



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

**COMPARACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MICROBIOLÓGICA POR PCR-TR DE
TEJIDOS DE BECERROS VACUNADOS Y NO VACUNADOS CONTRA LA
TUBERCULOSIS BOVINA**

Que como parte de los requerimientos para obtener el grado de

Maestro en

Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ Jorge Luis Olmos Velázquez

Co-Dirigida por:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Dr. Oscar Enrique Pizano Martínez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

COMPARACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y MICROBIOLÓGICA POR PCR-TR DE
TEJIDOS DE BECERROS VACUNADOS Y NO VACUNADOS CONTRA LA
TUBERCULOSIS BOVINA

Que como parte de los requerimientos para obtener el grado de Maestro en Salud y
Producción Animal Sustentable

Presenta:

M.V. Z. Jorge Luis Olmos Velázquez

Co-dirigido por:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Dr. Oscar Pizano Martínez

SINODALES

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Presidente

Dr. Oscar Pizano Martínez
Secretario

Dr. Feliciano Milián Suazo
Vocal

Dra. Gabriela Aquilar Tipacamú
Suplente

MC. Elba Rodríguez Hernández
Suplente

Dra Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Firma
Firma
Firma
Firma
Firma
Firma
Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado de la
Universidad Autónoma de Querétaro

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Mayo 2014

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad crónica causada por *Mycobacterium bovis* que se caracteriza por la formación de granulomas en cualquier tejido del cuerpo, principalmente en linfonodos de cabeza, cuello, tórax y pulmón. En la actualidad, la importancia de la TBb en México radica en que representa un riesgo para la salud pública, causa severas pérdidas económicas a la industria ganadera, representa gastos por programas de control y erradicación y representa una limitante para el libre comercio de animales y sus productos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta histopatológica (cuantificación de lesiones compatibles con infección tuberculosa) y microbiológica (cuantificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en las lesiones) en becerros desafiados con una cepa de campo de *M. bovis* después de ser vacunados con un inmunógeno a base de la cepa BCG, un filtrado proteico y un adyuvante. Treinta becerras de entre 5 y 6 meses de edad, libres de tuberculosis fueron divididas en tres grupos experimentales: 1. testigo sin vacunar, 2. vacunado con la cepa BCG (106 UFC en 2ml) y 3. vacunado con BCG (106 UFC) más un refuerzo con un filtrado proteico (CFP) de *M. bovis* y un adyuvante aplicado al mes de la vacunación. Tres meses post-vacunación, los animales fueron confrontados con una cepa de campo de *M. bovis* por vía respiratoria en forma de aerosol. A las 20 semanas post-desafío, los animales fueron sacrificados para la cuantificación de lesiones y obtener muestras para análisis histopatológico y microbiológico. Muestras de 1cm² de pulmones, linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mediastínicos de cada animal fueron analizadas. Los cortes histológicos se tiñeron con HE y ZN. En todas las muestras se realizó un análisis para identificar y cuantificar (bacilos por campo microscópico) BAAR. Se obtuvo el promedio de bacilos en 100 campos con un objetivo 40x por grupo. Los resultados mostraron diferencia nula ($P > 0,05$) entre los grupos vacunados y el grupo control; sin embargo, el promedio de bacilos en el grupo testigo (4.8) fue considerablemente mayor que el de los grupos vacunados (0.8 para el grupo BCG y 2.0 para el grupo BCG+CFP). En relación con el número de muestras con

lesiones compatibles con TBb, la proporción fue mayor en el grupo testigo (57%) que en los grupos vacunados (35% para el grupo BCG y 38% para el grupo BCG +CFP), sin embargo, debido a la alta desviación estándar, la diferencia no fue significativa (P = 0,11).

Palabras clave: *M. bovis*, Histopatología, BCG.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, por demostrarme su entereza y firmeza para avanzar en la vida, ejemplo para mí por siempre....

Profesores:

Dr. Germinal Cantó Alarcón: por su desinteresado apoyo de principio a fin de esta aventura de estudios, además de su paciencia y compromiso con el trabajo, además de su amistad en estos últimos años, que tiene gran valor para mí.

Dr. Feliciano Milián Suazo: por su paciencia y aportaciones técnicas fundamentales para la escritura de este trabajo y término de mis estudios, además de su amistad sincera.

Dr. Oscar Enrique Pizano Martínez, la M.C. Yezenia Rubio Venegas y M.C. Susana Sosa Gallegos, puesto que sin su gran apoyo, no hubiera podido concluir ni llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos a distancia y cercanos, por las innumerables palabras de aliento, apoyo, regaños, observaciones, atinos y desatinos durante mis estudios concluidos hoy.

A mis compañeros de estudios durante toda esta aventura que ahora concluye con este trabajo, por las innumerables anécdotas que nos condujeron juntos.

A todos, gracias por su compañía.....y a tí por ser parte de mi vida.....MZ

El estudio fue parcialmente financiado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), proyecto 6216615P Eficacia de una vacuna BCG de *Mycobacterium bovis* para la eliminación de la Tuberculosis bovina en hatos lecheros con alta prevalencia.

También parcialmente financiado por el proyecto: FORDECYT 2012 No. 193512

ÌNDICE

RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Enfermedad	3
2.2 Agente infeccioso	3
2.3 Epidemiología	4
2.4 Patogenia	5
2.5 Diagnóstico	8
2.5.1 Histopatología	10
2.5.2 Baciloscopia	11
2.5.3 PCR	12
III. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos	13
IV MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Diseño del estudio	14
4.2 Análisis estadístico	16

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1 Conteo de lesiones	17
5.2 Análisis histopatológico	17
5.3 Muestras con lesiones compatibles con tuberculosis	19
5.4 Cuantificación de carga bacteriana por PCR en tiempo real	20
VI CONCLUSIONES	21
VII Bibliografía	22
Apéndices	27

I.- INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina se ha presentado en el mundo entero; sin embargo, actualmente los programas de control prácticamente han eliminado esta enfermedad de los animales domésticos en muchos países. Los países considerados que actualmente se clasifican como libres son: Australia, Islandia, Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Austria, Suiza, Luxemburgo, Letonia, Eslovaquia, Lituania, Estonia, República Checa, Canadá, Singapur, Jamaica, Barbados e Israel. Otros países han implementado también programas de erradicación, Japón, Nueva Zelanda, EE. UU. A., México y algunos países de América Central y del Sur (OIE, 2010).

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por presentar formaciones granuladas en diversos órganos, principalmente en pulmones y es causada en humanos por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Biet *et al.*, 2005). Se estima que entre 7 y 10% de los casos humanos son debidos a *M. bovis*, causa principal de tuberculosis en ganado (TBb) (Pérez *et al.*, 2008).

Las campañas nacionales de erradicación han empleado diversas alternativas de diagnóstico: tuberculinización, revisión de los especímenes *postmortem* por histopatología y bacteriología, esta última considerada la “prueba de oro. Se han empleado tratamientos y se ha considerado incluso la vacunación, pero depende del tiempo transcurrido del inicio de la enfermedad para poderse llevar a cabo el diagnóstico más apropiado (Liébana, 1995).

Esta enfermedad zoonótica se ha extendido y requiere de nuevos esquemas para el control, misma que ha tomado relevancia por la presencia de reservorios en la fauna silvestre y la reinfección del ganado (Wedlock *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2006; Delahay *et al.*, 2007). El riesgo de salud pública en México se agrava porque la prevalencia de la tuberculosis en el ganado lechero llega a ser del 16%, aunque algunos hatos presentan hasta el 60%. Se estima que el problema crece por la falta de participación de los productores en actividades de campaña (Milián *et al.*, 2000).

La región centro del país representa una de las principales zonas lecheras de México, estados que producen 1, 400,000 litros de leche anual, 30% de la cual se vende como leche cruda que no va directamente a plantas pasteurizadoras, lo que implica un riesgo para la salud pública (NOM-031-ZOO-1995). Debido a que su transmisión es por vía aérea, los trabajadores de establos, rastro y plantas de sacrificio de animales son susceptibles de enfermar (Toledo, 1997).

El diagnóstico se puede realizar por métodos directos e indirectos. Los primeros se basan en la determinación de la presencia del agente o en las lesiones típicas que produce en los tejidos afectados y comprenden: aislamiento bacteriológico, histopatología, baciloscopía (visualización del *M. bovis* a través de la coloración de Ziehl-Nielsen) y la detección del antígeno bacilar por sondas de ADN a través de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Desjardin *et al.*, 1998; Wards *et al.*, 1995).

La histopatología muestra alta correlación con el cultivo, sin embargo, no todos los laboratorios están equipados para realizarla; además, es una técnica *posmortem*, la cual nos confirma el estatus del animal. Por otra parte, la baciloscopía es la prueba con la cual se inicia la investigación de la muestra histológica, la presencia del bacilo puede evidenciarse microscópicamente a partir de frotis de muestras clínicas o de preparados de tejidos. Esta es la técnica de elección para el diagnóstico rápido, ya que es simple, económica y eficiente. La vacunación con BCG, se ha propuesto como una alternativa en el control de la enfermedad y es de importancia conocer cómo se podrían afectar los diferentes métodos de diagnóstico con los que se cuenta en este momento, por lo tanto, en el presente estudio se realizó la comparación de la respuesta histopatológica y microbiológica por PCR en becerros confrontados con *Mycobacterium bovis* después de ser vacunados con un inmunógeno a base de la cepa BCG.

II.- ANTECEDENTES

2.1 Enfermedad

El bovino es el principal reservorio de *M. bovis*, que ingresa al animal generalmente por vía aerógena a través de aerosoles, y en menor frecuencia por vía digestiva. Esta última es relevante debido a la ingestión de leche proveniente de vacas tuberculosas de los terneros durante su crianza. El humano puede también enfermar a través de la vía digestiva, debido al consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados. Generalmente se asocia a un contacto estrecho con los bovinos infectados, por ello el riesgo de los encargados de las unidades de producción y los veterinarios (Abdalá, 1998).

Anteriormente se consideró que *M. tuberculosis* surgió como una mutante de *M. bovis*, a causa de la domesticación de animales que eran requeridos como fuente de alimento o como fuerza de trabajo. Ésta hipótesis surgió al conocer que *M. tuberculosis* es un patógeno exclusivo en humanos, mientras que *M. bovis* tiene una amplia gama de hospederos. Sin embargo, dicho postulado fue propuesto antes de que se conociera y se comparara el genoma completo de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Araujo, 2004).

2.2 El Agente Infeccioso

Las micobacterias pertenecen al orden Actinomycetales, familia Micobacteriaceae y género *Mycobacterium*. Son bacilos acido-alcohol resistentes que resisten a la decoloración con alcohol ácido (método de Ziehl Neelsen), debido a que sus paredes celulares son ricas en contenido lipídico por los ácidos lipídicos (60 a 90 átomos de carbono), no móviles, no esporulados, pleomórficos aerobios, parásitos intracelulares facultativos, en medios sólidos de cultivos desarrollan colonias lisas o rugosas opacas en general (Martinilla *et al.*, 2009).

Los agentes etiológicos causantes de la tuberculosis en humanos son *M. tuberculosis* y *M. bovis*, miembros del complejo de *M. tuberculosis*, al cual también pertenecen *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti* (O'Reilly and Daborn, 1995; Cole, 2002; Mancilla *et al.*, 2006). Todas estas especies tienen un ancestro en común (Brosch *et al.*, 2002). La especie *M. bovis* ha sido subdividida recientemente en *M. bovis* Subs. *bovis*, resistente a la pirazinamida (PZA) y *M. bovis* Subs. *Caprae*, sensible a PZA (Aranáz *et al.*, 1996; Kubica, *et al.*, 2003; Wolter *et al.*, 2004).

El principal causante de la tuberculosis bovina es el *Mycobacterium bovis*, bacilo ligeramente curvado y delgado (0.3-1 x 2-4 μm) que no forma esporas, no presenta flagelos (son inmóviles), ni cápsula, es microaerófilo y altamente susceptible a la luz solar. La temperatura óptima para su desarrollo es de 35-37°C y pH de 6.7-6.9 (Dorronsoro y Torroba, 2007).

En términos de supervivencia, *M. bovis* en invierno perdura por 5 meses en las heces y en verano por 2 meses (O'Reilly y Daborn, 1995), es sensible a los rayos UV, temperaturas mayores a los 70°C y a desinfectantes orgánicos como el fenol y los cresoles (Vadillo *et al.*, 2002; Falkinham, 2003). Las temperaturas de pasteurización (63.5°C por 30 min. o 72°C por 15 seg.) inactivan al bacilo (Grant *et al.*, 1996; Holsinger *et al.*, 1997). Se han realizado muchos estudios a fin de conocer la composición química de la bacteria, particularmente la de su pared celular, con el objeto de conocer la patogenia de la enfermedad, perfeccionar las técnicas de diagnóstico y elaborar vacunas.

2.3 Epidemiología

M. bovis tiene un rango amplio de hospederos, de los cuales el bovino es el principal, pero se ha encontrado en muchos animales domésticos y silvestres tales como ciervos, alces, bisontes, búfalos, tejones, comadreja, suricatos, hurones, liebres, jabalíes, antílopes, camellos, llamas, alpacas, elefantes, primates no humanos, zorro, coyote, lobo, tigre, leopardo, lince, rinocerontes y lobos marinos, entre otros (O'Reilly y

Daborn, 1995; Romero *et al.*, 2008; Thoen *et al.*, 2009; Kaneene *et al.*, 2010; Good y Duignan, 2011). En varios países la infección con *M. bovis* en animales silvestres sigue siendo un problema epidemiológico y representa una fuente de infección para el hombre y otros animales (Fritsche *et al.*, 2004).

Esta enfermedad es una zoonosis de distribución mundial, con grandes variaciones en su prevalencia entre distintas regiones. Aunque en países desarrollados se presenta como erradicada o en una fase avanzada de control, en los países en desarrollo, es endémica. En Europa occidental, Canadá y Estados Unidos de Norteamérica, sus niveles son menores al 0.1%, las más afectadas son las cuencas dedicadas a la producción de leche (Abdalá, 1998).

La estrategia para el control de la tuberculosis en el humano, es la vacunación de infantes y la terapia; sin embargo, en el ganado la respuesta inmune a la vacunación interfiere con las pruebas de campo (Scorpio *et al.*, 1997) y es por eso que no se usa. No obstante, se considera que la vacunación contra tuberculosis en el ganado puede ser una estrategia importante de control en países donde los programas de prueba y sacrificio son incosteables (Tweddle y Livingstone, 1994).

2.4 Patogenia

Es muy importante saber que la tuberculosis presenta fases de desarrollo, por lo tanto es necesario conocer si su evolución dentro del huésped permite que sea diagnosticada de forma bacteriológica e histopatológica particularmente.

El agente, generalmente penetra en el organismo por vía aerógena, la ingesta de *M. bovis* es considerada una vía secundaria para infectar al hospedador, provocado por presentarse en comederos y bebederos o bien al momento que la vaca alimenta a su cria (Milián *et al.*, 2013)

Al penetrar *M bovis* por vía aerógena, se instala en los alveolos pulmonares., el bacilo es reconocido por el sistema inmune y es fagocitado por los macrófagos alveolares, los cuales son utilizados como reservorios para poderse multiplicar y

formar un foco primario en el pulmón, causando inflamación crónica y estimulando la formación de masas de tipo granulomatoso llamadas tubérculos que aumentan gradualmente de tamaño. A medida que estos granulomas crecen se produce necrosis en su parte central que finalmente tiende a calcificarse por la precipitación de sales cálcicas (CRESA, 2013), con lo que se busca evitar la diseminación de la bacteria, sin embargo, si el sistema inmune se encuentra deprimido, la enfermedad se desarrolla estableciéndose en pulmones, nódulos linfáticos y en diversos órganos; donde la circulación linfohemática los lleve, formando nuevos tubérculos. Es así como se producen nuevas lesiones en el pulmón, hígado, bazo, glándula mamaria y sus ganglios respectivos. La generalización de este tipo de lesiones en un órgano se conoce como TB miliar con formación de tubérculos de edad semejante. Puede producirse una difusión intracanicular cuando penetra en los bronquios, el intestino, las vías biliares, etc (CRESA, 2013., Pizano, 2013).

El conjunto de reacciones recibe el nombre de complejo postprimario. Sólo hay difusión intracanicular (no linfohematógena), por lo que se puede originar tuberculosis crónica en un órgano concreto (sin caseificación), sin que se produzcan lesiones tuberculosas en los nódulos. La bacteria causa cuadros diversos como granulomas en diferentes órganos, especialmente en pulmones o nódulos linfáticos de varias especies animales y del hombre. Las lesiones del aparato digestivo están presentes en animales carnívoros (Dannenberg *et al.*, 1994).

Existen diferentes estudios sobre el conocimiento de la histopatología de la tuberculosis en forma experimental en mamíferos, de donde se han definido cuatro fases. La fase de infección de los macrófagos alveolares (I), simbiosis (II) que se basa en el equilibrio de crecimiento exponencial de macrófagos y su acumulación en el foco infeccioso, la fase estacionaria (III) con la presencia de hipersensibilidad retardada (DTH) y de inmunidad celular o CMI, es en esta fase que se observa el inicio de necrosis caseosa (Dannenberg *et al.*, 1994).

La evolución posterior hacia la fase IV está directamente relacionada con la presencia de la CMI. Si esta inmunidad es poco importante, los macrófagos no se

activan, la población bacilar intracelular se incrementa y la DTH destruye a estos macrófagos aumentando el tejido caseoso y, a la vez, la población extracelular (Dannenberg *et al.*, 1994). En la última fase (V), el *caseum* se licuefacta, incrementando extraordinariamente la concentración de bacilos extracelulares, lo que desborda la capacidad de los macrófagos activados, provocando el estímulo de la hipersensibilidad retardada. De esta manera se origina más necrosis y el aumento del tamaño de la lesión, que acaba erosionando el árbol bronquial, liberando el tejido licuefactado y formando una cavidad (Dannenberg *et al.*, 1994).

Así pues, se tiene que los bacilos superan los mecanismos de defensa bronco-pulmonares y llegan a los alveolos del pulmón. Generan así un complejo de fibrina y exudado, logrando con ello el foco primario, establecidos en el organismo del huésped. Después son transportados por los vasos linfáticos pulmonares a los ganglios ubicados en el hilio pulmonar y en el mediastino, estos se agrandan produciendo adenomegalia, que es la lesión inicial, dando lugar a dos posibilidades, curación o progresión. En dos a cuatro semanas pos infección, se genera una respuesta inmune celular e hipersensibilidad retardada (Dannenberg *et al.*, 1994).

Los animales sin contacto previo con la tuberculosis la infección primaria observa reacciones tisulares en el punto en el que se asienta la bacteria. Las reacciones tisulares pueden ser:

- Complejo primario respiratorio (pulmones + nódulos).
- Complejo primario digestivo (intestino + nódulos).
- Complejo primario oro-nasal (tonsilas + nódulos).

Los animales que han tenido contacto previo a la tuberculosis, adquieren inmunidad durante la primera infección y responden a un nuevo contagio de forma diferente. El nuevo contagio puede deberse a bacterias que penetran desde el exterior o a focos primarios hasta entonces inactivos (Figura 1) (Araujo *et al.*, 2008).

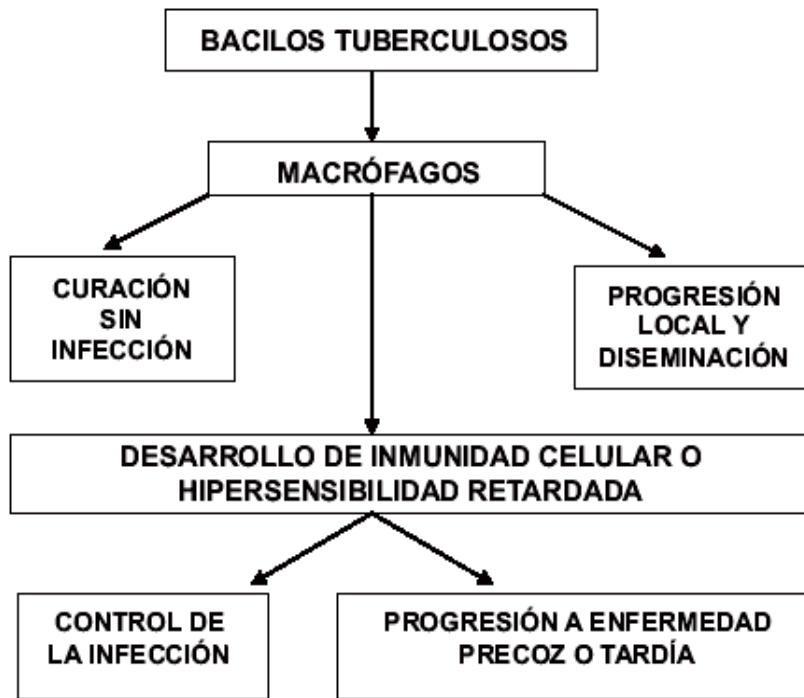


Figura 1. Evolución de la infección tuberculosa en el huésped, dependiendo de la respuesta inmunitaria. Una vez que se desarrolla la inmunidad, la enfermedad puede progresar como precoz o tardía, o bien controlarse (Araujo *et al.*, 2008).

2.5 Diagnóstico

El diagnóstico se puede realizar por métodos directos e indirectos. Los primeros se basan en la determinación de la presencia del agente o en las lesiones típicas que produce en los tejidos afectados y comprenden: aislamiento bacteriológico, histopatología, baciloscopia (visualización del *M. bovis* a través de la coloración de Ziehl-Nielsen) y la detección del antígeno bacilar por sondas de ADN a través de la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) (Desjardin *et al.*, 1998; Wards *et al.*, 1995).

Algunas desventajas de estas técnicas son: El aislamiento bacteriológico es lento y dificultoso, la histopatología se realiza sobre tejidos de animales muertos, mientras que la PCR es de alta confiabilidad pero de elevado costo. La baciloscopia y el aislamiento no siempre logran detectar el *M. bovis* y en el caso de esta última, el cultivo demanda un mínimo de 60 días. Es por ello que los métodos directos no son adecuados para el diagnóstico a nivel campo (Barrera, 2008).

Los métodos indirectos son: la tuberculinización, la detección de interferón γ y la detección de IgG por la técnica enzimática de inmunoensayo (ELISA). Todos ellos evalúan la respuesta inmunitaria que produce el agente infeccioso en el huésped. Los dos primeros evalúan la respuesta de base celular (linfocitos T y macrófagos), mientras que el ELISA mide la inmunidad de tipo humoral (anticuerpos). Estas técnicas son más prácticas y se adecuan al diagnóstico en campo. No obstante, tienen un margen de error que no les permite detectar el 100% de los animales enfermos ni el 100% de los animales sanos, pudiéndose observar un porcentaje variable de reacciones falso negativas y falso positivas respectivamente (Antognoli *et al.*, 2011; Halse *et al.*, 2011).

La detección de Interferón gamma (IFN- γ) en plasma es una prueba alternativa o complementaria para el diagnóstico de tuberculosis bovina, se emplea una técnica que detecta la presencia de interferón gamma basada en una prueba inmunoenzimática de "sándwich" (Wood and Rothel, 1994). En esta prueba, la placa es sensibilizada con un anticuerpo específico hacia IFN- γ , la cual recibe el plasma obtenido de sangre completa sensibilizada con tuberculina aviar o con tuberculina bovina para posteriormente identificar la presencia del IFN- γ con un sistema de anticuerpo específico marcado en un formato de ELISA.

El diagnóstico de la TBb se realiza mediante la tuberculinización, en algunas ocasiones a través de la prueba cervical simple que tiene una sensibilidad superior a la del pliegue ano-caudal. Se utiliza con el fin de obtener una mayor seguridad en la eliminación de bovinos infectados, cuando estos pertenecen a unidades de producción en los que ya se ha comprobado la enfermedad. El lugar de aplicación es en el tercio medio del cuello, previo rasurado de una superficie de 5 o 6 cm², se mide el grosor de la piel en esa zona con un calibre, se desinfecta y se inocula intradérmicamente una dosis de 0,1 ml de tuberculina PPD bovina (1,0 mg/ml de concentración) y se lee a las 72 horas midiendo con calibre el grosor de la piel. En este caso todo aumento de 3 mm de espesor es positivo y no existe la categoría de sospechoso. Estas pruebas de tuberculina no se deben de realizar antes de los 60 días entre una y otra debido a que el animal se encuentra sensibilizado a la PPD. Algunas micobacterias pueden interferir

en la respuesta a la tuberculinización, por ejemplo, el *M. avium* tiene su relevancia al sensibilizar al ganado, causando problemas para el diagnóstico dando resultados falsos positivos (Abdalá, 1998), por lo que se recurre a la tuberculina doble comparativa (Monaghan *et al.*, 1994).

En relación al diagnóstico a partir del ADN bacteriano, se conoce que las suspensiones densas de bacterias Gram negativas, pueden liberar cantidad suficiente de ADN en condiciones bastante suaves, como una simple ebullición, congelación o una combinación de ambas. Debe considerarse también para la elaboración de un protocolo de extracción, el que las bacterias no suelen tener sustancias inhibitorias, por lo que la mayoría de los casos una extracción primaria (lisis y liberación de ADN) suele ser suficiente para obtener resultados satisfactorios, pero esto no debe ser considerado para bacterias Gram positivas (Díaz *et al.*, 2003).

2.5.1 Histopatología

La detección de lesiones durante la matanza del animal representa un procedimiento pasivo de vigilancia de la tuberculosis bovina. En la necropsia las lesiones pueden variar en cuanto a tamaño, localización y facilidad de detección. La sensibilidad de la prueba varía desde 28 a 47% y depende de la infraestructura, de la capacitación del personal, de la habilidad de los inspectores de rastro, del método empleado a la examinación (Schiller *et al.*, 2010). El examen histopatológico permite la rápida identificación de las lesiones, sin embargo, ésta técnica no puede diferenciar entre *M. bovis* y otras micobacterias (de Lisle *et al.*, 1993).

En estados iniciales de los programas de control, cuando la prevalencia de la enfermedad es alta, el diagnóstico macroscópico es importante y el cultivo es raramente requerido. Cuando la prevalencia es baja o durante las últimas etapas de las campañas de erradicación, el diagnóstico de todas las lesiones sospechosas se realiza por cultivo y al final de la campaña, cuando es muy importante el determinar el verdadero estatus de los reactores a tuberculina y cuando la lesiones dejan de ser

macroscópicas, el estudio histológico es crucial para clarificar su estatus (Collins, 2011).

La histopatología muestra alta correlación con el cultivo, sin embargo, no todos los laboratorios están equipados para realizarla; además, es una técnica *posmortem*, la cual nos confirma el estatus del animal, pero no es útil para evitar la diseminación de la enfermedad dentro del hato. Los resultados de la inspección sanitaria en combinación con análisis de laboratorio y bases de datos son muy útiles en la documentación de la presencia de la enfermedad. La inspección sanitaria debe de ser implementada como un procedimiento de rutina en cualquier tipo de rastro.

2.5.2 Baciloscopia

La baciloscopia es la prueba con la cual se inicia la investigación de la muestra histológica, la presencia del bacilo puede evidenciarse microscópicamente a partir de frotis de muestras clínicas o de preparados de tejidos. Esta es la técnica de elección para el diagnóstico rápido, ya que es simple, económica y eficiente. Por ser un bacilo ácido-alcohol resistente, su presencia puede demostrarse con la tinción de Ziehl-Neelsen. También se puede emplear inmunofluorescencia (Barrera, 2008).

Las micobacterias tienen un alto contenido de lípidos (ácidos micólicos) en la pared, gracias a esta característica los bacilos capturan en su pared la fucsina fenicada o aurammia y conservan el color a pesar de la decoloración. Así, empleando la tinción adecuada, al microscopio se observa un bastoncito rojo o fluorescente sobre un fondo de color contrastante que facilita su identificación (Barrera, 2008).

A pesar de ser una técnica práctica y económica, la baciloscopia requiere que la muestra tenga un mínimo de entre 5,000 y 10,000 bacilos. La sensibilidad de la prueba es de 30% en órganos y de 77% en esputo (Proano-Perez *et al.*, 2011).

2.5.3. PCR

En todos los organismos vivos las actividades celulares son reguladas mediante la acción de los genes (expresión génica) y esta expresión es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero (ARNm) de un gen determinado. Este hecho relevante, es el punto de partida para la identificación de un microorganismo cuando la existencia de productos celulares es posible en tejidos, si la expresión de los genes de una célula es conocida (McPherson *et al.*, 2008).

Para superar esta limitación se ha desarrollado la técnica de PCR en tiempo real (PCR-TR), también llamada PCR cuantitativa en tiempo real. Esta técnica está basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADN complementario (ADNc) específicas y así acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión genética de las células en estudio (Heid *et al.*, 1996).

La PCR-TR puede amplificar fragmentos muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de ARNm en muestras de tejidos con ARN parcialmente degradado (Bustin, 2002).

La PCR-TR permite cuantificar el DNA, gracias a la detección de fluorescencia en cada ciclo de amplificación (Cortinas *et al.*, 2002).

En esta prueba el producto de la PCR se mide al final de cada ciclo. Los datos pueden ser analizados mediante un software informático y el número de copias de ARNm o la expresión génica relativa entre varias muestras puede calcularse (Heid *et al.*, 1996).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar y comparar los resultados histopatológicos y microbiológicos en grupos de becerros vacunados y no vacunados confrontados con una cepa de campo de *Mycobacterium bovis* después de ser vacunados con un inmunógeno a base de la cepa BCG más un filtrado proteico y un adyuvante.

3.2 Objetivos Específicos

1. Cuantificar las lesiones microscópicas en los animales experimentales.
- 2.-Calificar el grado de las lesiones mostradas en los tejidos incluidos en el estudio.
3. Cuantificar la carga bacteriana a través de la estimación del número de copias de ADN de *M. bovis*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

Treinta becerras de entre 5 y 6 meses de edad, libres de tuberculosis fueron divididas aleatoriamente en tres grupos experimentales: 1. Testigo sin vacunar, 2. Vacunado con la cepa BCG (10^6 UFC en 2 ml) y 3. Vacunado con BCG (10^6 UFC) más un refuerzo con un filtrado proteico (CFP) de *M. bovis* y un adyuvante aplicado al mes de la vacunación.

Los animales se confrontaron a las 13 semanas (3 meses) posvacunación con una dosis de 5.5×10^5 bacilos en 1 ml de diluyente más 1.5 ml de PBS de *M. bovis* cepa 833, originalmente aislada en el año 2010 en el laboratorio de tuberculosis de la Facultad de Ciencias Naturales en Juriquilla, Querétaro, México, de un ganglio retrofaríngeo de una vaca Holstein-Friesian.

El proceso de nebulización tuvo una duración de 8 minutos por animal. La cámara de retención se lavó con 1 ml de PBS entre la infección de cada becerro, se desechó el líquido de lavado en gasas con fenol 5%. En cada inspiración del animal, el inoculo nebulizado es inhalado a través de una válvula de una sola vía de la máscara. El aire espirado sale a través de las válvulas de un sólo sentido ubicadas a los lados de la máscara, éstas se cubrieron con cubre bocas tipo concha para evitar la eliminación del bacilo al medio.

La infección de los animales se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias CENID-Fisiología y Mejoramiento Animal, ubicado en el kilómetro 1 de la Carretera a Colón, Ajuchitlán, Querétaro, México.

A las 20 semanas posdesafío, los animales fueron sacrificados para la cuantificación de lesiones y obtener muestras para análisis histopatológico y microbiológico. Se obtuvieron muestras de pulmones, linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales y mediastínicos de cada animal de 1 cm². Los cortes histológicos

se tiñeron con HE y ZN. El formato de captura para las muestras de histopatología se muestra en el Apéndice 1.

En todas las muestras se realizó un análisis para identificar y cuantificar (bacilos por campo microscópico) BAAR. Se obtuvo el promedio de bacilos en 100 campos con un objetivo 40x por grupo.

Para la cuantificación bacteriana, se realizó extracción de DNA a partir de 0.25gr de tejido fresco de 60 muestras de pulmón de los diferentes grupos, las cuales fueron homogenizadas con 1ml de buffer TE en un disociador de tejidos (gentle MACSTM Dissociator, Miltenyi Bistec, Version 05) programa RNA.02. Se realizó a partir de SDS (10%), proteinasa K (10 mg/ml), NaCl (5 M), CTAB (10%) y fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1). Se colectó el sobrenadante y se lavó con cloroformo-isoamílico (24:1). Se colectó nuevamente el sobrenadante y se adicionó isopropanol para precipitar el ácido nucleico. El botón se lavó con etanol (70%) y se resuspendió en agua libre de nucleasas, almacenándolo a -20°C. El DNA se cuantificó en un espectrofotómetro a 260nm (Apéndice II)

La pureza se determinó mediante el cociente 260/280 nm. Las muestras presentaron un cociente promedio de 1.87. La integridad del DNA se corroboró mediante una electroforesis en geles de agarosa (1%). La amplificación se realizó en un CFX96 Real Time System, Bio-Rad, a partir de 25 ng/μl de DNA total. La reacción se preparó con 1 μl de DNA incubado con 10 μl de Master Mix Promega (Taq DNA polimerasa (50 U/ml), dATP, dGTP, dCTP, dTTP (400 μM), MgCl₂ (3 mM)), 1 μl de M. tuberculosis complex primer/probe mix, 1 μl de control de extracción interno primer/probe mix y 7 μl de agua libre de nucleasas. Controles negativos y positivos, en lugar de DNA se colocó agua libre de nucleasas y templado positivo, respectivamente (reactivos proporcionados por el kit Quantification of *Mycobacterium tuberculosis* complex IS6110 repeat region, GENESIG, Primer Design TM) (Apéndice III).

Las condiciones de la PCR fueron: 95°C por 10 minutos, 50 ciclos de 95°C por 10 segundos y 60°C por 60 segundos. El valor de CT de cada muestra fue interpolado en una curva estándar (2×10^5 a 2×10^0 copias/ μ l) realizada a partir del templado positivo (proporcionado por el mismo kit). Los resultados se reportan en copias/ μ l.

4.2 Análisis Estadístico

Para determinar diferencia significativa entre los grupos se utilizó análisis de varianza de una vía utilizando SPSS en los datos crudos. Las diferencias en promedio de calificación de lesiones se determinaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. La comparación de la proporción de animales con lesiones por grupo se realizó con la prueba exacta de Fisher.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Conteo de lesiones

No se observó diferencia significativa ($p=0.301$) en el promedio de lesiones entre los grupos de animales vacunados y el grupo control. Sin embargo, el número promedio de lesiones fue mucho menor en los animales vacunados (grupo testigo 760; grupo BCG 322; grupo BCG + CFP 132) y de estos, el grupo vacunado con BCG + CFP, mostró el resultado más alentador. Es importante mencionar que en el grupo vacunado con BCG, un animal mostró 2300 lesiones, lo que incrementó en forma considerable el promedio de lesiones de ese grupo. En el grupo control, cuatro de los animales mostraron más de 1000 lesiones (Cuadro 1). En relación a las lesiones observadas en el linfonodo traqueobronquial, se observó una diferencia estadística entre el grupo vacunado con BCG + CFP y los grupos control y el vacunado solo con BCG, lo que podría sugerir una mayor protección en los animales vacunados con BCG + CFP.

5.2 Análisis Histopatológico.

A cuatro muestras de tejido de cada animal se le realizó un análisis histopatológicos: a linfonodos mediastínicos, linfonodos traqueobronquiales y pulmones. El análisis por baciloscopia determinó que el promedio de bacilos por 100 campos con un lente de 40x fue de 15, 6, y 2.8 bacilos para los grupos testigo, BCG y BCG + CFP respectivamente (Cuadro 2). Al comparar los grupos a través de la prueba de Kruskal Wallis, no se observó diferencias significativa ($P=0.206$). El número promedio de bacilos en el grupo control (15) fue considerablemente más alto que el que se observó en los grupos vacunados (6 y 2.8 para BCG y BCG + CFP).

Cuadro 1. Promedio de lesiones macroscópicas observadas en los órganos afectados de animales vacunados con BCG y BCG + CFP y no vacunados confrontados con una cepa de campo de *M bovis*

Órgano	Grupo	Promedio número de lesiones	Desviación estándar	IC _{95%}	Min.	Max.
Linfonodo mediastínico	Control	316 ^a	432	7-625	0	1000
	BCG	147 ^a	406	-144-437	0	1300
	BCG+CFP	48 ^a	76	-6-102	0	250
Linfonodo traqueobronquial	Control	351 ^a	473	12-689	0	1000
	BCG	114 ^a	218	-41-270	0	550
	BCG+CFP	20 ^b	31	-2-42	0	100
Pulmón	Control	91 ^a	130	-1-184	2	437
	BCG	64 ^a	155	-50-172	0	500
	BCG+CFP	61 ^a	154	-46-174	0	500

La utilidad de los diferentes métodos de diagnóstico ha sido evaluada y comparada en diferentes especies. En un programa de erradicación de tuberculosis en venado cola blanca, se evaluaron varias técnicas de diagnóstico post-mortem, histopatología, baciloscopía, cultivo y una sonda de ADN aplicada a cultivo puro. Cada una se comparó con la técnica de referencia, el cultivo. La histopatología fue la más rápida, con sensibilidad y especificidad de 98 y 87%, respectivamente. En general, la sensibilidad y la especificidad de la baciloscopía son del 90% y 97%, respectivamente (Fitzgerald, 2000).

Los métodos histológicos se han comparado con el cultivo en estadios tempranos de la enfermedad. La histopatología demostró alta sensibilidad y alta especificidad 93.4% y 92.3% respectivamente mientras que la tinción con Ziehl-

Neelsen (BAAR) mostró 33.9% y 100% respectivamente (Varello, 2008). Por otra parte, en un estudio realizado con las muestras sospechosas de la inspección en rastro, se determinó mediante la histopatología una sensibilidad del 43.5% y una especificidad del 97% al compararlas con el cultivo (Proano-Pérez *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Promedio de bacilos de *M. bovis* en 100 campos con un lente de 40x en animales vacunados con BCG, BCG + CFP y sin vacunar (control), posterior a la confrontación con una cepa de campo de *M. bovis*.

Grupo	Promedio de número de bacilos por 100 campos, lente de 40x	Desviación estándar	IC _{95%}	Min.	Max.
Control	15 ^a	30.04	-6.5-36.5	0	75
BCG	6 ^a	12.85	-3.2-15.2	0	6
BCG+CFP	2.8	3.2	0.52-5.1	0	20

5.3 Muestras con lesiones compatibles con Tuberculosis

En relación al número de muestras con lesiones compatibles a tuberculosis, en las que por lo menos una muestra de cada órgano afectado fue incluida para el análisis, la proporción fue mayor en el grupo control (55%) con un total de 22 muestras positivas de 40 tejidos, mientras que en los animales vacunados se observó un porcentaje de 45 y 37% para los grupos vacunados con BCG y BCG + CFP. El análisis estadístico a través de la Chi² mostró que estas diferencias no fueron significativas (P>0.05) (Cuadro 3). Aquí nuevamente se observa que fue el grupo vacunado con BCG + CFP en el que observaron los mejores resultados.

Cuadro 3. Número y porcentaje de muestras de tejidos positivos a la presencia de lesiones compatibles con tuberculosis detectadas mediante estudios de histopatología en animales vacunados (BCG y BCG + CFP) y grupo testigo posterior a la confrontación con una cepa de campo de *M. bovis*.

Grupo	Positivos	Proporción de positivos	Total
Control	22	55	40
BCG	18	45	40
BCG + CFP	14	37	38

5.4 Cuantificación de carga bacteriana por PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se realizó a todas las muestras de tejidos en donde previamente se demostraron lesiones acordes a tuberculosis. En ninguna de las muestras analizadas se obtuvieron resultados positivos a la presencia del bacilo tuberculoso, lo que podría ser debido a la gran dilución del material genético de *M. bovis* y en el tejido del bovino. Asimismo, el haber realizado la prueba de detección a partir de fragmentos de restricción, con las secuencias de inserción IS6110, pudieran no determinar con exactitud la presencia de *M. bovis*, al encontrarse estas en una frecuencia mucho menor que en el caso de *M. tuberculosis* lo cual es similar a lo reportado en otros estudios (Essey and Koller, 2006; Retamal *et al.*, 2003).

VI. Conclusiones

Los animales que recibieron la vacunación con la BCG + CFP mostraron una mejor protección en contra de la confrontación experimental con *M. bovis*, En ellos se determinó una menor presencia de muestras con lesiones compatibles de tuberculosis en las que por lo menos una muestra de cada órgano afectado fue incluida para el análisis, el número promedio de lesiones observadas por histopatología en los tejidos afectados fue mucho menor en los animales vacunados; además de que en los cortes histopatológicos, el análisis por baciloscopía mostró que el promedio de bacilos en los animales vacunados fue menor que en los animales testigo. Por lo anterior, se concluye que probablemente la vacunación contra la tuberculosis bovina, al disminuir las lesiones y la presencia de bacilos, podría ser una buena herramienta para disminuir la transmisión de la enfermedad en países donde se presenta una alta prevalencia.

VII. Bibliografía

- Abdalá, A., Tuberculosis Bovina.1998. Rev. Sancor, 56(604):26-30.
- Antognoli, M. C., Salman, M. D., Triantis, J. M., Hernández, J, and Keefe, T. 2001. A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13, 111-116
- Aranáz, A., Liebana, E., Mateos, A., Dominguez, L., Cousins, D. 1998. Restriction fragment length polymorphis na spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. Vet. Microbial., 61(4): 311-324.
- Aranday, E., Kaveh, D., Nuñez, J., Hogarth, P., Vordermeir, H. 2010. *Mycobacterium tuberculosis* BCG vaccination induces specific pulmonary transcripyome biodignatures in mice. Plosone, 5(6), e 11319.
- Araujo, Z., Acosta, M., Escobar, H., Baños. R., Fernández de Larrea, C., Rivas-Santiago, B. 2008. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico: Revisión. Invest. clín, Maracaibo, v. 49, n. 3, sept. . Disponible en <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332008000300012&lng=es&nrm=iso>. Consultado en 21 jun. 2013.
- Araujo, Z., de Waard, JH. 2004. Tuberculosis. Curso Latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Oct. 25- Nov. 12. Instituto de Biomedicina. UCV, Caracas, Venezuela.
- Barrera, C. 2008. Parte II Cultivo. In Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, ed. Organización Panamericana de la Salud, Mexico .DF, pp. 7-107.
- Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium intracellulare* complex MAC. Vet Res. 363:411-436.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology 29: 23-39.
- Collins, D. M. 2011. Advances in molecular diagnostics for *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol 151:2-7.
- Cortinas, M. N., Fernández, M., Valeta, M. I., Uriarte, M. del R., Mogdasy, M. C. 2002. Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. Rev. Méd. Urug. Vol.18, n.3.

Cuantificación del complejo *Mycobacterium Tuberculosis*. Para obtener información general de laboratorio y uso exclusivo en investigación. IS6110 repetir región Primer Design Ltd TM150 pruebas Advanced kit cuantificación.

CRESA (Centre de Recerca en Sanitat Animal). 2013. Tuberculosis. Citado en <http://www.cresa.es/granja/tuberculosis.pdf> Consultado el 24 de junio del 2013.

Dannenbergh, A. M. Jr, Rook, G. A. W. 1994. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: and interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses—dual mechanisms that control bacillary multiplication. En: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Washington DC: American Society for Microbiology; 459-483.

Desjardin, L. E., Y. Chen, M. D. Perkins, L. Teixeira, M. D. Cave, and K. D. Eisenach. 1998. Comparison of the ABI 7700 system (TaqMan) and competitive PCR for quantification of IS6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 36:1964–1968.

Delahay, R.J., Smith, G.C., Barlow, A.M., Walker, N., Harris, A., Clifton-Hadley, R.S., Cheeseman, C.L., 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. Vet. J. 173, 287–301.

de Lisle, G. W., G. F. Yates, and D. M. Collins. 1993. Paratuberculosis in farmed deer: case reports and DNA characterisation of isolates of *Mycobacterium paratuberculosis*. J. Vet. Diagn. Investig. 5:567–571.

Díaz, O. F., Banda, R.V., Jaramillo, M. L., Arriaga, D.C., González, S. D., Estrada-Chávez, C. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. Vet. Méx. 34 (1)

Dorronsoro, I., Torroba, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. An. Sist. Sanit. Navar. 30 (Sup. 2): 67-84.

Essey, M. A. and Koller M. A. 2006. Status of bovine tuberculosis in North America. Vet Microbiol 40:15-22.

Falkinham, J.O. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. Emerg. Infect. Dis. 9 (7): 763-767.

Fitzgerald, S. D., Kaneene, J. B., Butler, K. L., Clarke, K. R., Fierke, J. S., Schmitt, S. M., Bruning-Fann, C. S., Mitchell, R. R., Berry, D. E., Payeur, J. B. 2000. Comparison of Postmortem Techniques for the Detection of *Mycobacterium Bovis* in White-Tailed Deer (*Odocoileus Virginianus*). J Vet Diagn Invest 12:322-327.

- Fritsche, A., Engel, R., Buhl, D., Zellweger, J.P., 2004. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. *Int. J. Tuberc. Lung Dis. Off. J. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* 8, 903–904.
- Good, M. y Duignan, A. 2011. Perspectives on the History of Bovine and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Vet. Med. Int.* 410-470.
- Grant, I., Ball, H., Rowe, M., 1996. Thermal inactivation of several *Mycobacterium spp.* in milk by pasteurization. *The Society for Applied Bacteriology, Letters in Applied Microbiology.* 22, 253-256.
- Halse, TA, Escuyer, VE, and Musser, J. M. Evaluation of a Single-Tube Multiplex Real-Time PCR for Differentiation of Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 49(7), 2562-2567. 2011.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6: 986-994.
- Holsinger, V.H., Rajkowski, K.T, Stabel JR. 1997. Milk pasteurization and safety: a brief history and update. *Rev Sci Tech.* 16(2), 441–51.
- Kaneene, B.J., Miller, R.A., de Kantor, I.N., Thoen, C.O. 2010. Tuberculosis in wild animals. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14 (12), 1508-1512.
- Kubica, T., Rüsche-Gerdes, S., Niemann, S. 2003. *Mycobacterium bovis* susp. *Caprae* Causes One-Third of Human *M. Bovis*-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. *J. Clin. Microbiol.* 35 (12):3328.
- Liébana, E, A., Aranaz, A. Mateos, M. Vilafranca, E. Gomez-Mampaso, J. C. Tercero, J. Alemany, G. Suarez, M. Domingo, and L. Dominguez. 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:33–36.
- Martinilla, G. J., Ortiz, M. M., Acosta, A. M., Acosta, G. R., y Souza, Z. J. 2009. Diagnóstico de tuberculosis bovina por aislamiento bacteriológico o histopatológico de vacunos reactivos a la prueba de tuberculina. SENASA. Lima. 2-3.
- McPherson, M. J., Hames, B. D., & Taylor, G. R, 2008. *PCR a Practical Approach*. First Edition ned. Oxford University Press Oxford.
- Milián S.F., Sánchez L.M., Toledo P., Ramirez C., Santillán M.A. 2000. Descriptive Study of Human and Bovine Tuberculosis in Querétaro, México. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 42:13 -19.

- Milián S.F, Rubio V. Y. y Pérez G.L. 2013. Epidemiología de la Tuberculosis Bovina, en: La Tuberculosis Bovina en México: Las bases. INIFAP.
- Monaghan , M. L., Doherty, M. L., Collins, J.D., Kazda, J.F. and Quinn, P.J. 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 40:111-124.
- O'Reilly, L.M., Daborn CJ. 1995. The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis.* 76 (Suppl 1):1–46. [PubMed]
- OIE. 2010. Tuberculosis bovina. Artículo publicado en: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tuberculosis_bovina.pdf. Revisado 14 de junio de 2013. 4:45 pm.
- Pérez, D.C.A.C, Ortega, M.C, Dominguéz, R.L., and Sánchez-Vizcano R. J. M. 2008. Potencial utilización de la termografía infrarroja para la lectura de idtb en cabras
potencial use of infrared termography for measurement of ppd test in goats. *Rccv* 2(2), 54-59.
- Pizano M.O.E. 2013. Respuesta inmune en Tuberculosis Bovina, en: La Tuberculosis Bovina en México: Las bases. INIFAP.
- Proano-Perez, F., W. Benitez-Ortiz, D. Desmecht, M. Coral, J. Ortiz, L. Ron, F. Portaels, L. Rigouts, and A. Linden. 2011. Post-mortem examination and laboratory-based analysis for the diagnosis of bovine tuberculosis among dairy cattle in Ecuador. *Prev Vet Med* 101:65-72
- Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Álvarez, J., de Jaun, L., Bezos, J., Sánchez, C., Galka, M., Fernández, P., Mateos, A., Domínguez, L. 2008. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National park revealed by genotype variation. *Vet. Microbiol.* 132:87-95.
- Ryan, T.J., Livingstone, P.G., Ramsey, D.S.L., de Lisle, G.W., Nugent, G., Collins, D.M., Buddle, B.M., 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock; the experience. *Vet. Microbiol.* 112, 211–219.
- Scorpio, A., Collins, D., Whipple, D., Cave, D., Bates, J., Zhang, Y. 1997. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. *J Clin Microbiol.* 35:106-110.
- Schiller, I., B. Oesch, H. M. Vordermeier, M. V. Palmer, B. N. Harris, K. A. Orloski, B. M. Buddle, T. C. Thacker, K. P. Lyashchenko, and W. R. Waters. 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transbound Emerg Dis* 57:205-220.

- Tariq, M., Mirsa, M. S. S., Irshad, N.S. 2000. Detection of Mycobacterium Tuberculosis in Paraffin Embedded Intestinal Tissue Specimens by Polymerase Chain Reaction: Characterization of IS6110 Element Negative Strains. Pages with reference to book. From 174 to 178. Department of Pathology, Aga Khan University Hospital Karachi.
- Toledo, O.P. 1997. Estudio retrospectivo de 5 años de la Tuberculosis humana y bovina en Querétaro. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Thoen, O.C., LoBue, P.A., Enarson, D., Kaneene, J.B., de Kantor, I.N. 2009. Tuberculosis: a reemerging disease in animals and humans. Vet Ital. 45, 135-181.
- Tweddle, N.E, Livingstone, P. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zeland. Vet Microbiol. 40: 23-39.
- Vadillo, S., Píriz, S. y Mateos, E.. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw – Hill. Interamericana de España. Madrid, España.
- Wards, B., Collins, D., de Lisle, G. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol. 43: 227-40
- Wedlock, D.N., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Buddle, B.M., 2002. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. Microbes Infect. 4, 471–480.
- Wood, P. R. and J. S. Rothel. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. Vet Microbiol 40:125-135.
- Wolter W., Castañeda, H., Kloppert, B., Zschock M. 2004 Mastitis Bovina Prevención, Diagnóstico y Tratamiento, Editorial AL UNIVERSITARIA. Primera Edición, Guadalajara, Jalisco, Pp. 71, 72, 91.

APÉNDICE I



Formato de captura de información al sacrificio de los animales
Proyecto Evaluación de la Vacuna BCG
Dr. Feliciano Milián Suazo

Fecha: / / .

No. Animal:	Arete metálico:	Especie:	Edad:	Sexo:
Raza:	Condición Corporal (1=malo; 2= bueno; 3=bueno):			Peso al sacrificio:
Muestra enviada:	Tipo de análisis:	Método:		

Observaciones:

Nombre de quien toma los datos:

APÉNDICE II

Genesig M.R. Primer Design. 1S6110 repeat region.

Contenido del kit:

- Complejo específico de cebadores *M. tuberculosis* / sondas mezcla (150 reacciones CAFE) FAM etiquetados, BHQ inactivo.
- Plantilla de control positivo del complejo *M. tuberculosis* (para curva Standard ROJO).
- Control interno de Extracción de ADN (150 reacciones AZUL)
- El control interno extracción de cebadores / sondas mezcla (150 reacciones BROWN)
Elección de Yakima AMARILLO (VIC canal) o la etiqueta CY5.
- ACTB Endógeno cebador / sonda de mezcla (150 reacciones CAFE) FAM etiquetados, BHQ inactivo.
- RNAsa/DNAsa libre de agua.

Reactivos y equipos a ser suministrados por el usuario:

- Aparato de PCR en tiempo real.

Kit de extracción de ADN:

- Este kit está diseñado para trabajar bien con todos los procesos que producen ADN de alta calidad con un mínimo de inhibidores de PCR.

Componentes Mastermix:

- Este kit está diseñado para trabajar bien con todos los disponibles en el mercado (mezclas maestras). Sin embargo, recomendamos el uso de PrimerDesign 2x Precision™ MasterMix.
- Pipetas, agitador Vòrtex y centrífuga de pared fina
- Tubos de reacción de PCR de 1,5 ml.
- **Fundamento de la técnica**
- PCR en tiempo real detecta una señal (fluorescencia) emitida durante la reacción (de PCR), como indicador de la producción del amplicón durante cada ciclo. Los termocicladores que se usan para esta técnica tienen lectores de fluorescencia en cada ciclo que se quiera leer, que lo convierte en una mejoría a la técnica original.
- La técnica que se utilizará para este trabajo, será la denominada "cuantificación del complejo *Mycobacterium*" de laboratorios GENESIG™ Ltd que implica la repetición de la región IS6110. El kit está diseñado para tener el perfil más amplio posible de detección específica para el genoma del complejo *M. tuberculosis*.
- Las especies de micobacterias dentro de este grupo se caracterizan por tener un 99,9% de similitud a nivel de nucleótidos y 16S rRNA secuencias idénticas, pero pueden diferir ampliamente en términos de sus tropismos, fenotipos y la patogenicidad.
- Algunos de los miembros del complejo infectan solamente una especie hospedadora, mientras que otros, tales como *Mycobacterium bovis* tienen un amplio espectro de hospederos.
- Especies dentro de este grupo incluyen: *Mycobacterium tuberculosis*, la causa más común de tuberculosis (TB), *M. africanum*, una especie común en el África

occidental, que causa la tuberculosis en los seres humanos; *M. Canettii*, que también causa la tuberculosis y se ha encontrado en la región del "Cuerno de África"; *M. bovis* que causa la tuberculosis en bovinos y humanos y *M. microti* que causa la tuberculosis en roedores como los campañoles pero también ha sido informado recientemente de infectar humanos.

- **Principios de la prueba PCR en tiempo real.**
- Un complejo *M. tuberculosis* cebador específico y mezcla de sonda se proporciona y esto puede ser detectado a través del canal FAM.
- La mezcla de cebadores y la sonda proporcionado explota el llamado principio TaqMan®. Durante la amplificación por PCR, los cebadores directo e inverso se hibridan con el complejo *M. tuberculosis* DNA / cDNA. Una sonda fluorogénica se incluye en la misma mezcla de reacción que consiste en una sonda de ADN marcada con un 5`-colorante y un 3'-inhibidor.
- Durante la amplificación por PCR, la sonda se escinde y el colorante indicador y el extintor se separan. El aumento resultante en fluorescencia puede detectarse en un intervalo de tiempo real de PCR.

Recomendaciones del fabricante

Para minimizar el riesgo de contaminación con ADN extraño, se recomienda que todos pipeteados se realicen en un ambiente PCR limpio. Idealmente, esto sería un laboratorio designado PCR o PCR gabinete. Los filtros se recomiendan para todos los pasos de pipeteo.

1. Pulse y gire cada tubo en una centrífuga antes de abrirlo. Esto asegurará cebador liofilizado y la mezcla de sondas que se encuentran en la base del tubo y no se derramará al abrir el tubo.
2. Reconstituir los componentes del kit de acuerdo con la siguiente tabla:
Para asegurar la completa re suspensión, someta al Vórtex cada tubo a fondo.

Componente	Volumen
Pre-PCR sobre transparente	
Complejo M. tuberculosis Primer / sonda de mezcla (CAFÊ)	165 µl
El control interno extracción cebador / sonda mix (BROWN)	165 µl
ACTB Endógeno cebador / sonda mix (BROWN)	165 µl
Pre-PCR termosellada lamina	
Extracción de ADN de control interno (AZUL)	600 µl
Post-PCR termosellada lamina	
Plantilla de control positivo (rojo) *	500 µl

*Este componente contiene plantilla de alto número de copias y el riesgo de contaminación muy significativa. Se debe abrir y manejar en un entorno de laboratorio separado, lejos de los otros componentes.

APÉNDICE III

Extracción de ADN

La extracción de ADN de control interno: se pueden añadir al ADN de lisis / tampón de extracción a la muestra de ARN, una vez que se ha re suspendido en tampón de lisis. NO agregue la extracción de ADN de control interno directamente al estado natural biológico de muestra ya que esto conducirá a la degradación y una pérdida de señal.

1. Añadir 4µl de la extracción de ADN de control interno (azul) a cada muestra de ADNlisis / tampón de extracción por muestra.
2. Extracción completa del ADN de acuerdo con los protocolos de los fabricantes.

Detección de PCR en tiempo real.

1. Preparar una mezcla de reacción de acuerdo con las tablas siguientes:

Incluyen reacciones suficientes para los pozos de curva estándar (6 muestras por duplicado) y también el control negativo.

Mezcla para detección complejo *M. tuberculosis*.

Componente	Volumen
2 x Precisión TM MasterMix	10 µl
Complejo M. tuberculosis Primer / sonda de mezcla (CAFE)	1 µl
El control interno extracción cebador / sonda mix (CAFE)	1 µl

RNAsa / DNAsa libre de agua (BLANCO)	3 μ l
Volumen final	15 μ l

Mezcla de detección endógeno ACTB (Opcional)

Componente	Volumen
2 x Precisión TM MasterMix	10 μ l
ACTB Endógeno Primer / sonda de mezcla (CAFE)	1 μ l
RNAsa / DNAsa libre de agua (BLANCO)	4 μ l
Volumen final	15 μ l

2. Pipetear 15 μ l de esta mezcla en cada pocillo de acuerdo con su experimental PCR en tiempo real.

3. Preparar plantillas de muestra de ADN para cada una de las muestras (concentración sugerido 5ng/ μ l) en RNAsa / DNAsa libre de agua. Si la concentración de ADN no se conoce, a continuación, diluir la muestra de ADN reacciones 1:20 (10 μ l de la muestra de ADN y 190 μ l de agua).

4. Pipetear 5 μ l de plantilla de ADN diluido en cada pocillo, de acuerdo con su experimental. Para el control negativo pozos utilizar 5 μ l de RNAsa / DNAsa libre de agua. El volumen final en cada pocillo es 20 μ l.

5. Preparación de series de dilución estándar de la curva.

- a) Pipetear 900µl de RNAsa / DNAsa libre de agua en 5 tubos y etiquetas 2-6
- b) Pipetear 100µl de plantilla de control positivo (rojo) en el tubo 2
- c) Vórtex a fondo
- d) Cambio de puntas de pipeta y pipeta 100µl de tubo 2 en el tubo 3
- e) Vórtex a fondo

Repetir los pasos d y e, para completar la serie de dilución.

Curva Estándar	Número de copia
Tubo1 control positivo	2 x 10 ⁵ por µl
Tubo2	2 x 10 ⁴ por µl
Tubo3	2 x 10 ³ por µl
Tubo4	2 x 10 ² por µl
Tubo5	20 por µl
Tubo6	2 por µl

6. Pipetear 5µl de plantilla estándar en cada pozo, de acuerdo con su placa experimental establecida.

El volumen final en cada pocillo es 20µl.