

CORRELACIÓN ENTRE PCR EN EXUDADO NASAL Y LA REACCIÓN DE TUBERCULINA PARA LA DETECCIÓN DE ORGANISMOS DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis* EN BOVINOS.

Correlation Between PCR and Tuberculin Test for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Cattle.

Alberto Morales Loredó¹, Katia Peñuelas Urquides³, Genoveva Álvarez Ojeda¹, Irma O. Martínez Vázquez²,
Jesús Maldonado⁶, Gerardo Mendoza Dávila⁴ y Feliciano Milián Suazo⁵

¹ CIR-Noreste. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 4.5 Carretera a Reynosa, Guadalupe, Nuevo León. E-mail: morales.alberto@inifap.gob.mx. ² Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL),

³ Centro de Investigaciones Biomédicas del Noreste, ⁴ Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del estado de Nuevo León, A. C. y ⁵ Programa Nacional de Epidemiología, CENIDFA-INIFAP. ⁶ Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Núcleo "Héctor Ochoa Zuleta", Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Venezuela.

RESUMEN

En México, la tuberculosis (TB) es motivo de regionalización del país de acuerdo a la prevalencia, por tal motivo, la comercialización y/o exportación de bovinos, así como su movilización, es restringida. El diagnóstico oficial de la TB en bovinos en campo se realiza con la prueba de tuberculina, y posmortem con histopatología y/o por aislamiento del agente etiológico. Aunque la prueba de la tuberculina tiene baja especificidad, es suficiente para enviar animales reactores a sacrificio, lo que no garantiza que el animal esté infectado. Lo anterior, hace patente la necesidad de métodos más sensibles y específicos. En la presente investigación se analizaron muestras de exudado nasal de bovinos, para detectar microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todos los animales positivos a la tuberculina se consideraron como animales infectados y éstos fueron comparados con los positivos a PCR. Se muestrearon 420 animales provenientes de zonas de alta y baja prevalencia. El ADN de los exudados nasales se obtuvo con el método de extracción bromuro de cetiltrimetilamonio, y éste se utilizó en una PCR anidada para amplificar dos fragmentos (583 pb y 200 pb) de la secuencia IS6110 del complejo *M. tuberculosis*. La prueba de PCR logró detectar un mayor número de muestras positivas en las zonas de alta prevalencia (57%), comparada con las zonas de baja prevalencia (20%).

La sensibilidad de la prueba de PCR fue del 90,5% y la especificidad del 58,3%, comparada con la prueba de tuberculina. Quedó demostrado que la prueba de PCR en secreciones nasales puede utilizarse en situaciones de compra-venta o en exposiciones ganaderas como un análisis de tamizaje para prevenir el contagio y la introducción de la enfermedad a rebaños sanos.

Palabras clave: Tuberculosis, tuberculina, *Mycobacterium*, diagnóstico molecular, PCR.

ABSTRACT

In Mexico, the bovine tuberculosis (TB) is associated with both regionalization of the country, considering the levels of prevalence of the disease and restrictions in commercialization and/or exportation of cattle. In Mexico, the diagnosis of the bovine tuberculosis is conducted by using the tuberculin test in live animals, bacteriologic isolation and histopathological analysis in postmortem. Although the low sensibility of tuberculin test, is used to sent the animal reactors to slaughter and maybe the animal is not infected. Considering that some diagnosis methods are not sufficiently reliable and specific to detect the presence of the casual agent of this disease, the use of the polymerase chain reaction (PCR) test was evaluated from bovine nasal mucus. For the detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, PCR of nasal mucus was better than Caudal-fold Tuberculin Test (CTT). The sensibility of PCR compared with CTT was 90.5% and specificity was 58.3%. The

PCR of nasal mucus can use in buy and sell operations and cattle expositions to prevent the contagious and the introduction the pathogens in health cattle.

Key words: Tuberculosis, Tuberculin, *Mycobacterium*, molecular diagnosis, PCR.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, formado por *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* y *M. canettii*. El hombre es el hospedador 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 peligrosa [6].

En los animales, la tuberculosis provoca pérdidas de peso y hasta 17% menos de leche. Dado que la distribución de la TB no es homogénea, la movilización y comercialización de ganado es restringida. Para reducir los efectos de la enfermedad en México se creó la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-96 [5]. La exportación de ganado bovino en pie hacia Estados Unidos de América (EUA), puede verse afectada por la presencia de lesiones tuberculosas en animales de origen mexicano sacrificados en aquel país, por lo que los exportadores mexicanos deben asegurarse de que los animales no vayan infectados. La prueba de tuberculina tiene como desventaja que puede dar falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras micobacterias [3]. Por lo anterior, se corre el riesgo de diagnosticar animales positivos sin estar infectados y además de cuarentenar de manera equivocada por la baja especificidad y sensibilidad (60 a 70%) de la prueba.

El diagnóstico definitivo de la tuberculosis se hace por el aislamiento del agente etiológico a partir de lesiones de ganglios y tejido pulmonar, pero éste es un proceso que puede durar de 4 a 8 semanas. El contar con métodos de diagnóstico más sensibles y específicos y que además reduzcan el tiempo para obtener los resultados finales, es la meta de cualquier campaña de control y eliminación de la tuberculosis bovina.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica que ha demostrado su utilidad en la identificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en diferentes tipos de tejido [1,7,11,12]. La PCR se ha utilizado en la detección *M. tuberculosis* en muestras de esputo [12], tejido fresco, cultivos puros [11] y *M. bovis* a partir de muestras de exudado nasal, sangre y leche [7]. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se han hecho con muestras obtenidas después del sacrificio del animal, lo que los hace de poca utilidad para tomar decisiones respecto a cuarentenar o no un rebaño sospechoso.

La vía principal de contagio de la tuberculosis bovina es la aérea, entonces uno de los tejidos con mayor concentración

de bacilos tuberculosos en un animal infectado es el exudado nasal, muestra de fácil acceso en el animal vivo, por lo que sería adecuada para utilizarla en la técnica de PCR para la detección de organismos del complejo *M. tuberculosis*. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue correlacionar la respuesta a la tuberculina con PCR, para apoyar el diagnóstico de tuberculosis bovina en ganado en pie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras biológicas

Muestras de exudado nasal se tomaron a 420 bovinos adultos; 93 de una zona de baja prevalencia y 327 de una zona de alta prevalencia. Los animales provenientes de zonas de baja prevalencia fueron de raza Santa Gertrudis en explotaciones extensivas y los de alta prevalencia fueron: 56 de las razas Holstein o Jersey de diferentes explotaciones intensivas y 271 de la raza Beefmaster pertenecientes a una sola explotación. El exudado se tomó con un hisopo de 15 cm de largo de la marca comercial Dequinsa®. El hisopo se introdujo en su totalidad en el ollar del animal. Una vez tomada la muestra, el hisopo se depositó en un tubo de ensayo con tapón de rosca con 5 mL de solución salina 0,85%. Las muestras se mantuvieron en hielo durante el transporte al laboratorio para su análisis.

Extracción de ADN

El ADN se obtuvo por el método de extracción bromuro cetiltrimetilamonio (CTAB), lisozima y proteinasa K. La muestra de exudado se sometió a ebullición durante 5 min para inactivar las bacterias. Luego se tomaron 3 mL de muestra y se obtuvo la pastilla que se almacenó a -20°C hasta la extracción de ADN. El resto de la muestra se guardó en refrigeración hasta la verificación de los resultados. A cada pastilla se le agregó 50 µL de lisozima (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 1 h o toda la noche. Posteriormente, se le añadieron 70 µL de SDS al 10% y 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubaron a 65°C durante 10 min. Después se agregó 100 µL de NaCl 5M y 100 µL de CTAB (2% P/V CTAB, 10 mM Tris-HCl pH 8; 20 mM EDTA pH 8; 1,4 M NaCl, 1% PVP 40.000) y se incubaron a 65°C durante 10 min. Para inactivar las enzimas las muestras se hirvieron por 5 min, después se agregaron 750 µL de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), la mezcla se homogeneizó por inversión y se centrifugó a 10.000 x g durante 6 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo eppendorf de 1,5 mL de capacidad y se le agregaron 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico. Se mezcló suavemente y se incubó a -20°C durante media hora como mínimo y se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de etanol frío al 70% para lavar la pastilla obtenida. Se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min. Se decantó el alcohol al 70% y se dejó secar el botón de ADN a temperatura ambiente. Se resuspendió el ADN en 20 µL de solución amortiguadora TE pH 8,0 y se almacenó a -20°C hasta su utilización [2]. Para

descartar posibles contaminaciones de reactivos y soluciones, en la extracción de ADN se utilizaron blancos de solución salina 0,85% a los cuales se les realizó el mismo procedimiento de extracción de ADN.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En la PCR se utilizaron los iniciadores reportados por Wilson y cols. [12]. Los dos pares de iniciadores reconocen la secuencia de inserción IS6110 de organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En la primera reacción de PCR se utilizaron los iniciadores externos que amplifican un fragmento de 583 pb. En una segunda reacción se utilizó como templado el producto de PCR de la primera reacción y los iniciadores internos que amplifican un fragmento de 200 pb.

Las reacciones de PCR para los iniciadores externos se realizaron en volúmenes de 25 µL, utilizando 1X de amortiguador para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM KCl), 1,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada uno de los 4 dNTPs (Promega), 25 pmoles de cada iniciador externo, 2,5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Bioline) y 2 µL de DNA templado. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Express (Thermo Hybaid. EUA), las condiciones fueron: un ciclo de desnaturalización inicial a 93°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 93°C durante 45 seg, alineamiento de iniciadores a 65°C durante 1 min y una extensión a 72°C durante 45 seg, con una extensión final a 72°C durante 10 min.

Posteriormente se realizó la reacción de PCR para la amplificación con iniciadores internos en un volumen de 25 µL, con 1X de amortiguador para PCR (200 mM Tris-HCl pH 8,0; 500 mM KCl), 1,0 mM de MgCl₂, 200 µM de cada uno de los 4 dNTPs (GIBCO-BRL), 25 pmoles de cada iniciador, 2,5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa y 2 µL de producto de PCR realizada con iniciadores externos. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Express (Thermo Hybaid. EUA): Las condiciones fueron: un ciclo de desnaturalización inicial de 93°C durante 2 min, seguido de 50 ciclos de tres pasos: desnaturalización a 93°C durante 45 seg, alineamiento de iniciadores a 48°C durante 45 seg, extensión a 72°C durante 45 seg, con una extensión final a 72°C durante 10 min. Como controles positivos en las reacciones de PCR se utilizó la cepa vacunal de *M. bovis* BCG y la cepa Danesa 1331 *Statens Serum Institut*, Dinamarca.

Electroforesis

Los productos de PCR fueron fraccionados en geles de agarosa al 1,5% por 40 minutos a 100 volts. En los geles se cargaron 4 µL del producto de PCR más 2 µL de solución amortiguadora de carga (0,25% P/V azul de bromofenol, 0,25% P/V xilencianol, 30% P/V glicerol). Enseguida se analizaron bajo luz ultravioleta y mediante fotografía tomada con cámara Polaroid y película A667 adaptada con filtro para luz ultravioleta. Los productos de PCR en donde la banda no se

visualizó claramente, se corrieron en geles de poliacrilamida al 6% con una duración de corrida de aproximadamente 1,5 h a 100 volts. Se utilizó el mismo volumen de productos de PCR que en los geles de agarosa al 1,5%.

Análisis estadístico

Para determinar la utilidad de la PCR en el diagnóstico de TB en exudado nasal, los resultados de ésta se compararon con los resultados de la prueba de tuberculina, considerada como prueba oficial, ya que indica si los animales se van a sacrificio. Se determinó la sensibilidad y la especificidad de la PCR al considerar la prueba de tuberculina como prueba de oro [4]. La sensibilidad es la relación porcentual de concordancia positiva, muestras del cuadrante (a) y la sumatoria de los cuadrantes (a) y (b). La especificidad de la prueba de PCR, es la relación porcentual de concordancia negativa, muestras del cuadrante (d) y la sumatoria de los cuadrantes (c) y (d), considerando los valores de la TABLA II.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a la prueba de PCR, el ADN obtenido se visualizó en geles de agarosa al 0,8%. La cantidad y calidad de ADN obtenido en todas las muestras permitió amplificar la secuencia blanco en las reacciones de PCR anidado. Cabe mencionar que la primera reacción del PCR, con los iniciadores externos, no generó una amplificación con suficiente intensidad en las muestras de exudado de manera que se observará como una banda en un gel de agarosa. En la segunda reacción de PCR, con los iniciadores internos, se generó un fragmento de 200 pb correspondiente a la secuencia de inserción IS6110 del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (FIG. 1).

En la zona de alta prevalencia 63 de 327 animales (19%), fueron reactivos a la prueba de la tuberculina; y 187 de los 327 (57%) fueron positivos a la PCR en exudado nasal. La mayoría de los positivos estuvo dada por un rebaño de raza de ganado Holstein, donde todos los animales probados fueron diagnosticados como positivos, tanto a tuberculina como a PCR, y por un rebaño de animales de la raza Beefmaster, donde el 14% de los muestreados fueron positivos a tuberculina y el 57% a PCR (TABLA I). El alto porcentaje de detección por PCR y tuberculina en la zona de alta prevalencia, concuerda con las medidas de bioseguridad tomadas en ese lugar por problemas de tuberculosis (comunicación personal del Veterinario aprobado por la SAGARPA). En el caso de la zona de baja prevalencia ningún animal resultó positivo a la prueba de la tuberculina (0%), pero si se tuvieron 19 (20%) muestras de exudado nasal positivas a PCR.

Se aplicó la fórmula reportada por Malorny y cols. [4] y se estimaron los valores de sensibilidad y especificidad para la prueba de PCR. La sensibilidad es la relación porcentual de concordancia positiva (57) muestras del cuadrante (a) y la sumatoria (63) de el cuadrante (a) y (b). Expresado de otra for-

TABLA I
RESULTADOS A LAS PRUEBAS DE TUBERCULINA Y PCR DE GANADO LOCALIZADO EN ZONAS DE ALTA Y BAJA PREVALENCIA DE TUBERCULOSIS EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO/TUBERCULIN TEST AND PCR RESULTS OF CATTLE LOCALIZED ON HIGH AND LOW PREVALENCE ZONES OF TUBERCULOSIS IN NUEVO LEON STATE, MEXICO.

	Número de muestras	Tuberculina		PCR	
		Positivo	Porcentaje	Positivo	Porcentaje
Alta prevalencia Raza Holstein	25	25	100	25	100
Alta prevalencia Holstein y Jersey	31	0	0	7	22
Alta prevalencia Raza Beefmaster	271	38	14	155	57
Subtotal	327	63	19	187	57
Baja Prevalencia Raza Santa Gertrudis	93	0*	0	19	20
Subtotal	93	0	0	19	20
Total	420	63	15	206	49

*Datos reportados por el Médico Veterinario aprobado por la SAGARPA para realizar la inspección sanitaria.

TABLA II
RESULTADOS DE PCR Y TUBERCULINA PARA ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD/PCR AND TUBERCULIN RESULTS TO SENSIBILITY AND SPECIFITY ANALYSIS

PCR	Tuberculina	
	Positivos	Negativos
Positivos	a (57)	c (149)
Negativos	b (6)	d (208)

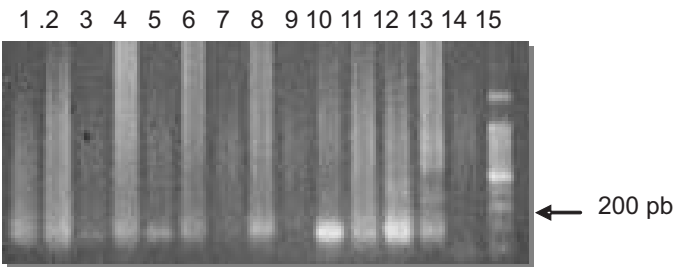


FIGURA 1. RESULTADOS DE PCR A PARTIR DE ADN OBTENIDO DE EXUDADO NASAL. CARRILES 1, 3, 5, 7, 9 y 11 = PCR A PARTIR DE MUESTRAS OBTENIDAS CON UN HI-SOPO DE 10 CM; CARRILES 2, 4, 6, 8, 10, 12 = PCR A PARTIR DE MUESTRAS OBTENIDAS CON UN HI-SOPO DE 15 CM; CARRIL 13 = CONTROL POSITIVO ADN DE CEPA *M. bovis* (AN5); CARRIL 14 = CONTROL NEGATIVO Y CARRIL 15 = LADDER 100/ PCR RESULTS OF DNA OBTAINED FROM NASAL MUCUS. LANES 1, 3, 5, 7, 9 AND 11 = PCR OF SAMPLES OBTAINED WITH COTTON SWABS OF 10 CM; LANES 2, 4, 6, 8, 10, 12 = PCR OF SAMPLES OBTAINED WITH COTTON SWABS OF 15 CM; LANE 13 = POSITIVE CONTROL OF *M. bovis* DNA STRAIN AN5; LANE 14 = NEGATIVE CONTROL AND LANE 15 = LADDER 100.

ma, la sensibilidad es un indicador de predictibilidad positiva (congruencia positiva/total de resultados positivos por prueba estándar) $[(a)/(a+b)] \times 100$ (TABLA II). La prueba de PCR dio una sensibilidad del 90,5%, este valor es debido a que posiblemente no todos los animales enfermos de tuberculosis eliminan micobacterias o lo hacen de manera intermitente. La explicación a lo anterior, es que cuando hay lesiones en los nódulos linfáticos del sistema respiratorio y en pulmones, los animales enfermos son considerados excretores, pero cuando las lesiones no están presentes, este animal aunque sea considerado enfermo, no elimina micobacterias, por lo que se considera no excretor. Se ha reportado que el porcentaje de animales reactivos que presentan lesiones en el tracto respiratorio es de 90% [10]. Por lo tanto, en este estudio se considera que existe la posibilidad que en el 90% de los casos cuando se detecta a la micobacteria, podría tratarse de un animal con lesiones en nódulos linfáticos. Cuando la infección se localiza en otros órganos según el modo de transmisión de la enfermedad, la bacteria es eliminada en otras secreciones corporales como la orina. De tal manera que, cuando la infección es adquirida por vía digestiva, la eliminación de las micobacterias no sería por exudado nasal, por lo que no sería detectado por PCR a partir de exudado. Por lo tanto, la prueba de PCR tiene utilidad en las infecciones adquiridas por vía aerógena.

Si se considera que la prueba de PCR sólo detecta el ADN del patógeno (vivo o muerto) a partir de exudado nasal, un resultado positivo por PCR no podría indicar que el animal esté enfermo. Al comparar los resultados de zonas de alta prevalencia con respecto a los de zonas de baja prevalencia, se encontró un porcentaje mayor de positivos por PCR en la zona de alta prevalencia (57,2%) de tal manera que se puede pensar que están relacionados con la infección de bacilos del complejo *M. tuberculosis*, y que por lo tanto, puedan desarrollar reacción a tuberculina en pruebas futuras.

La especificidad de la prueba de PCR, según los valores de la TABLA II y la aplicación de la fórmula $[d/(c+d)] \times 100$ de Malorny y cols. [4] fue del 58,3%. Este valor probablemente se debió a que dentro de los 357 animales negativos a tuberculina se detectaron 149 casos positivos por PCR (TABLA II). Lo anterior pudiera explicarse de dos formas, la primera es que pueda deberse a una falla en la prueba de tuberculina (animales anérgicos) lo cual está ampliamente reportado, sin saberse con exactitud este mecanismo de anergia a la tuberculina. La anergia se cree que es debido a una supresión de la respuesta inmune por los linfocitos T supresores en los casos de tuberculosis en etapa final o muy avanzada [8]. En los casos de infección por micobacterias en etapa inicial puede explicarse la anergia debido a que la prueba de tuberculina está basada en una reacción de hipersensibilidad retardada mediada por células y por lo tanto, en los primeros estadios de la infección, este tipo de inmunidad todavía no está desarrollada [2]. La segunda explicación sería que pudiera deberse a falsos positivos por PCR (detección de microorganismos del complejo *M. tuberculosis* muertos y sin riesgo para el rebaño), es decir, micobacterias muertas inhaladas del medio ambiente. Sin embargo, está ampliamente reportada la alta resistencia de las bacterias del complejo *M. tuberculosis* al medio y a la desinfección con productos químicos, debido al alto contenido de lípidos de su pared celular y por lo tanto, permanecen viables por días e incluso meses [9]. Se ha encontrado que *M. bovis* puede permanecer vivo en agua durante 37 días si se expone a los rayos solares directos y durante 71 a 84 días a la sombra. Asimismo, el polvo contaminado con esputo seco infectado de bacilos, puede ser infectivo durante 8 a 10 días y sólo unos pocos microorganismos se requieren para causar la infección. Es importante resaltar, que ésta es la ruta más importante de transmisión y entre el 90-95% de los casos se transmiten por esta vía, debido a que los bacilos tuberculosos se encuentran en el núcleo de gotas resultantes de la espiración de los animales infectados y pueden permanecer suspendidas en el aire durante días [11].

CONCLUSIONES

Quedó demostrado que existe un mayor porcentaje de bovinos portadores de microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en las zonas de alta prevalencia.

La prueba de PCR en secreciones nasales puede utilizarse como apoyo a la prueba de tuberculina y realizarse únicamente a los animales negativos a esta prueba, lo que optimizaría los mecanismos de diagnóstico y control de la enfermedad.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación Produce Nuevo León, A. C. por el financiamiento otorgado y al INIFAP por el apoyo económico recibido mediante la actividad de tecnología a transferir como meta presidencial.

Se agradece al Laboratorio Central Regional de Monterrey del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del es-

tado de Nuevo León, A. C., por las facilidades y apoyo recibido en la obtención de muestras de campo.

Al apoyo prestado por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular (LDM), UCLA, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COUSINS, D.; WILTON, S.; FRANCIS, B.; GOW, B. Use of Polymerase Chain Reaction for Rapid Diagnosis of Tuberculosis. **J Clin Microbiol.** 30(1) 255-258. 1992.
- [2] EDWARDS, K.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. **Nucleic Acids Res.** 19(6): 1349. 1991.
- [3] GROOMS, D.; MOLESWORTH, J. Caudal-fold tuberculin Test. Michigan State University. Extension Bulletin E-2730 August.. 1-2pp. 2000.
- [4] MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBROEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of *Salmonella* specific PCR-based method. **Intern J Food Microbiol.** 89(2-3): 241-249. 2003.
- [5] NORMA OFICIAL MEXICANA-NOM-031-ZOO-96. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina [*Mycobacterium bovis*]. *Diario Oficial de la Federación*. DX 6: 35. 1996.
- [6] O'REILLY, L.; DABORN, C. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. **Tuber Lung Dis.** 76: 1-46. 1995.
- [7] ROMERO, R.; GARZÓN, D.; MEJÍA, G.; MONROY, W.; PATARROYO, M.; MURILLO, L. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. **Can J Vet. Res.** 63: 101-106. 1999.
- [8] TIZARD, I. Definiciones Inmunitarias Primarias. **Inmunología Veterinaria.** (3a Ed.). Interamericana McGrawHill, México. 414 pp. 1987.
- [9] VERA, A. "Supervivencia de *Mycobacterium bovis* en agua". **Rvta. Cub. Cienc. Vet.** 15: 243. 1984.
- [10] VITALE, F.; CAPRA, G.; MAXIA, L.; REALE, S.; VESCO, G.; CARACAPPA, S. "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Cattle by PCR Using Milk, Lymph Node Aspirates and Nasal Swabs". **J of Clin Microbiol.** 36(4): 1050-10554. 1998.
- [11] WARDS, B.; COLLINS, M.; LISLE, W. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissue by polymerase chain reaction, **Vet. Microbiol.** 43(2-3): 227-240. 1995.
- [12] WILSON, S.; Mc NERNEY, R.; NYE, P.; GODFREY-FAUSSETT, P.; STOKER, N.; VOLLER, A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis tuberculosis. **J. Clin. Microbiol.** 31(4): 776-782. 1993.