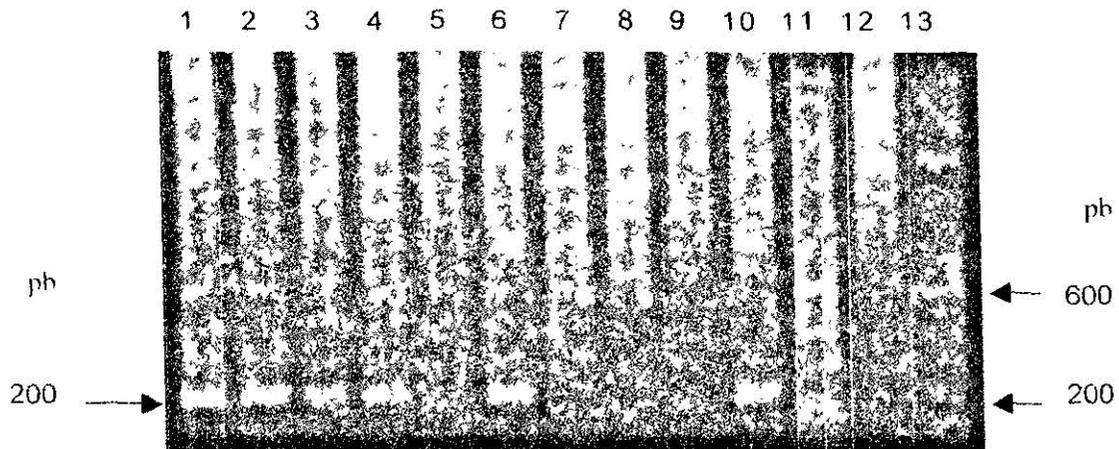
Las amplificaciones inespecíficas pueden ser debidas al número alto de ciclos de amplificación y al tiempo relativamente largo de alineamiento de los iniciadores en el programa del termociclador utilizado. Wright y Manos en 1990 (48), asumen que estos factores generan amplificaciones inespecíficas en PCR's realizados a partir de tejidos embebidos en parafina. Indican además que las amplificaciones inespecíficas son a menudo más pequeñas que el producto específico, como se observó en la figura 4.

Cuando se realizó el PCR con los iniciadores TB294 y TB850 y DNA de tejido, no se observó ninguna amplificación, solamente barridos (datos no mostrados). Cuando se utilizó como templado el anterior producto de PCR y los iniciadores TB670 y TB505, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 200 pb en las muestras positivas (Fig. 5, carriles 1-4, 6 y 7)



**Fig. 4. Electroforesis de productos de PCRs con iniciadores de Miller y cols., en gel de poliacrilamida al 12 %.** Carril 1 a 8 ampliificaciones a partir de muestras de tejidos embebidos en parafina Carril 9 ampliificación a partir de DNA de cepa de referencia (AN5) M = marcador de peso molecular Ladder 25

Los resultados obtenidos en las simulaciones de PCR tienen una mayor concordancia cuando el PCR se realiza con DNA de cepa de referencia, en comparación con muestras de campo. Esto puede ser debido a la poca integridad del DNA obtenido proveniente de tejido embebido en parafina. Esto se confirma cuando se utilizan los iniciadores TB294 y TB850 que deberían de amplificar un fragmento de aproximadamente 600 pb, lo que no se logró al realizar la PCR *in vitro*. En cambio cuando el fragmento amplificado es de tamaño más pequeño como en el caso de los iniciadores reportados por Miller y cols., (123 pb) o Wilson y cols., (200 pb) se tiene un éxito mayor en lograr su amplificación. Esto lo han confirmado Wright y Manos en 1990 (48), quienes han encontrado un límite en la longitud de los productos de amplificación en el rango de 450 a 650 pb o incluso de menor longitud si el bloque de tejido embebido en parafina es muy viejo. La reducción en la capacidad de amplificación es debido a que la integridad del DNA es modificada debido probablemente al fijador y tiempo de fijación usado



**Fig. 5. Electroforesis de productos de PCRs con Iniciadores de Wilson y cols., en gel de agarosa al 1.5 %. Carriles 1-4, 6 y 10 muestras positivas Carriles 5, 7-9 y 12 muestras negativas Carril 13 = Marcador de peso molecular Ladder 100**

De 80 muestras de tejido analizadas en el laboratorio del CFPPNL, histopatología detectó un 24 % de positivas, aislamiento un 28.0 % y PCR un 63.0 % (Tabla 1) González y cols., en 1999 (49) encontraron que de animales positivos a tuberculina solo un 29.9 % de los tejidos presentaron lesiones típicas (granulomas). A partir de los granulomas lograron el aislamiento en un 92.8 % de los casos. Además, cuando realizaron el PCR a partir del mismo tipo de muestras el porcentaje de detección fue del 92.7 %. Los resultados de González y cols., indican que aún realizando una selección minuciosa de las lesiones típicas existe un 7 % de casos que no son causadas por organismo del complejo *M. tuberculosis*

Los bajos porcentajes de detección obtenidos en el CFPPNL, pueden ser debidos a que se analizan solo muestras de animales positivos a tuberculina con lesiones aparentemente causadas por micobacterias causantes de tuberculosis. Posiblemente los microorganismos que generen lesiones similares son *Actinomyces* sp, *Actinobacillus* sp, *Coccidioides immitis*, *Nocardia* sp., u otros agentes que provocan una reacción similar a tuberculosis.

En general, el uso del PCR permitió mejorar la sensibilidad en un 39.0 % y en un 35.0 % con respecto a las pruebas de histopatología y aislamiento, respectivamente. Además, de mejorar la sensibilidad se mejoró la rapidez del diagnóstico al poder emitir resultados a las 24-48 h. Esta misma prueba de PCR fue utilizada por Miller y cols., para la detección de *M. bovis* en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina en ganado vacuno y alces. Ellos detectaron 92 de 99 (93 %) casos de tuberculosis incluyendo 3 de 4 alces. Además, sus resultados fueron positivos en 80 tejidos usando un extracto crudo como templado para realizar el PCR, el resto de las muestras utilizaron una extracción de DNA fenol-cloroformo. En nuestro caso, se utilizó el extracto crudo, pero modificando la congelación de la muestra al realizarlo en nitrógeno líquido en lugar de etanol con bióxido de carbono. Cuando utilizamos el método de Wilson y cols., la extracción de DNA se realizó con la técnica de fenol-cloroformo.

**Tabla 1. Resultados (%) de las pruebas utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis (80 muestras).**

Diagnóstico	Histopatología	Aislamiento	PCR
Positivo	24.0	28.0	63.0
Negativo	54.0	72.0	37.0
Sugestivo	22.0		

La sensibilidad del PCR fue analizada con base a la prueba de histopatología y aislamiento, indicando que del 100 % de las pruebas que dieron resultado positivo a histopatología y cultivo fueron también positivas a PCR (Tabla 2). En cambio del total de muestras negativas a histopatología solamente el 67 % se confirmó como negativas por PCR, lo que indica que un 33 % de muestras negativas, el PCR las detecta como positivas. Para el caso del aislamiento, se confirmó el 49 % como negativas por PCR, lo que indica que en un 51 % de muestras el PCR las detecta como positivas. Lo anterior,

nos puede indicar que el PCR puede detectar la presencia de organismos del complejo *M. tuberculosis* en muestras, aún cuando los organismos podrían ser no viables de manera tal que permita su cultivo.

Otros grupos de investigadores han utilizado la prueba de PCR para el diagnóstico de tuberculosis, tal como Liébana y cols., en 1995 (42), que trabajaron con muestras de nódulos linfáticos bovinos, encontrando que la prueba de PCR detectó 71.4 % de cultivos positivos en animales provenientes de hatos infectados y todas las PCRs negativas y cultivo negativo en tejidos de animales provenientes de un hato libre.

En el mismo año Wards y cols., (41) detectaron 53 muestras positivas mediante PCR de 58 muestras diagnosticadas como *M. bovis* en cultivos positivos. Además, todas las muestras con bacilo ácido-resistente visible microscópicamente, fueron positivas por la prueba de PCR. Lo anterior, concuerda con nuestros resultados al obtener un 100% de concordancia entre PCR positivo, histopatología positiva e incluso cultivo positivo, a diferencia de Wards y cols, que obtuvieron un 91.3 % pero con respecto a cultivos identificados como *M. bovis*. Además, en nuestra investigación encontramos que solo el 49 % de las muestras diagnósticas cultivo negativo el PCR las confirma como negativas a diferencia de Wards y cols., quienes encuentran un 90 % de concordancia. Lo anterior, puede ser debido a que de rastro se envían muestras para diagnóstico al laboratorio del CFPPNL que presentan granulomas, pero estos no son debidos a organismos del complejo *M. tuberculosis*.

Considerando los resultados de concordancia entre PCR positivos, aislamiento e histopatología positivo, la prueba de PCR se presenta como herramienta de utilidad para confirmar los casos de tuberculosis positiva ocasionados por organismos del complejo *M. tuberculosis*.

**Tabla 2. Sensibilidad (%) del PCR con respecto a histopatología y aislamiento**

Resultado	Histopatología	Aislamiento
Positivos	100	100
Negativos	67.0	49.0

Por otra parte, las muestras diagnosticadas como sugestivas en histopatología, es decir que esté presente la lesión típica de *Mycobacterium* pero no se observe al patógeno, resultaron positivas por PCR en un 78.0 % de los casos, mientras que con aislamiento solo resultaron positivas en un 33.0 % de los casos, esto nos indica que en un 45% más el PCR identifica al patógeno en comparación con el aislamiento.

**Tabla 3. Resultados (%) de aislamiento y PCR de las muestras sugestivas en histopatología**

Resultado	Aislamiento (%)	PCR (%)
Positivas	33.0	78.0
Negativas	67.0	22.0

Finalmente, con la incorporación del método de PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina, se mejorará la sensibilidad y rapidez en el diagnóstico comparado con las pruebas tradicionales. Lo anterior, incrementará la calidad de control y erradicación de esta enfermedad.

## Capítulo 5.

### CONCLUSIONES

1. La prueba de PCR, a partir de tejidos embebidos en parafina, permitió detectar un 63.0 % de muestras positivas a diferencia de la histopatología que detectó un 24 % de positivas y el cultivo un 28.0 %.
2. Del 100 % de las muestras que dieron resultado positivo a histopatología y cultivo fueron también positivas a PCR.
3. Del total de muestras negativas en histopatología, la PCR confirmó sólo el 67 % de los casos, lo que indicó que un 33 % de muestras negativas a histopatología el PCR las detectó como positivas.
4. Del total de muestras negativas en aislamiento, la PCR confirmó el 49 %, lo que indicó que existió un 51% de falsos negativos en aislamiento.
5. Muestras reportadas como sugestivas en histopatología, es decir con granuloma pero sin presencia de patógeno, resultaron positivas por PCR en un 78.0 %, mientras que con aislamiento solo resultaron positivas en un 33.0 % de los casos, esto nos indicó que en un 45 % más el PCR detectó al patógeno en comparación con el aislamiento.
6. En general, el uso de PCR permitió mejorar la sensibilidad en un 39.0 % y en un 35.0 % con respecto a las pruebas de histopatología y aislamiento, respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Grange, J. M., M. D. Yates and I. N. de Kantor. 1996.** Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. WHO. Division of Emerging and other Communicable Diseases Surveillance and Control. Geneva.
- 2.- **O'Reilly, L. M. and C. J. Daborn. 1995.** The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tuber Lung Dis.* Vol. 76. pp: 1-46.
- 3.- **Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller and F. C. Tenover. 1999.** Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology, Washington D. C.
- 4.- **Balandrano, C. S., L. Blancarte, S. A. Caballero, C. S. Giono, B. C. González, C. L. Gutiérrez, M. A. López, S. A. López, G. A. Martínez, C. I. Moreno, R. A. G. y L. L. A. Sapián. 1995.** Diagnóstico de Bacteriología médica. Manual de Técnicas de Laboratorio. Vol. I (2). Editores G. A. Escobar y C. S. Giono, INDRE.
- 5.- **Hernández-Monroy, I. 1996.** Brucelosis. Manual de procedimientos de laboratorio. Vol. 19. Editores P. Peña-Flores, y X. Betancourt-Morillo., INDRE/SAGAR., México D.F.
- 6.- **Carter, G. R. 1994.** Bacteriología y Micología Veterinarios Aspectos Esenciales. Editorial el Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D. F.
- 7.- **Zinsser, Joklink Willott and Amos. 1994.** Microbiología Médica. Editorial Panamericana, S. A.
- 8.- **González, S. C. 1992.** Curso de Actualización Sobre Técnicas Diagnósticas en Tuberculosis Bovina. Subdirección de Patología Diagnóstica. Centro Nacional de Servicios de salud Animal. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal. Gómez Palacio Durango, México.

- 9.- **Neill, S. D. J. M. Pollock, D. B. Bryson and J. Hanna. 1994.** Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.* Vol. 40 (2). pp:41-52.
- 10.- **Corner, L. A. 1994.** Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.* Vol. 40 (2). pp: 53-64..
- 11.- **Myers, J. M. and J. H. Steel. 1969.** Bovine tuberculosis control in man and animals. St Louis, USA.
- 12.- **Francis, J. 1958.** Tuberculosis in animals and man. A study in comparative Pathology. Cassel and Co. Ltd. London.
- 13.- **Hunninghake, G. W., et al. 1984.** Pathogenesis of granulomatous lung disease. *Am Rev Respir Dis.* Vol.130. pp:476.
- 14.- **Dannenberg, A. M. J. 1989.** Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Pulmonary Tuberculosis. *Rev Infect Dis.* Vol. 11 (2). pp: 369.
- 15.- **Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. 2000.** Actualización en Tuberculosis Bovina. Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis. Subcomisión Nacional de Tuberculosis Bovina. Buenos Aires, Argentina. Secretaria de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- 16.- **Lurie, M. B. 1964.** Resistance to tuberculosis: Experimental Studies in Native and Acquired Defensive Mechanisms. Harvard University Press. Cambridge, USA.
- 17.- **Dannenberg, A. M. J. 1991.** Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today* Vol. 12. pp :228.
- 18.- **American, T. S. 1986.** Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. *Am Rev Respir Dis.* Vol. 134. pp:355.
- 19.- **Dannenberg, A. M., Jr. 1990.** Controlling tuberculosis: The pathologies point of view (From the 5th Forum in Microbiology on "killing of Intracellular Mycobacteria : Dogmas and Realities"). *Res Microbiol.* Vol. 141. pp:192.

- 20.- **Dannenberg, A. M., Jr. 1989.** Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Rev Infect Dis.* Vol. 11 (2). pp: 369.
- 21.- **Lurie, M. B. and A. M. Dannenberg, Jr. 1965.** Macrophage function in infectious with inbred rabbits. *Bact Rev.* Vol. 29. pp:466.
- 22.- **Scott, P. and S. H. E. Kaufmann. 1991.** The role of T-cell subset and cytokines in the regulation on infection. *Immunol Today.* Vol. 12. pp:346.
- 23.- **Barnes, P. F. et. al. 1991.** Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Med.* Vol. 324. pp:664.
- 24.- **Kantor, I. 1994.** Patogénesis y el control de la tuberculosis en tiempos de SIDA. *Medicina.* Vol. 54 (5).
- 25.- **Arriaga, D. C., R. V. Banda, O. F. Díaz y C. H. Estrada. 1999.** Avances en el Diagnóstico de la Tuberculosis Bovina. Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional De Sanidad Animal. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, SAGAR. México D.F. pp: 51-54.
- 26.- **Suárez, G. F. y P. J. A. Gutiérrez. 2000.** Tuberculosis y Brucelosis en Bovinos. Simposio de sanidad animal. XXXVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Sonora, México.
- 27.- **Nader, A. y H. Husberg. 1988.** Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. *Rev Med Vet.* Vol. 68. pp:36-39.
- 28.- **Bawinek, F. and N. Taylor. 1996.** Assessment of the Socio-Economic Importance of Bovine Tuberculosis in Turkey and Possible Strategies for Control or Eradication. General Directorate of Protection and Control. Ankara, Turkia.
- 29.- **Latini, O., A. M. Canal, M. E. Ferrera, M. D. Sequeira, R. Bagnaroli y P. Torres. 1997.** Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomiso en frigoríficos. *Arch Med Vet.* Vol. 29. pp:197-203.
- 30.- **Thoen, C. O. and J. H. Steele. 1995.** *Mycobaterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State, USA.

- 31.- **Kantor, I. N. and E. Alvarez. 1991.** Current Status of Bovine Tuberculosis in Latin America and Caribbean. Pan American Zoonoses Center/Pan American Health Organization. Buenos Aires, Argentina.
- 32.- **World Health Organization. 1997.** Treatment of tuberculosis. Guidelines for National Programs. World Health Organization. Geneva.
- 33.- **Pan American Health Organization. 1992.** Plan of Action for the eradication of bovine tuberculosis in the Americas. PAHO/WHO. Washington, D.C.
- 34.- **Global Tuberculosis Program. 1998.** Global Tuberculosis Control, WHO report 1998. Worldwide Health Organization. Geneva.
- 35.- **Pan American Health Organization. 1997.** Guide for Bovine Tuberculosis Projects. INPPAZ (PAHO/WHO). Buenos Aires, Argentina.
- 36.- **Office Internacional des Epizooties. 1992.** Manual of Standards for diagnostic test and vaccines. OIE. Paris.
- 37.- **Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 1996.** Norma Oficial Mexicana. Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina. (*Mycobacterium bovis*). NOM-031-ZOO. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Mexico, D.F.
- 38.- **Kantor, I. y A. Bernardelli. 1988.** Identificación de Micobacterias aisladas en muestras de origen humano y animal. CEPAZO, OPS/OMS, GELAB/SENASA.
- 39.- **Cousins, D. V. 1992.** Use of PCR for rapid diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol. Vol. 3 (1). pp:255.
- 40.- **Wilson, S. M., R. Mc Nerney, P. M. Nye, P. D. Godfrey-Faussett, N. G. Stoker and A. Voller. 1993.** Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol. Vol. 31 (1). pp: 776-782.
- 41.- **Wards, B. J., D. M. Collins and G. W. Lisle. 1995.** Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol. Vol. 43 (2). pp:227.

- 42.- **Liebana, E., A. Aranaz and A. Mateos. 1995.** Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. J Clin Microbiol. Vol. 33 (5). pp:33-36.
- 43.- **Miller, J. J., J. Rhyan, D. Saari and D. Suárez. 1997.** Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of and IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organism. J Vet Diagn Invest. Vol. 9 (3). pp:244-249.
- 44.- **Bollet, C., X. De Lamballerie, C. Zandotti, C. Vignoli, M. J. Gevaudan and P. De Micco. 1992.** Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. Bovis*/BCG and *M. avium* by two-step Polimerase Chain Reaction. Comparison with ELISA using A60 antigen. The Lancet. Vol. 45 (6). pp: 345-349.
- 45.- **Kearns, A. M., J. G. Magee, A. Gennery, M. Steward, C. Graham, P. R. Seiders and R. Freeman. 1999.** Rapid identification of *Mycobacterium bovis* BCG by the detection of RD1 deletion using a multiplex PCR techniques. Int. J. Tuberc Lung Dis. Vol. 3 (7). pp:635-638) .
- 46.-**Talbot, E. A., D. L. Williams, and R. Frothingham. 1997.** PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol. Vol. 35 (3). pp: 566-569.
- 47.-**Martínez-Vázquez, I. O. 1997.** Estudio longitudinal en fluidos, secreciones y exudados de caprinos inoculados, para la detección temprana de *Brucella melitensis*. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. San Nicolás de los Garza, N.L.
- 48.- **Wright, K. D. and M. M. Manos. 1990.** Sample preparation from paraffin-embedded tissues. In PCR Protocols. A guide to methods and applications. A. M. Innis, H. D. Gelfand, J. J. Sninsky and J. T. White, eds. Academic Press, Inc., San Diego California USA. pp. 153-158.
- 49.- **González, L. O. R., M. C. B. Gutiérrez, M. A. Aranaz, C. E. Liébana, R. L. Domínguez and F. E. F. Rodríguez. 1999.** Comparasion of different

methods for diagnosis of bovine tuberculosis from tuberculin-or interferon-gamma-reacting cattle in Spain. *J Appl Microbiol.* Vol. 87(4). pp:465-471.

