



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

---

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DE TUBERCULOSIS  
BOVINA EN GANADO LECHERO DEL COMPLEJO  
AGROPECUARIO E INDUSTRIAL DE TIZAYUCA (CAIT),  
HIDALGO.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:  
**LIZBETH RAMÍREZ PÉREZ**

Director de tesis:  
**Dr. Juan Ocampo López**

Co-Directores de tesis:  
**Dra. Patricia B. García Reyna  
MVZ M.C Orbelín Soberanis Ramos**

Tulancingo de Bravo, Hidalgo.

2011.

## DEDICATORIA

*A Ti, el amigo de toda mi vida, mi fortaleza, por llevarme a tu lado a lo largo de esta vida siempre llenándome de alegría y gozo y no dejarme caer nunca.*

*A mis padres el Sr. Prospero Ramírez Terrazas y a la Sra. Rosa Pérez Vargas, por ser los mejores, por su amor, apoyo incondicional, y que dentro de sus preocupaciones me dieron la posibilidad de brillar, gracias porque sin ustedes y sus enseñanzas no estaría aquí ni sería quien soy ahora. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño.*

*A mi abuelita Angelita Terrazas Delgadillo, porque siempre ha sido y será un ejemplo de valor, fortaleza y lucha, un estímulo a querer vivir y sacarle todo el jugo a la vida.*

## AGRADECIMIENTOS

*Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México Proyecto M0009-2008-1-96469 “Dinámica de la transmisión de la tuberculosis bovina a humano en una población de alto riesgo, en el estado de Hidalgo”.*

*Son muchas las personas especiales a las les agradezco su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras están en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en dónde estén o si alguna vez llegan a leer estas líneas, quiero darles mis más sinceros agradecimientos por formar parte de mi, por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones. ....*

*A mi familia especialmente a mis hermanas Alejandra Ramírez Pérez y Claudia Ramírez Pérez por ser como son, por todo su apoyo y cariño. A mis abuelitos: Eva y Silvestre por todos sus buenos consejos, mis tíos, mis tías, mis primas y primas por creer siempre en mí.*

*A todos mis profesores no solo de la carrera sino de todo la vida, mil gracias porque de alguna manera forma parte de lo que soy ahora. Pero en especial a aquellos que empezaron junto con mis compañeros un sueño hace 5 años, a los cuales les tengo un profundo agradecimiento y admiración, y que siempre tuvieron tiempo para mí, para platicar, darme consejos o bien un regaño, tendiéndome la mano cuando más los necesite. Al igual que me dieron la oportunidad de trabajar con ellos y no solo de ser un mejor profesionalista, sino un mejor ser humano: Dra Rosalinda Acosta Salinas, Dr. Ciro Estrada Chavez, Dr Juan Antonio Montaña Hirose, Dr. Juan Ocampo López, Dra. Patricia B. García Reyna, Dr. Víctor Martínez Juárez, MC José Ignacio Olave Leyva, Dra María de Rosario Badillo Jiménez, Dr. Jesús G. Peralta Ortiz*

*A la Dra. Patricia B García Reyna y al Dr. Juan Ocampo López por su apoyo, paciencia, y su inestimable ayuda, y por darme la oportunidad de conocer un área la cual, no había conocido: la histopatología.*

*A la Dra. Miriam Bobadilla del Valle, Dr. Orbelín Soberanis Ramos, Dr. Mario Santacruz por haberme permitido trabajar con su maravilloso equipo de trabajo, por compartir su conocimiento conmigo e inspirar en mi mucha admiración.*

*A mis amigos: Patricia Padilla Aguilar, Zuraya Arellano Balderrama, Juan Carlos Cortez Sánchez, Raúl Amador Juárez, porque gracias a ellos sé lo que es la amistad verdadera, valor importante en mi vida, gracias por estar conmigo este tiempo, por aconsejarme, regañarme, compartir risas y llantos en todo este tiempo.*

*A mis compañeros de primera generación, que han sido como una familia para mí, con los cuales he compartido tantos momentos, y que puedo contar con ellos al igual que ellos conmigo, aunque ya no estemos tan juntos como antes, siempre estarán en mi corazón.*

*A Omar, Luz, José Luis, Nadia, Dafne, Aline, Verónica por brindarme todo su apoyo y alegría durante mi estancia en el laboratorio de histología.*

*A mi Angelito por ser quien eres y formar parte de mí y por todo el apoyo incondicional que me has brindado.*

*Becas de movilidad Santander Universia para las instituciones del espacio común de educación superior (ECOES).*

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	III
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
RESUMEN .....	V
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Definición .....	1
1.2 Antecedentes históricos .....	1
1.3 Importancia económica .....	2
1.4 Importancia de la salud pública .....	3
1.5 Características generales de las micobacterias .....	4
1.6 Epidemiología.....	5
1.6.1 Resistencia ambiental .....	5
1.6.2 Periodo de incubación .....	5
1.6.3 Hospederos .....	5
1.6.4 Transmisión.....	5
1.7 Patogenia .....	6
1.8 Inmunopatogenia.....	9
1.9 Diagnóstico.....	9
1.9.1 Aislamiento e identificación bacteriológica .....	9
1.9.2 Intradermoreacción (Prueba de tuberculina) .....	11
1.9.3 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) .....	11
1.9.4 Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) .....	12
1.9.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	13
1.9.6 Histopatología .....	13
1.9.7 Inspección <i>post-mortem</i> (IPM) .....	13
II.CONTROL.....	15
III. JUSTIFICACIÓN .....	16
IV.HIPÓTESIS.....	17
V. OBJETIVOS.....	17
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	18
6.1 Diseño epidemiológico del estudio .....	18
6.2 Población de estudio .....	18
6.3 Lugar de estudio.....	18

<b>VII. METODOLOGÍA</b> .....	<b>18</b>
<b>7.1</b> Recolección de la muestras biológicas .....	<b>18</b>
<b>7.2</b> Procesamiento de las muestras biológicas para cultivo .....	<b>20</b>
<b>7.3</b> Procesamiento de las muestras biológicas para histopatología.....	<b>21</b>
<b>7.4</b> Coloración de las preparaciones histopatológicas obtenidas .....	<b>23</b>
<b>7.5</b> Observación microscópica e interpretación.....	<b>27</b>
<b>VIII.RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
<b>IX.DISCUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>X.CONCLUSIONES</b> .....	<b>40</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>41</b>
<b>XII.REFERENCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>XIII. ANEXOS</b> .....	<b>47</b>
<b>Anexo I:</b> Preparación de soluciones .....	<b>47</b>
<b>Anexo II:</b> Preparación de colorantes .....	<b>49</b>
<b>Anexo III:</b> Bitácora de muestras recolectadas sugerentes a tuberculosis .	<b>50</b>
<b>Anexo IV:</b> Mapa del CAIT .....	<b>52</b>
<b>Anexo V:</b> Hoja de valoración histopatólogica de tejidos recolectados .....	<b>53</b>
<b>Anexo VI:</b> Hoja de clasificación de los granulomas .....	<b>54</b>
<b>Anexo VII:</b> Resultados de las evaluaciones histopatológicas .....	<b>55</b>
<b>Anexo VIII:</b> Resumen de los grados de los granulomas, ZN y cultivo .....	<b>64</b>
<b>Anexo IX:</b> Granuloma tipo I .	<b>66</b>
<b>Anexo X:</b> Granuloma tipo II .....	<b>67</b>
<b>Anexo XI:</b> Granuloma tipo III .....	<b>68</b>
<b>Anexo XII:</b> Granuloma tipo III .....	<b>69</b>
<b>Anexo XIII:</b> Célula gigante.....	<b>70</b>
<b>Anexo XIV:</b> Granuloma tipo IV .....	<b>71</b>
<b>Anexo XV:</b> Granuloma tipo IV .....	<b>72</b>
<b>Anexo XVI:</b> Granuloma tipo IV .....	<b>73</b>
<b>Anexo XVII:</b> Tinción de ZN .....	<b>74</b>
<b>Anexo XVIII:</b> Análisis estadístico .....	<b>75</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Situación zoonosanitaria de la TBb.....	15
2. Procesador automatizado de tejidos .....	22
3. Microtomo.....	23
4. Tren de coloración de Hematoxilina-Eosina (H-E) .....	25
5. Tren de coloración de Ziehl Neelsen (ZN).....	26
6. Linfonodos con lesiones sugerentes a TBb.....	30
7. Granuloma tipo I.....	66
8. Granuloma tipo II.....	67
9. Granuloma tipo III.....	68
10. Granuloma tipo III .....	69
11. Célula gigante .....	70
12. Granuloma tipo IV .....	71
13. Granuloma tipo IV .....	72
14. Granuloma tipo IV .....	73
15. Tinción ZN.....	74

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Protocolo de infiltración .....	<b>22</b>
2. Resumen de las evaluaciones histopatológicas.....	<b>31</b>
3. Resumen de los resultados de la tinción de ZN.....	<b>32</b>
4. Resultados del cultivo a <i>Mycobacterium bovis</i> .....	<b>33</b>
5. Interpretación de la prueba de <i>Kappa</i> .....	<b>33</b>
6. Asociación entre granuloma con la tinción de ZN. ....	<b>75</b>
7. Asociación de ZN y cultivo .....	<b>75</b>
8. Asociación entre granuloma y cultivo .....	<b>75</b>

## **RESUMEN**

La tuberculosis bovina (TBb) es considerada como un problema de salud pública y una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria ganadera. El objetivo del presente trabajo fue realizar el diagnóstico histopatológico de la tuberculosis bovina en el Complejo Agroindustrial de Tizayuca (CAIT), ubicado en Tizayuca, Hgo. Se muestrearon un total de 50 bovinos obteniendo un total de 341 muestras: los órganos recolectados fueron los siguientes: linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos, mesentéricos, retromamarios y en algunos casos hepáticos; pulmones (lóbulos craneales) y glándula mamaria; los cuales presentaron lesiones sugerentes a tuberculosis.

A los 50 bovinos que llegaron a la sala de necropsias, se les realizó la inspección *post mortem* (IPM), se colectaron muestras biológicas de los órganos referidos para histopatología (H-E y ZN) y para cultivo de *Mycobacterium bovis*. Para el examen macroscópico las lesiones de tuberculosis fueron encontradas más frecuentemente en los linfonodos asociados a la cavidad torácica: (mediastínicos y traqueobronquiales) y linfonodos de la cabeza: (retrofaríngeos). Para el estudio histopatológico, se identificaron lesiones sugestivas de TBb en un total de 115 (37%) obteniendo un mayor porcentaje para los granulomas tipo III y IV (31%) para ambos tipos de granulomas.

En el caso de la tinción de ZN solo el 18% del total fueron positivas; mientras que para el cultivo solo 78 muestras fueron positivas para *M. bovis*, aunque igual se pudo aislar *M. vaccae*, *M. fortuitum* y *Mycobacterium sp.* y 3 negativos.

Los coeficientes de *Kappa* (k) para determinar la concordancia entre las lesiones a la inspección *post mortem* (granulomas) y la presencia de BAAR (ZN) fue de  $k=0.59$  para el ZN con cultivo se obtuvo  $k=0.53$ . En cuanto a la concordancia entre granuloma y cultivo fue  $k=0.70$ .

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Definición**

El término de Tuberculosis (TB) deriva de la palabra latín tuberculum (nódulo pequeño o protuberancia) y se refiere a una enfermedad crónica granulomatosa e infectocontagiosa, producida por las bacterias del género *Mycobacterium*. Tiene una distribución mundial, afectando a todos los animales de sangre caliente, incluyendo al hombre. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas localizadas frecuentemente en pulmón y linfonodos, aunque también pueden afectar a otros órganos como es el hígado y glándula mamaria; acompañada por una caquexia progresiva, periodos febriles y retraso en el crecimiento (Bernad, 1987; Schollossberg, 2000).

### **1.2 Antecedentes Históricos**

Las primeras referencias sobre la tuberculosis humana (TBh) aparecen en escritos de la antigua China, Babilonia y Egipto, mientras que las descripciones anatómicas y patológicas iniciaron en el siglo XX. Es así como en el año de 1879 Franciscus de la Boe, descubrió por primera vez los cambios en los pulmones que caracterizan a la patología de la enfermedad, como son los granulomas y el progreso de las lesiones hacia los abscesos y cavernas (Bloom, 1994).

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad que fue descrita por primera vez en el siglo XIV, al norte de Italia, por Columella, pero no fue hasta que Robert Koch descubrió el bacilo de la tuberculosis en 1882, que se conoció más acerca de los microorganismos causantes de la enfermedad tanto en humanos como en animales. En 1924 Albert Calmette y Alphonse Guerin desarrollaron una vacuna del bacilo denominándola Calmette–Guerin a partir de la atenuación de la cepa de *Mycobacterium bovis* con pases en medio de cultivo (Grange, 1995).

A mediados de la Segunda Guerra Mundial se empezó a utilizar la antibioterapia donde la estreptomina, descubierta por Selman Waksman en 1944, fue el primer antibiótico en utilizarse contra la tuberculosis. En el año de 1948 se utilizó el ácido para-amino salicílico (PAS) y en la década de los setenta el etambutol y en los años setenta la rifampicina (Sudre *et al.*, 1992).

Desde entonces se han realizado grandes avances en el conocimiento de la biología de *M. bovis* y *M. tuberculosis*, agentes etiológicos de la TBb y de la TBh, respectivamente. Esto ha dado como resultado el mejoramiento en las técnicas de diagnóstico, prevención y control de la enfermedad. Se ha considerado que el 8% de los casos de tuberculosis humana es causado por *M. bovis*, teniendo su origen por el contacto con animales enfermos o bien con productos contaminados principalmente alimentos (Grange, 1995).

Si bien hoy en día en la práctica veterinaria existen diversas técnicas autorizadas por la norma oficial mexicana entre las cuales se encuentran la prueba intradérmica con derivado proteínico purificado (PPD) o tuberculina de forma rutinaria. Aunque si bien esta prueba no cuenta con una alta especificidad y sensibilidad (Chávez, 2004).

Los diagnósticos falsos positivos generan problemas económicos y sociales, ya que conforme a la Norma Oficial Mexicana, los animales reactores positivos a la prueba se deben sacrificar. Para confirmar la infección se realiza una inspección *post mortem* (IPM) y se buscan lesiones sugestivas de TBb.

La IPM se considera un método práctico, si se utiliza conjuntamente con la histopatología, para identificar lesiones compatibles con presencia de bacilos alcohol acido- resistentes a la tinción de Zielh-Neelsen (ZN). Para el diagnóstico definitivo se envían muestras de estas lesiones al laboratorio de bacteriología. Sin embargo, el diagnóstico de TBb mediante el cultivo de *M. bovis* representa una verdadera barrera de tiempo, dinero y esfuerzo (Chávez, 2004).

### **1.3 Importancia económica**

La TBb es una enfermedad que impacta negativamente en la industria ganadera, ocasionando graves pérdidas económicas. La movilización y la comercialización de los animales y sus productos se ven limitados por la regionalización del país, de acuerdo a los avances de la campaña contra la enfermedad y a la reducción de la prevalencia (Romero, et al., 2006).

En México se estiman pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan sólo por el desecho de ganado enfermo. Se estima además que la TBb disminuye la producción de leche en un 17%, reduce la ganancia de peso y la tasa de conversión alimenticia hasta en un 15% y la fertilidad en un 6% (García, *et al.*, 2005).

La libre movilización de animales entre regiones o bien entre países, impacta negativamente en los canales de comercialización. Un ejemplo de esto es lo que sucede cada año durante las ferias ganaderas, ya que los animales pueden salir de la región afectada, pero ya no pueden regresar cuando cambian a una zona de menor *status* sanitario. En el caso de la exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América, la presencia de la TBb representa una pérdida por divisas de 450 millones de dólares anuales. (García, *et al.*, 2005).

#### **1.4 Importancia en la Salud Pública**

La TBh es la principal causa de muerte en el mundo, especialmente en Asia y África. Más de la mitad de las estimaciones de los casos estimados en el 2008, ocurrieron en Asia (55%), África (30%); y con pequeñas proporciones de casos en la región del Este del Mediterráneo (7%), en la región Europea (5%) y en América (3%) (WHO, 2009).

En 2009, se estimaron 9.4 millones de nuevos casos de tuberculosis en un rango de 8.9 a 9.9 millones, lo equivalente a 137 casos por 100,000 habitantes. Esto representó un incremento de 9.3 millones de los casos de tuberculosis de los estimados que ocurrirían en el 2007. De los cuales el 1.1-1.7 fueron de muertes entre gente VIH-negativa, adicionalmente 0.45-0,62 millones de muertes entre la gente con VIH –positiva (WHO, 2009).

La incidencia de tuberculosis en México es de 24 por cada 100.000 habitantes siendo inferior al promedio latinoamericano, que a mediados de la década de los noventa se ubicó en 32 casos nuevos por cada 100.000 habitantes (Estrada, 2007).

En México es un problema que va en ascenso y que presenta nuevos retos para su control entre ellos su asociación con personas con VIH. Esta relación, es la causa de 2.4 a 2.9 millones de muertes anuales entre personas de de 15 a 49 años de edad según varias estimaciones (Estrada, 2007).

La TBb es una zoonosis importante en nuestro país, la vía de transmisión más común al ser humano es por la ingestión de leche o de sus derivados no pasteurizados, procedentes de animales enfermos, sin embargo se ha determinado en otros países que solo 1-2% de vacas tuberculosas tienen infección en glándula mamaria, la infección en el humano también se produce por la inhalación o ingestión de aerosoles con animales infectados, esto es posible durante las prácticas rutinarias de manejo (Estrada,1995).

### **1.5 Características generales de las micobacterias**

El género *Mycobacterium spp.* incluye un importante grupo de especies causantes de enfermedades como la paratuberculosis y TBb (Vadillo, *et al.*, 2002). Este género se divide en dos grandes grupos: de rápido y lento crecimiento. Entre las especies de rápido crecimiento se encuentran: *M. smegmatis*, mientras que entre las especies de lento crecimiento se encuentran: *M. marinum*, *M. intracellulare*, *M. paratuberculosis*, *M. avium* y el ahora llamado complejo *Mycobacterium tuberculosis*, formado por las especies: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti* y *M. microti* (Biet, *et al.*, 2005).

El género *Mycobacterium*, se caracterizan por poseer una pared celular resistente constituida por ácidos micólicos y lípidos ocasionando que ciertos colorantes derivados de las anilinas (*v.g.* fucsina fenicada) sean retenidos a pesar de ser tratadas con un ácido y un alcohol, mediante una técnica de tinción especial de ZN y por ello se han denominado bacilos alcohol ácido-resistentes (BAAR) (Estrada, 2007).

El complejo de *M. tuberculosis* se caracteriza por ser bacilos grampositivos, aerobios, intracelulares. La longitud varía mucho entre especie y según se trate de frotis de tejidos o de cultivos. Carecen de esporas, fimbrias, flagelos o cápsula y son muy exigentes para su cultivo. Su tiempo de replicación es de 18-24 horas y su crecimiento en medios sólidos tarda hasta 8 semanas. Estos bacilos resisten la desecación, los ácidos y los álcalis y son sensibles a la luz solar directa, luz UV, temperatura superior a 70°C y desinfectantes orgánicos como el fenol y los cresoles. El tratamiento de elección en aislados susceptibles son los antibióticos de primera línea: estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol. (Vadillo, *et al.*, 2002).

## **1.6 Epidemiología**

### **1.6.1 Resistencia ambiental**

*M. bovis* puede sobrevivir por muchos meses en el ambiente, en el frío, obscuridad y particularmente en condiciones de humedad. Existen estudios que muestran que a una temperatura de 12-24°C, el tiempo de supervivencia varía de 18 a 332 días, mientras que en agua estancada sobrevive de 16-23 días, en el interior de instalaciones de 31-37 días con una temperatura media de 28°C y humedad relativa 32%. La supervivencia de *M. bovis* en heces expuestas al sol en época de lluvias es de 37 días, mientras que dentro de las instalaciones se considera de 71-84 días. (CFSPH, 2007)

### **1.6.2 Periodo de incubación**

Los signos de la TBb, usualmente toman meses en desarrollarse, pero igualmente la infecciones también pueden permanecer inactivas durante años y se pueden reactivar durante periodos de estrés o bien en animales viejos. (OIE, 2008).

### **1.6.3 Hospederos**

Aunque se considera que el ganado vacuno es el verdadero hospedero de *M. bovis*, se ha descrito la enfermedad en muchos animales domésticos y no domésticos (OIE, 2008).

El microorganismo se ha aislado de búfalos, bisontes, ovejas, cabras, équidos, camellos, palomas, cerdos, jabalíes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorras, visones, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, kudus, tapires, alces, elefantes, sitatungas, rinocerontes, tlacuaches, ardillas, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como leones, tigres, leopardos y lince (De Lisle *et al.*, 2001); si bien los humanos también juegan un papel importante, pueden ser afectados en menor porcentaje, esto debido a las ocupaciones de la gente. Es así que médicos veterinarios, trabajadores de establos y personal de rastros, son los que presentan un mayor riesgo de contagio por la convivencia de aerosoles contaminados (Taylor, *et al.*, 2008).

#### **1.6.4 Transmisión**

La enfermedad en el bovino es muy variada, se caracteriza por tener un curso crónico y debilitante (Acha, *et al.*, 2007). La principal vía de transmisión de la TBb es la aerógena, por inhalación de aerosoles con dosis elevadas del microorganismo. Durante la tos y los estornudos que desarrollan los animales clínicamente enfermos, son expelidas una gran cantidad de gotas de diversos tamaños los cuales provienen principalmente de bronquios, que contienen moco, leucocitos y bacilos. Una segunda vía importante en la transmisión del bacilo la cual es la digestiva, dada principalmente por la ingestión de leche contaminada, es una fuente de infección importante para los animales lactantes y para el hombre. Esta leche puede contaminar los equipos de ordeño, los instrumentos, el suelo, las camas, la ropa y los recipientes destinados para el almacenamiento de la leche. (Goodchild *et al.*, 2001; Moda *et al.*, 1996). Existen otras vías de transmisión menos frecuentes, como son la cutánea, genital y la congénita. (CFSPH, 2007).

#### **1.7 Patogenia**

Actualmente se considera que la principal forma de transmisión de la TBb, es a través de la inhalación de aerosoles cargados con *M. bovis*, provenientes de bovinos tuberculosos (Menzies, *et al.*, 1992).

Los bacilos hacen contacto con la capa mucociliar del tracto respiratorio superior donde son acarreados hacia los bronquiolos terminales y espacios alveolares y es en este sitio donde son ingeridos por los neumocitos tipo III o macrófagos alveolares (Menzies, *et al.*, 1992).

En la infección primaria, los macrófagos alveolares son incapaces de destruir por completo los bacilos fagocitados debido a que los bacilos poseen la habilidad de resistir a radicales libres y enzimas proteolíticas. En esta etapa *M. bovis* se multiplican dentro de los macrófagos alveolares e inducen la formación de una lesión primaria, la cual previene su crecimiento y diseminación en el organismo. (Menzies, *et al.*, 1992).

La formación de una lesión primaria es un evento inflamatorio en respuesta a los lípidos y carbohidratos de la pared celular, ya que se puede inducir por micobacterias muertas; dichos componentes de las micobacterias inducen cierta activación del macrófago caracterizada por la producción de citocinas proinflamatorias (Felton, *et al.*, 1996; Trigo 1996).

Cuando la actividad microbicida de los macrófagos fracasa en la destrucción de *M. bovis*, estas se replican en el interior de la célula y ocasiona la destrucción y muerte del macrófago, produciendo quimiotaxis de monocitos hacia esta zona e inicia con la formación del granuloma, el cual es característico de la tuberculosis.

Este granuloma se caracteriza por la acumulación de macrófagos epitelioides, los cuales están rodeados por tejido conectivo; además de células gigantes multinucleadas puede haber infiltración de neutrófilos así como de linfocitos; en estadios avanzados de la enfermedad los granulomas presentan mineralización y zonas necróticas, cuya característica es poseer una gruesa cápsula de tejido fibroso (Palmer, *et al.*, 2007).

Existen dos diferentes rutas mediante las cuales es posible que se produzcan nuevos centros de infección: la primera forma es, cuando la lesión primaria alcanza cierto tamaño y especialmente cuando se ablanda o licúa los órganos afectados, los bacilos son eliminados de los bronquios y son acarreados a otras porciones sanas del pulmón durante los accesos de tos; de esta manera los bacilos, ya sea en la mucosa de los bronquios con la que tengan contacto directo o al ser aspirados dentro de los alvéolos, en lugares remotos de la lesión primaria, pueden producir nuevos centros de infección (Neill, *et al.*, 1994; Estrada, 1995).

La segunda forma es cuando los bacilos pueden ser transportados a partir del foco primario de infección, a través de los vasos linfáticos: durante el curso de la enfermedad los bacilos son transportados hacia los linfonodos traqueobronquiales y mediastínicos y cuando esto ocurre se desarrollan los granulomas tuberculosos a lo largo del curso de los vasos linfáticos y en los linfonodos (Neill, *et al.*, 1994; Estrada, 1995).

Los linfonodos son más comúnmente infectados que otros tejidos porque el flujo de linfa en un animal pasa por todos los linfonodos, que es donde el organismo capta los bacilos. La presencia de macrófagos entre las células reticulares fibrosas de los linfonodos, provee un ambiente adecuado para el crecimiento del microorganismo y desarrollo de las lesiones granulomatosas en los linfonodos. (Felton, *et al.*, 1996).

El granuloma se forma para tratar de delimitar la infección y permitir que el proceso inflamatorio y los mecanismos inmunológicos destruyan a los bacilos. Sin embargo, en el ganado, un pequeño número de bacilos pueden permanecer viables en forma inactiva por varios años, en el centro necrótico de algunos granulomas. Algunas veces estas lesiones se pueden activar en el momento que existan factores que depriman el estado inmunológico del individuo como el estrés, parto y la edad, entre otros (Neill, *et al.*, 1994).

En los bovinos existen algunos granulomas no tuberculosos en los que el contenido purulento verdoso está reemplazado por tejido granuloso, que puede tener similitud con los granulomas tuberculosos. Normalmente, el centro caseoso es seco, firme y está cubierto con una cápsula fibrosa conjuntiva de grosor variable. Estos granulomas formados en los distintos órganos afectados son la principal causa de desecho de las canales (OIE, 2008; García, *et al.*, 2005).

Cuando se realiza la necropsia, un granuloma tuberculoso suele presentar un aspecto amarillento y consistencia caseosa, caseo-calcárea o calcificada; ocasionalmente pueden ser purulentos (OIE, 2008).

La TBb a veces presenta un proceso lento y puede ser clínicamente inaparente por largo tiempo; incluso cierto número de animales puede pasar toda su vida útil sin signos aparentes, lo cual constituye una amenaza potencial para el resto del hato. En otros animales se origina una bronconeumonía crónica, con tos y disminución de la capacidad productiva (Acha *et al.*, 2007).

En estos casos avanzados, cuando gran parte de los pulmones están destruidos, se produce disnea pronunciada. Se estima que el 5% de las vacas tuberculosas, sobre todo en casos avanzados, tiene lesiones en útero o metritis tuberculosa y que del 1-2% tienen mastitis tuberculosa (Acha *et al.*, 2007).

## **1.8 Inmunopatogenia**

*M. bovis* es un patógeno intracelular capaz de resistir y replicarse dentro de los macrófagos. Se han descrito por lo menos dos factores de patogenicidad que permiten su supervivencia. El primero es la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma, el segundo es la resistencia a enzimas lisosomales y metabolitos activos del oxígeno. La respuesta inmune protectora generada durante la tuberculosis es el resultado de la integración de las respuestas inmunes natural y adquirida a través de la activación de linfocitos T CD4 y productores de IFN- $\gamma$ , permitiendo la eliminación del bacilo por macrófagos activados (Gorocica *et al.*, 2005).

## **1.9 Diagnóstico**

### **1.9.1 Aislamiento e identificación bacteriológica**

Para el aislamiento de *M. bovis* se emplean muestras de tejidos provenientes de animales sospechosos, los cuales presentan lesiones sugestivas de tuberculosis, durante la inspección *post-mortem* (Campuzano, 2001).

Para el aislamiento primario, el sedimento se inocula por lo general en varios medios sólidos con huevo, como el de Lowenstein-Jensen (LJ), el cual es un medio sólido; estos medios deben contener piruvato o glicerol, o ambos; son muy ricos en nutrientes, poseen altas cantidades de fosfolípidos y proteínas necesarias para metabolismo de las micobacterias. También se utilizan medios líquidos como el de Middlebrook 7H10 ó 7H11 (OIE, 2008; Robin *et al.*, 2006).

Sin embargo, el mejor medio para el aislamiento de *M. bovis* es el de Stonebrink con piruvato al 0.48%, complementado con una atmósfera de 5-10% de bióxido de carbono y una temperatura de 37°C, con un tiempo de incubación en promedio para *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. africanum* de 6-12 semanas, con la finalidad de obtener un crecimiento visible (Roberts, 1991).

### **Equipos automatizados**

En los últimos años han aparecido nuevos métodos de diagnóstico tanto automatizados como semiautomatizado entre los cuales se encuentran:

**El sistema BACTEC 460 TB:** es un método semiautomatizado radiométrico, que utiliza medio de cultivo a base de caldo Middlebrook enriquecido, rico en ácido palmítico marcado con carbono 14 ( $C_{14}$ ), que es un isótopo radiactivo natural. Es una técnica que mide cuantitativamente el  $CO_2$  marcado con  $C_{14}$  producido por el metabolismo de las micobacterias presentes en la muestra. Este sistema aspira el  $CO_2$  marcado presente en la atmósfera del frasco y determina un valor de radiactividad (Índice de crecimiento) que es directamente proporcional a la cantidad de crecimiento en el medio. Por último, también por este sistema se realiza la prueba de sensibilidad a las 5 drogas de primera línea: estreptomicina, etambutol, rifampicina, isoniacida y pirazinamida (Fagundo, 2004).

**El sistema MGIT 960, BACTEC 9000:** utilizan medios de cultivo a base de caldo Middelbrook. Están constituidos por estufas de cultivo continuo, con sensores capaces de detectar el  $CO_2$  producido por el metabolismo de las micobacterias presentes en la muestra. Los métodos de lectura pueden ser colorimétrico o fluorométrico. En el caso del MGIT 960 posee un compuesto fluorescente que esta incluido en la parte inferior de los tubos.

El compuesto fluorescente es sensible a la presencia de oxígeno disuelto en el caldo. Inicialmente, la gran cantidad de oxígeno apaga las emisiones procedentes del compuesto y se detecta poca fluorescencia. Los tubos son incubados continuamente a 37 °C y éste controla los tubos cada 60 minutos para detectar un aumento de fluorescencia (Fagundo, 2004).

### **1.9.2 Intradermorreacción (prueba de tuberculina)**

Esta prueba se realiza mediante la inyección intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD), que se obtiene de la cepa AN5 de *M. bovis* (PPD bovino), la prueba se puede realizar solo con PPD bovino o realizar la prueba doble comparativa aplicando el PPD obtenido de la cepa de *M. avium* (PPD aviar). Ambas pruebas se emplean para detectar a los animales expuestos a *M. bovis* o bien, infectados con *M. avium*.

También puede sugerir la infección por otras micobacterias como las saprófitas o bien como *M. paratuberculosis*. Los bovinos desarrollarán una reacción de hipersensibilidad tipo IV en el sitio de aplicación, en caso de haber tenido exposición previa con el antígeno, manifestándose un engrosamiento de la piel (NOM-031-ZOO-1995).

Para realizar la evaluación de la prueba doble comparativa se establece la diferencia entre el grosor inicial de la piel con aquel que se presenta a las 48 o 72 horas posteriores a la inyección (NOM-031-ZOO-1995). Esta prueba posee sensibilidad del 85% y una especificidad que oscila entre un 95-98% para detectar animales expuestos a *M. bovis* o *M. tuberculosis* (Monaghan *et al.*, 1994; OIE, 2008).

### **1.9.3 Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )**

Esta prueba detecta la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), *in vitro*, inducida por antígenos específicos en linfocitos previamente sensibilizados, permitiendo identificar animales infectados antes de que reaccionen a la prueba de la tuberculina. Este método utiliza sangre completa y PPD bovino como antígeno específico. Esta prueba es presuntiva y es una de las pruebas que están reguladas y permitidas por la Norma Oficial Mexicana contra la Tuberculosis bovina.

Se estima que la prueba de IFN- $\gamma$  posee una sensibilidad entre el 70-94%, con una especificidad que varía entre un 97% y 99% (Díaz, 2003; Romero *et al.*, 2006).

En algunas zonas, especialmente en las que prevalece la “inespecificidad”, se han manifestado dudas sobre la precisión. No obstante, dado que la prueba del IFN- $\gamma$  es capaz de detectar las primeras infecciones, el uso paralelo de ambas pruebas permite la detección de un mayor número de animales infectados antes de que los mismos se conviertan en focos de infección para otros animales y en foco de contaminación del entorno. La ventaja de la prueba IFN- $\gamma$  sobre la prueba cutánea consiste en que sólo necesitan ser capturados una vez.; sobre todo cuando se trabajan con animales de manejo difícil o peligroso, como el ganado bronco o bien especies silvestres como los venados. (Ryan *et al.*, 2000).

#### **1.9.4 Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)**

La prueba se basa en la detección de anticuerpos primarios, mediante el uso de antígenos específicos de micobacterias, unidos a una fase sólida, empleando conjuntamente anticuerpos secundarios unidos a una enzima, para identificar un color derivado de la reacción correspondiente. Una ventaja es su simplicidad, aunque su especificidad y sensibilidad son limitadas en el ganado, debido principalmente al desarrollo tardío e irregular de la respuesta inmune humoral durante la enfermedad (OIE, 2008).

Para la realización de esta prueba existen ciertos inconvenientes, tales como el hecho de que la respuesta inmune está dirigida principalmente hacia los antígenos micobacterianos comunes y no específicos, además de que esta respuesta es principalmente celular, excepto en individuos que presentan cuadro clínico o que se encuentran en estados avanzados de la enfermedad y, finalmente, tenemos que una proporción de alrededor del 20-40% de individuos de una población infectada no poseen niveles detectables de anticuerpos específicos del subtipo IgG, que son indispensables para la realización de esta prueba (Torres,2005).

### **1.9.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta técnica fue desarrollada en 1985; el término “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR por sus siglas en inglés) se aplica al proceso bioquímico *in vitro* mediante el cual las cadenas individuales del ADN “blanco” son duplicadas por la ADN-polimerasa en cada uno de los ciclos que integran a la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial en millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso (Torres, 2005).

Debido a los problemas para el aislamiento de *M. bovis* ha sido necesario implementar métodos moleculares como es el caso de la PCR. La cual permite confirmar rápidamente el diagnóstico de TBb sin cultivo previo (Romero *et al.*, 2006).

La prueba de PCR utiliza oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de ADN del genoma de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. La PCR para el gen que codifica la proteína MPB70 ha mostrado buena sensibilidad y excelente especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y bovinos (Cousins *et al.*, 1992).

Además se ha demostrado la presencia de una sola copia de este gen en cepas de *M. bovis* y bacterias del complejo *M. tuberculosis*, así como su ausencia en 24 especies diferentes de micobacterias y en otros géneros bacterianos (Liebana *et al.*, 1995).

### **1.9.6 Histopatología**

El estudio histopatológico de los tejidos procedentes de animales sospechosos a tuberculosis bovina, es un método diagnóstico muy eficiente para demostrar la tuberculosis, sin embargo, solo se puede realizar post- mortem.

### **1.9.7 Inspección *post-mortem* (IPM)**

El diagnóstico presuntivo de TBb es hecho comúnmente por la IPM, lo cual se justifica como una medida práctica, debido a la apariencia macroscópica característica de las lesiones y permite un diagnóstico presuntivo rápido de tuberculosis.

La IPM es una buena prueba de diagnóstico, que en conjunto con la histopatología, permite obtener un resultado confiable para una comparación con otros métodos diagnósticos y con el status epidemiológico de la enfermedad del hato (Estrada, 1995).

La realización del cultivo de las necropsias es el estándar de oro para el diagnóstico definitivo de la enfermedad, porque permite el aislamiento e identificación de *M. bovis*, sin embargo, no hay laboratorios que lo realicen de rutina por su alto costo, medidas especiales de bioseguridad, equipo y personal calificado. (Estrada, 1995).

Para dar el diagnóstico de tuberculosis por histopatología se deben buscar lesiones granulomatosas, las cuales se caracterizan por presentar un centro necrótico con o sin calcificación, rodeado principalmente por células inmunes de tipo mononuclear, como macrófagos, células epitelioides, células gigantes tipo Langhans, linfocitos y células plasmáticas. En menor grado se pueden encontrar neutrófilos, delimitados o no por una cápsula de tejido conectivo colágeno denso e irregular.

En la necropsia, los granulomas se observan con más frecuencia en órganos torácicos, es decir, en pulmones y linfonodos (traqueobronquiales y mediastínicos), aunque generalmente no son los únicos órganos infectados; suelen verse afectados el hígado, el bazo, corazón, órganos reproductores, e incluso cerebro (OIE, 2008).

Un granuloma tuberculoso suele presentar un aspecto amarillento y consistencia caseosa, caseo-calcárea o calcificada y en ocasiones pueden ser purulentos. Existen algunos granulomas no tuberculosos en los que el contenido purulento verdoso está reemplazado por tejido granuloso, que pueden tener similitud con los granulomas tuberculosos. Normalmente, el centro caseoso es seco, firme, y está cubierto con una cápsula fibrosa conjuntiva de grosor variable. Los tejidos fijados de un tubérculo no se extraen intactos con facilidad, como ocurre con algunos granulomas no tuberculosos. El tamaño de las lesiones varía, desde muy pequeñas que pueden pasar desapercibidas a simple vista, hasta ocupar gran parte de un órgano. El corte seriado de órganos y tejidos resulta vital para detectar las lesiones contenidas en un tejido (OIE, 2008).

Aunque en lesiones iniciales sólo se observa un cúmulo importante de macrófagos, células epitelioides y células gigantes, informar la presencia de estas células es dar un diagnóstico compatible con la enfermedad (David, 2006).

Debido a que los granulomas no son específicos de la tuberculosis, se hace indispensable realizar técnicas de coloración diferencial como la de ZN que es muy específica para la detección de BAAR, que indican la presencia de micobacterias (Torres, 2005).

En la IPM se deben considerar todas aquellas etiologías que tienden a producir lesiones visibles de tipo granulomatoso, que no pueden diferenciarse de lesiones producidas por *M. bovis*. Entre las más importantes tenemos la actinomicosis, actinobacilosis, aspergilosis, arcanobacteriosis, migraciones larvarias y linfosarcoma (CFSPH, 2007).

Los bovinos con lesiones visibles únicamente en linfonodos respiratorios no se consideran capaces de liberar bacilos, pero pueden ser considerados excretores potenciales, debido a que el tiempo necesario para el desarrollo de lesiones en el pulmón y la consecuente excreción del bacilo, es relativamente corto (McNeill, 1992).

## **II. CONTROL**

La TBb representa un riesgo a la salud animal y potencialmente a la salud pública, por ser una enfermedad de carácter zoonótico. Los propósitos generales de control y erradicación de la TBb incluyen mejorar las posibilidades del productor pecuario para aumentar su productividad, comercializar sus productos al mercado nacional e internacional, eliminar un factor restrictivo de la producción de leche y carne y evitar el riesgo de infección de tuberculosis de origen bovino en la población humana; entre los objetivos específicos esta prevenir la recaída de la enfermedad en áreas y países donde ya ha sido erradicada la TBb (NOM-031-ZOO-1995).

Las estrategias utilizadas en estos programas son, entre otras, fortalecer la vigilancia epidemiológica, desarrollo y mejoramiento de componentes técnicos de los programas de erradicación de la enfermedad (NOM-031-ZOO-1995).

Actualmente México cuenta con los siguientes estados que están en fase de erradicación: Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y parte de Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Durango, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí y Zacatecas, mientras que el resto de los estados se encuentran en fase de control. En la figura 1 se muestra la situación zoonitaria de la TBb en México (NOM-031-ZOO-1995).

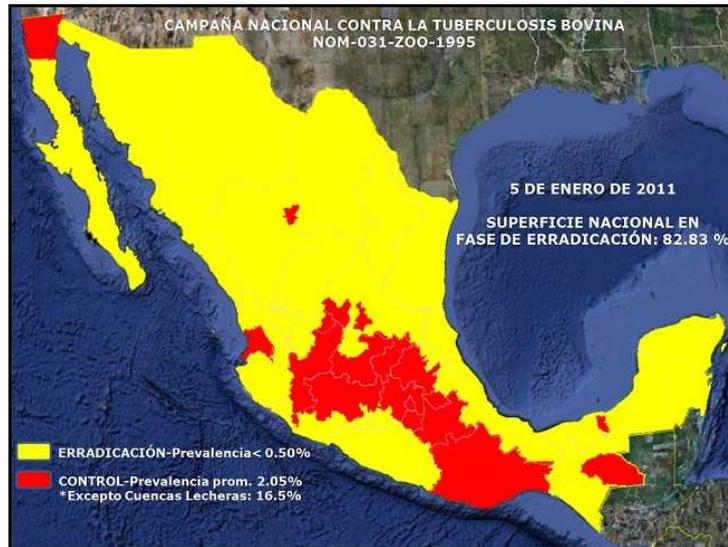


Figura 1 . Situación zoonosanitaria de la TBb en México (SAGARPA, 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN

El Complejo Agroindustrial de Tizayuca (CAIT), está ubicado en Tizayuca, Hgo, cuenta con una superficie total de 220 has' cuenta con 126 establos y una población total de 22,000 bovinos. Este complejo tiene como normativa que a cualquier animal mayor a un 1 año que muera dentro de las instalaciones, se le tendrá que hacer la necropsia en el área destinada para tal fin.

Hoy en día existen una infinidad de técnicas que están enfocadas al diagnóstico de la tuberculosis, las cuales presentan ventajas y desventajas derivadas de factores como los costos, equipo necesario para procesamiento de las muestras, personal capacitado, y tiempo para diagnosticar la enfermedad.

La IPM se considera un método práctico, si se utiliza conjuntamente con la histopatología, para identificar lesiones compatibles con presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes a la tinción de ZN, cuando algunas ocasiones no hay lesiones macroscópicas que al examen microscópico si se pueden observar. (Estrada *et al.*, 2004).

Por ello, se considera pertinente realizar las observaciones macroscópicas y microscópicas en busca de lesiones características de la TBb y/o presencia de BAAR, lo cual apoyaría el diagnóstico preliminar, o bien, ayudaría a determinar otras posibles causas de la formación de los granulomas en los bovinos del CAIT, y así mismo poder establecer las medidas higiénico-sanitarias para el control de la enfermedad.

Asimismo es deseable establecer una clasificación histológica de acuerdo al grado de evolución de las lesiones granulomatosas, así como las posibles diferencias que existan entre los diferentes tipos de lesiones, lo cual en conjunto permitiría establecer un diagnóstico confirmativo eficiente que ayude a conocer mejor la epidemiología de la enfermedad y la situación del hato.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Existe una asociación positiva entre las lesiones macroscópicas de los órganos de ganado bovino sugestivas de tuberculosis y el análisis histopatológico de tejidos post mortem en bovinos, que llegan a la Sala de Necropsias del CAIT.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **5.1 General**

Realizar el diagnóstico presuntivo de tuberculosis con la inspección *post-mortem* y el análisis histopatológico de tejidos con lesiones sugestivas de TBb en muestras biológicas, colectadas en la Sala de Necropsias del CAIT

##### **5.2 Específicos**

- 5.2.1 Evaluar macroscópicamente las canales de los animales en la Sala de Necropsias del CAIT, para realizar la búsqueda de lesiones típicas de TBb.
- 5.2.2 Determinar las características de las lesiones histopatológicas de los casos estudiados, sospechosos de TBb.
- 5.2.3 Determinar la frecuencia de TBb con ayuda de los métodos de tinción de H-E y ZN.
- 5.2.4 Comparar la frecuencia de lesiones encontradas en las tinciones de H-E y ZN en los animales a los que se realiza la necropsia en el CAIT.
- 5.2.5 Confirmar el diagnóstico histopatológico de TBb con el cultivo.

## **VI. DISEÑO EXPERIMENTAL**

**6.1 Diseño epidemiológico del estudio:** transversal

**6.2 Población de estudio:** Se analizaron las muestras de los órganos de 50 bovinos con lesiones sugestivas a TBb, que llegaron a la sala de necropsias de octubre de 2009 a febrero de 2010

**6.3 Lugar de estudio:** El presente trabajo de investigación se realizó en la Sala de Necropsias del CAIT, y en el Laboratorio de Histología e Histopatología del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia (AAMVZ), del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH).

## **VII. METODOLOGÍA**

### **7.1 Recolección de muestras biológicas.**

Se realizó una colección de muestras en un período de tiempo comprendido entre octubre de 2009 y enero de 2010, recolectándose muestras provenientes de un total de 50 vacas.

Las muestras biológicas fueron recolectadas en la Sala de Necropsias del CAIT, ubicado en Tizayuca, Hgo. El criterio utilizado para la recolección de las muestras fue, que a partir de la observación de un órgano que presentará lesiones sugestivas a TBb se muestrean los demás órganos considerados para este estudio: linfonodos retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos, mesentéricos, retromamarios y en algunos casos hepáticos; pulmones (lóbulos craneales) y glándula mamaria; las cuales tenían un aspecto nodular de color amarillento, de consistencia caseosa, y en algunos otros casos crepitación al corte, con tamaño variable.

Una vez obtenidas, las muestras se lavaron con agua para quitar el exceso de sangre y se colocaron en una charola para su disección, quitando el exceso de grasa que presentaban los linfonodos.

Las muestras se revisaron cuidadosamente por separado, realizando para ello los cortes pertinentes en el parénquima de los órganos, para la adecuada identificación de las lesiones características de la TBb.

Las muestras de linfonodos se identificaron con alfileres de colores de la siguiente manera:

- Retrofaríngeos (RT-rojo)
- Traqueobronquiales (TRA-amarillo)
- Mediastínicos (MED-negro)
- Mesentéricos (MES-blanco)
- Retromamarios (REM-naranja)
- Hepáticos (HEP-morado)

De cada órgano se obtuvieron dos muestras, una para cultivo del complejo de *M. tuberculosis* y otra para histopatología; en el caso de las muestras destinadas para el cultivo, se utilizó como medio de transporte una solución saturada de borato de sodio en una relación 1:1 (muestra-borato), en tubos de 50 mL como lo marca la Norma Oficial Mexicana de Tuberculosis Bovina (NOM-031-ZOO-1995). Se puso especial cuidado en que las muestras destinadas a cultivo tuvieran exudado fresco, con la finalidad de garantizar el aislamiento de la micobacteria y fueron enviadas al laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Nutrición “Salvador Zubirán”, para su procesamiento.

Para el estudio histopatológico las muestras se colocaron en frascos de plástico con formalina al 10%, amortiguada con fosfatos (Anexo I), al menos por 24 h, en una relación 1:10 (muestra-formalina); el tamaño promedio de la muestra fue aproximadamente de 2 cm por lado, abarcando parte de tejido lesionado y parte de tejido normal.

Ambos frascos se identificaron con los siguientes datos: número de muestra (numeración seriada), número de animal (arete plástico y metálico), peso aproximado del animal, edad, raza y sexo. (Anexo III).

## **7.2 Procesamiento de las muestras para cultivo**

Las muestras fueron maceradas de manera independiente, en morteros con 5 ml de PBS, con rojo de fenol como indicador de pH, y fueron centrifugadas durante  $4000 \times g$  por 15 minutos, posteriormente se tiro el sobrenadante (Pfyffer, 2007; Vincent *et al.*, 2007).

Seguidamente se agrego la solución de 0.5 N de NaOH (v/v), los tubos se mezclaron con la ayuda de un vortex por un total de 15 min, con intervalos de 5 minutos con la finalidad de que se mezclaran perfectamente con la solución (Pfyffer, 2007; Vincent *et al.*, 2007).

A continuación se les agrego la solución de buffer de fosfatos con la finalidad de obtener un pH neutral un hasta llegar a un volumen de 45 ml mezclándolas con ayuda del vortex, seguidamente se metieron a centrifugar durante  $4000 \times g$  por 20 minutos, pasado el tiempo se tiro el sobrenadante.

Terminado el proceso de digestión-descontaminación, se procedió a sembrar en el medios sólidos (LJ) y Stonebrink (SB), y en medio liquido Middlebrooks 7H9 (MGIT) (Pfyffer, 2007; Vincent *et al.*, 2007).

### **7.2.1 Siembra de muestras clínicas**

Los tubos LJ y SB se prepararon con 0.1 mL de la mezcla de antibióticos (PANTA plus) más 1 mL de la muestra, y fueron incubados en la estufa a  $37^{\circ} C$  con 7.5 CO<sub>2</sub>, donde fueron revisados cada semana para observar su crecimiento. Para los tubos MGIT, se agregaron 0.8 ml a cada tubo de la mezcla de antibióticos (OADC) más 0.5 ml de la muestras. Los tubos se introdujeron en el sistema Bactec MGIT 960 y fueron incubados continuamente a  $37^{\circ} C$  y monitoreadas cada 60 minutos para detectar un aumento de fluorescencia (Pfyffer, 2007; Vincent *et al.*, 2007).

### **7.2.2 Sensibilidad**

Es un método que se basa en la utilización del ácido palmítico marcado con <sup>14</sup>C que se encuentra en el medio 12B, que es un medio que sirve de base para el crecimiento de las bacterias del complejo de tuberculosis.

La cantidad de  $^{14}\text{CO}_2$  detectada refleja el crecimiento producido en el frasco y se expresa como el valor el índice crecimiento (IC). Cuando se agrega al medio el antibiótico a probar, si la bacteria es susceptible se inhibe el crecimiento y se refleja en la disminución del IC (Fagundo, 2004).

### **7.3 Procesamiento de las muestras biológicas para su estudio histopatológico.**

El procesamiento de las muestras biológicas, basado en la técnica histológica de rutina (Prophet *et al.*, 1995), incluye los siguientes pasos: fijación, infiltración, inclusión, corte, tinción y montaje, los cuales se describen a continuación:

#### **7.3.1 Fijación.**

Este proceso preserva los tejidos deteniendo la autólisis y además permite que los tejidos permanezcan sin cambios; los tejidos se endurecen ligeramente pero no se fragmentan permitiendo que las estructuras tisulares no se encojan y que estén muy parecidas al estado *in vivo*. Por esta razón se utilizó la solución de formalina al 10%, amortiguada con fosfatos, durante la colecta de muestras biológicas en el CAIT.

#### **7.3.2 Infiltración.**

Este procedimiento se realizó en un procesador automatizado de tejidos; el cual fijo las muestras con cuatro diferentes pasos: Lavado, Deshidratación, Aclaramiento e Infiltración en parafina (Modificado de Prophet *et al.*, 1995).

En el cuadro 1 se describe el procedimiento de infiltración para las muestras recolectadas. En la figura 2 se muestra el procesador automatizado de tejidos.

Los pasos del procesamiento de tejidos son secuenciales, diseñados para remover toda el agua que se pueda extraer de los tejidos y reemplazarla con un medio el cual se solidifica y permite el corte de los tejidos. El agua remueve primero el fijador empleado al inicio. El uso de alcoholes graduados que vayan de la concentración más baja hasta la más alta, es para la deshidratación. El xileno es utilizado para el aclaramiento de los tejidos, además es un elemento miscible tanto en alcohol como en parafina. La parafina es usada para la infiltración (Modificado de Prophet *et al.*, 1995).



Figura 2. Procesador automatizado de tejidos

**Cuadro 1.** Protocolo de infiltración (Modificado de Prophet *et al.*, 1995).

Paso	Núm. contenedor	Solución	Tiempo (h)
Lavado	1	Agua destilada	1
Deshidratación	2	Etanol 60 %	1
	3	Etanol 70 %	1
	4	Etanol 80 %	1
	5	Etanol 96 %	2
	6	Etanol 96 %	1
Aclaramiento	7	Etanol 100 %	1
	8	Etanol 100 %	2
	9	Xileno	1
	10	Xileno	2
Infiltración	11	Parafina	1
	12	Parafina	2

### 7.3.3 Inclusión.

La inclusión es el proceso de rodear un tejido con una sustancia firme, tal como la parafina, para poder obtener secciones delgadas (v.g. 3  $\mu\text{m}$ ). Para este paso se utilizaron moldes metálicos, los cuales fueron cubiertos con glicerina para que una vez solidificados los cubos de parafina se facilitara el desprendimiento del molde.

Ya listo el molde se le agregó lentamente la parafina con ayuda de un dispensador de parafina, para evitar la formación de burbujas, con la ayuda de unas pinzas se tomó el tejido del histocasette y se colocó en el molde metálico, dejándolo por 24 horas, para posteriormente pasarla al área de corte (Prophet *et al.*, 1995).

#### **7.3.4 Corte.**

A partir de los bloques se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor con un micrótopo, se colocaron en un baño de flotación de tejidos, al que se le adicionó grenetina. En la figura 3 se muestra el micrótopo utilizado para el corte de las muestras.

Los cortes que se seleccionaron durante esta operación se recuperaron con portaobjetos, los cuales fueron colocados unos minutos en una platina térmica, los cortes en los portaobjetos fueron almacenados al menos durante 24 h antes de su coloración (Prophet *et al.*, 1995).



Figura 3. Micrótopo

### **7.4 Coloración de las preparaciones histopatológicas obtenidas.**

Las coloraciones utilizadas fueron Hematoxilina y Eosina (H-E), la cual es una técnica rutinaria y la tinción de Ziehl Neelsen (ZN) utilizada principalmente para detectar BAAR. (Anexo II).

#### **7.4.1 Hematoxilina y Eosina (H-E)**

También llamada técnica convencional o de rutina, utiliza como fundamento la afinidad de las moléculas ácidas y básicas para atraer a su opuesto. La eosina es un compuesto ácido cuya propiedad está basada en su polaridad negativa, lo que le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva.

Por ello tiñe componentes y organelos citoplasmáticos, colágeno y fibras musculares, mientras que el colorante básico (hematoxilina) tiñe los núcleos que son básicamente ácidos nucleicos y están cargados negativamente.

#### **Tren de coloración de H-E (Fig.4)**

1. Xileno, dos pasos de 2 min cada uno.
2. Etanol al 100%, dos pasos de 2 min cada uno.
3. Etanol al 95%, dos pasos de 2 min cada uno.
4. Etanol al 80%, un paso de 2 min.
5. Etanol al 70%, un paso de 2 min.
6. Agua destilada, un paso de 2 min.
7. Hematoxilina de Harris, un paso de 10 min.
8. Agua corriente, un paso de 5 min.
9. Alcohol ácido, diferenciación, un paso rápido.
10. Agua corriente, un paso de 2 min.
11. Agua amoniacal, un paso de 2 min.
12. Lavar con agua corriente, un paso de 10 min.
13. Lavar con agua destilada, un paso de 2 min.
14. Etanol al 80%, un paso de 2 min.
15. Eosina /floxina, un paso de 4 min.
16. Etanol al 95% dos pasos de 2 min cada uno.
17. Etanol al 100%, dos pasos de 2 min cada uno.
18. Xileno, dos cambios de 2 min cada uno.
19. Resina sintética, montaje de cubreobjetos.



Figura 4. Tren de coloración de H-E

#### 7.4.2 Ziehl Neelsen (ZN)

Esta técnica se basa en que la pared celular de las micobacterias, contienen ácidos grasos micólicos de cadena larga (50 a 90 átomos de carbono) que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos. Con este método los bacilos se tiñen de rojo brillante, y los demás elementos tisulares, de color azul.

#### Tren de coloración de ZN (Fig.5)

1. Xileno, dos pasos de 2 min cada uno.
2. Etanol al 100%, dos pasos de 2 min cada uno.
3. Etanol al 95%, dos pasos de 2 min cada uno.
4. Etanol al 80%, un paso de 2 min.
5. Etanol al 70%, un paso de 2 min.
6. Agua destilada, un paso de 2 min.
7. Carbol –fucsina, un paso de 30 min.
8. Agua corriente, un paso de 20 min.
9. Alcohol ácido, diferenciación en un paso rápido.
10. Agua corriente, un paso de 8 min.
11. Azul de metileno, hasta que las muestras presenten un color azul pálido.
12. Agua corriente, un paso de 2 min.
13. Agua destilada, un paso de 2 min.
14. Etanol al 95% dos pasos de 2 min cada uno.
15. Etanol al 100%, dos pasos de 2 min cada uno.

16. Xileno, dos pasos de 2 min cada uno.

17. Resina sintética, montaje de cubreobjetos.



Figura 5. Tren de coloración de ZN

### Material

1. Equipo: Procesador automatizado de tejidos (marca Microm, modelo STP120-1)
2. Histocassettes
3. Microtomo (marca Leica, modelo: 2125 RT)
4. Navajas desechables (de bajo perfil) para micrótopo
5. Baño de flotación (Premiere, Modelo: XH-1001)
6. Platina térmica (marca: Barnstead, Modelo: HPA2245M)
7. Agitador magnético con platina térmica (Thermolyne, Modelo: SP131325).
8. Magnetos medianos
9. Balanza (marca: Velab, Modelo: ES-H-SERIES)
10. Pinzas de disección
11. Portaobjetos, bisturí No.4 con hoja No.24
12. Estufa (marca: VWR, Modelo:1510E)
13. Frascos de plástico de 1 Lt
14. Tubos Falcon de 50 mL
15. Agitador magnético con platina térmica (marca: Barnstead / Thermolyne, Modelo: SP131325)
16. Espátula

## **Reactivos**

1. Formaldehído en solución al 38% (J.T.Baker)
2. Alcohol Etílico Absoluto (High Purity)
3. Glicerina (Mallinckrodt)
4. Parafina (McCormick)
5. Agua desionizada
6. Xileno (J.T.Baker)
7. Borato de sodio (J.T.Baker)
8. Fosfato monobásico (J.T.Baker)
9. Fosfato dibásico de sodio anhidro (J.T.Baker)
10. Etanol absoluto (J.T Baker)
11. Hematoxilina (J.T Baker)
12. Oxido rojo de mercurio (CIVEQ)
13. Alumbre de potasio (QUIMINET)
14. Fucsina básica (HYCEL)
15. Ácido fénico (REASOL)
16. Eosina (HYCEL)
17. Floxina (FLUKA)
18. Azul de metileno (SIGMA)
19. Ácido acético glacial (J.T Baker)

## **Material de vidrio**

1. Vasos de precipitados de 10, 50 y 100 mL.
2. Probetas de 10, 100 y 1000 mL.

## **7.5 Observación al microscopio e interpretación**

Las preparaciones histopatológicas obtenidas fueron observadas para su análisis y valoración histopatológica en un microscopio binocular compuesto de campo claro (Olympus BX41), la observación se realizó con los objetivos 40x, 100x, y 400x.

Para clasificar las lesiones histopatológicas granulomatosas encontradas, se elaboraron formatos en Excel, las cuales se muestran en el Anexo V.

Los formatos de evaluación se elaboraron principalmente basándose en los tipos celulares y los cambios patológicos que caracterizan a la inflamación crónica granulomatosa.

Una vez caracterizadas las células presentes en el tejido evaluado, se procedió a clasificar el tipo de granuloma presente en el, para esto se utilizaron igualmente formatos en Excel, basándose en estudios previos con la finalidad de clasificar el tipo de granuloma presente grado I, II, III y IV (Anexo VI), tomando como base los criterios de Palmer, *et.al.*, 2007; Wangoo, *et.al.*, 2005, dichos criterios se mencionan a continuación:

## **CLASIFICACIÓN DE GRANULOMAS**

Granuloma Grado I (inicial): Se caracteriza por la acumulación de células epitelioides con un bajo número de linfocitos y neutrófilos. Las células gigantes multinucleadas pueden estar presentes y no se observa necrosis. Pueden observarse bacilos alcohol ácido resistentes dentro de macrófagos o células gigantes multinucleadas.

Granuloma Grado II (sólido): Se caracteriza por la acumulación de células epitelioides rodeadas por una cápsula delgada de tejido conectivo colágeno denso irregular. Los infiltrados de neutrófilos y linfocitos pueden presentarse al igual que las células gigantes multinucleadas. La necrosis puede ser mínima y los BAAR, cuando están presentes, se observan dentro de los macrófagos o células gigantes multinucleadas.

Granuloma Grado III (necrosis): Se caracteriza por encapsulación fibrosa completa, núcleos necróticos rodeados por una zona de células epitelioides mezcladas con células gigantes multinucleadas y linfocitos.

Granuloma Grado IV (necrótico y mineralizado): Se caracteriza por una cápsula fibrosa gruesa que rodea a un granuloma multicéntrico irregular con múltiples núcleos necróticos. Los núcleos necróticos contienen focos de calcificación distrófica.

Las células epitelioides y células gigantes multinucleadas rodean las áreas de necrosis, y con frecuencia hay infiltrados de linfocitos de grado moderado a severo.

Los BAAR se presentan a menudo en cantidades moderadas y en primer lugar situados dentro de la estructura caseosa del núcleo necrótico.

## **VIII. RESULTADOS**

De octubre de 2009 a febrero de 2010, murieron 306 bovinos por distintas causas de un total de 22,000 bovinos en producción. Las causas más frecuentes fueron: cirrosis hepática (8.49%), tuberculosis bovina (7.84%), acidosis ruminal (7.5%), lipidosis hepática (6.87%) y bronconeumonía exudativa crónica (6.20%). El resto de las causas de muerte fueron relacionadas con problemas de tipo reproductivo. El número promedio de necropsias que se realizaron fue de 3 necropsias/establo/semestre.

### **Estudio Anatomopatológico**

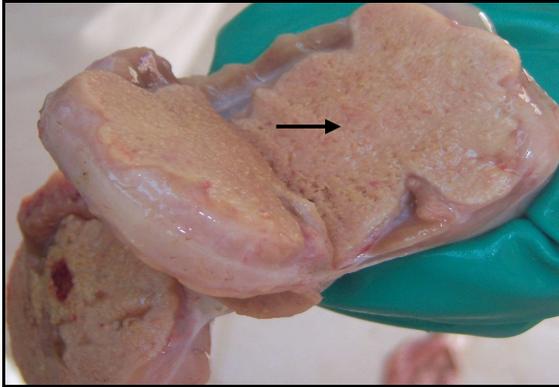
Se analizaron un total de 50 animales por necropsia de 3 a 5 años de edad, con la presencia de lesiones sugerentes de TBb, obteniéndose los siguientes órganos: linfonodos retrofaríngeos (48), traqueobronquiales (49), mediastínicos (50), mesentéricos (48), retromamarios (46), hepáticos (4), pulmones (50) y glándula mamaria (46), obteniendo un total de 341 muestras.

En la inspección macroscópica, 50 canales presentaron lesiones visibles en al menos en algunos de los tejidos seleccionados para este estudio, de un total de 306 canales dentro del periodo de estudio. De las 341 muestras analizadas, 115 presentaron las lesiones sugerentes a TBb, los linfonodos asociados a la región torácica fueron los más afectados: mediastínicos y traqueobronquiales, 60% y linfonodos de la cabeza: 12% de retrofaríngeos.

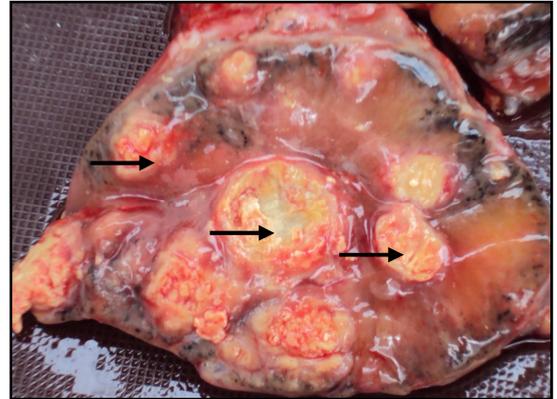
Un criterio macroscópico muy importante a considerar para determinar si las lesiones correspondían a TBb, fue que debían presentar un aspecto nodular de color amarillento, de consistencia caseosa, y en algunos otros casos crepitación al corte. El tamaño de los granulomas fue variable desde 2 cm hasta los 25 cm de diámetro aproximadamente (Figura 6).

En algunos otros linfonodos solo se observó un aumento de tamaño, que al realizar el corte en el parénquima denotaban una coloración rojiza entre la corteza y la médula.

A)



B)



C)

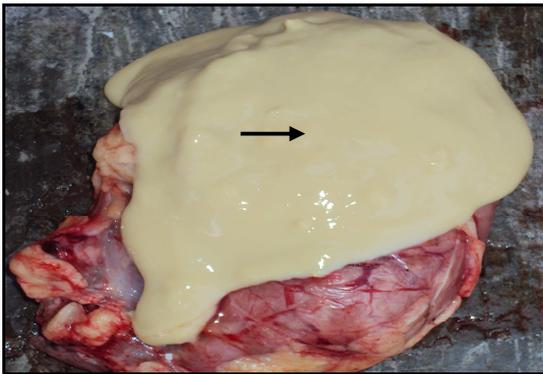


Figura 6. Linfonodos. A) Linfonodo mesentérico: se observan lesiones granulomatosas calcificadas. B) Linfonodo traqueobronquial: se observan lesiones multigranulomatosas tanto en corteza como médula. C) Linfonodo mediastínico con exudado caseoso.

### Análisis Histopatológico

Los resultados de las evaluaciones histopatológicas se muestran en el Anexo VII. Al realizar el análisis histopatológico se encontraron 115 tejidos con lesiones granulomatosas lo que representa un 34%, del total de las muestras recolectadas, distribuyéndose de la siguiente manera: del tipo I un 15% (Anexo IX Fig. 7); del tipo II 23% (Anexo X Fig. 8); del tipo III 31% (Anexo XI Fig. 9, XII Fig. 10, XIII Fig. 11) y del tipo IV un 31% (Anexo XIV Fig. 12, XV Fig. 13 y XVI, Fig. 14). En el Cuadro se muestra el resumen de las evaluaciones histopatológicas.

En todos los tejidos analizados se encontraron lesiones de los cuatro tipos a excepción de los linfonodos hepáticos donde no se encontraron granulomas tipo I, II y III; en los linfonodos retromamario no hubo presencia de granulomas tipo I y III; en las glándulas mamarias no se encontraron granulomas tipo I y IV, por último en los linfonodos retrofaríngeos no hubo granulomas tipo II.

Cuadro 2. Resumen de las evaluaciones histopatológicas

LN RECOLECTADO	CLASIFICACIÓN DEL GRANULOMA			
	I	II	III	IV
MEDIASTÍNICO	9	10	15	9
TRAQUEOBRONQUIAL	4	10	7	6
RETROFARÍNGEOS	3	0	3	8
MESENERICO	1	2	3	6
RETROMAMARIO	0	2	0	1
HEPÁTICO	0	0	0	3
PULMÓN	0	1	6	3
GLANDULA MAMARIA	0	1	2	0
<b>TOTAL</b>	<b>17</b>	<b>26</b>	<b>36</b>	<b>36</b>

El tejido más frecuentemente afectado fue el linfoide, dentro de este el linfonodo mediastínico presentó mayor frecuencia de lesiones granulomatosas 43/50 (86%), seguido del linfonodo traqueobronquial el cual obtuvo 27/49 (55%), retrofaríngeo 14/48 (29%) y el mesentérico 12/48 (25%) y el retromamario 3/46 (6.5%). Solo 6/50 (12%) de los pulmones recolectados presentaron del tipo III.

Los resultados de las evaluaciones histopatológicas de las muestras, detallando el tipo de granuloma de los tejidos, así como los resultados de la tinción de ZN y el cultivo se presentan en el (Anexo VIII).

Con respecto a la tinción de ZN de las muestras colectadas (Cuadro 3), solo el 18% (62/341) resultaron positivas, dentro de estas destaca el linfonodo mediastínico con el 44% (22/50), seguido del traqueobronquial 28.5% (14/49), el resto de los órganos se encuentra entre un 16 y 4%; aunque con pocas muestras el hepático presentó el 75% (3/4) y la glándula mamaria solo 1/46 fue positiva (Anexo XVII, Fig. 15).

Cuadro 3. Resumen de los resultados de la tinción de ZN

<b>LN RECOLECTADO</b>	<b>ZN +</b>
MEDIASTÍNICO	22/50
TRAQUEOBRONQUIAL	14/49
RETROFARÍNGEO	8/48
MESEENTERICO	6/48
RETROMAMARIO	2/46
HEPÁTICO	3/4
PULMÓN	6/50
GLANDULA MAMARIA	1/46
<b>TOTAL</b>	<b>62</b>

Los resultados de este estudio indican que hay un alto grado de asociación entre las lesiones macroscópicas observadas durante la inspección *post-mortem* y el diagnóstico histopatológico, ya que al observar una lesión sugerente de TBb, la mayoría de las veces pudo observar a nivel microscópico. Sin embargo hubo 4/50 donde al realizar la IPM no hubo las lesiones características de la TBb, pero cuando se realizó la histopatología de las mismas se pudo observar las lesiones típicas de la enfermedad.

### **Análisis Bacteriológico**

Se realizó cultivo en 84 muestras de 341 colectadas, considerando aquellos órganos que a la inspección postmortem presentaron características de lesiones sugestivas a TBb. Se obtuvieron 78 cultivos positivos para *M. bovis* (Cuadro 4), uno de *M. vaccae*, *M. fortuitum* y *Mycobacterium sp.* y 3 negativos.

Cuadro 4. Resultados del cultivo a *M. bovis*

<b>LN RECOLECTADO</b>	<b>RESULTADO CULTIVO</b>
MEDIASTÍNICO	35/50
TRAQUEBRONQUIAL	22/49
RETROFARÍNGEO	10/48
MESENTÉRICO	5/48
RETROMARIO	0/46
HEPÁTICO	2/4
PULMÓN	3/50
GLANDULA MAMARIA	1/46
<b>TOTAL</b>	<b>78</b>

En cuanto a la susceptibilidad, se encontraron 52 aislados susceptibles; del total uno fue resistente a isoniacida y otro a estreptomycinina.

### **Análisis estadístico**

La prueba *Kappa* es un índice de concordancia de medidas independientes de una misma muestra. El coeficiente kappa toma valores que van desde -1 hasta +1; mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia. Por el contrario, un valor de  $< 0$  ó  $= 0$  refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. La interpretación de los rangos de los valores se describe en el cuadro 5.

Cuadro 5. Interpretación de la prueba de *Kappa*.

<b>Valor de <i>Kappa</i></b>	<b>Interpretación</b>
<0	Sin acuerdo
0-0,4	Pobre
0,4-0,8	De aceptable a buena
0,8-1	Excelente

Se calcularon los coeficientes de *Kappa* (k) para determinar la concordancia entre las pruebas diagnósticas utilizadas. Con respecto a la concordancia entre las lesiones a la inspección *post mortem* (granulomas) y la presencia de BAAR (ZN) obtuvimos un resultado de  $k=0.59$  (Cuadro 6, Anexo XVIII) ( $p<0.05$ ), lo que indica una concordancia de aceptable a buena. La concordancia entre el ZN y el cultivo fue de  $k=0.53$  (Cuadro 7, Anexo XVIII) ( $p<0.05$ ), indicando una concordancia de aceptable a buena. En cuanto a la concordancia entre granuloma y cultivo fue  $k=0.70$  (Cuadro 8, Anexo XVIII) ( $p<0.05$ ), que se interpreta como una concordancia buena.

## **IX. DISCUSIÓN**

### **Estudio macroscópico**

Los resultados de este estudio indican que hay un alto grado de asociación entre las lesiones macroscópicas observadas durante la IPM y el diagnóstico histopatológico, ya que al observar una lesión sugerente de TBb, la mayoría de las veces se observó lo propio a nivel microscópico.

Sin embargo hubo 4 de 50 casos donde al realizar la IPM, no se observaron las lesiones características de la TBb, pero cuando se realizó la histopatología de las mismas, se observaron las lesiones típicas de la enfermedad. Esto último concuerda con lo reportado por Whipple *et al.* (1996), que al analizar las muestras de linfonodos (LN) mediante cultivo e histopatología para TBb, encontraron cierto número de órganos positivos, los cuales no habían presentado lesiones macroscópicas de TBb a la IPM.

La ausencia de lesiones visibles puede deberse a varios factores como son, que la lesiones hayan sido muy pequeñas para poderse observar a simple vista, recordando que la IPM está sujeta a error humano (Corner, 1994; Corner *et al.*, 1990).

También es factible que la infección haya sido reciente en estos animales, o que no se alcanzó la dosis infectiva necesaria para causar lesiones macroscópicas observables. Existe un trabajo realizado por Menzies *et al.* (1992), donde al inocular 92 unidades formadoras de colonias (UFC), no hubo desarrollo de lesiones visibles al sacrificio a los 300 días post-inoculación.

En el presente estudio, las lesiones macroscópicas de la TBb fueron encontradas más frecuentemente en los LN asociados a la cavidad torácica: (mediastínicos y traqueobronquiales) y LN de la cabeza: (retrofaríngeos); lo que coincide con lo reportado por otros autores los cuales reportan que los LN más afectados son los relacionados con la cavidad torácica donde se reporta hasta un 60% de lesiones y en segundo lugar, los LN de la cabeza con un 26% (Whipple *et al.*, 1996; Menzies *et al.*, 2000).

Con respecto a las lesiones macroscópicas en pulmones, estudios realizados previamente indican que las lesiones en pulmón son detectadas en un 10% a 17% de ganado tuberculoso, que en conjunto con las lesiones encontradas en los LN, son considerados los focos primarios en la patogénesis de la enfermedad (Corner *et al.*, 1990).

Lesiones únicas encontradas en LN hepáticos podrían ser indicio de una infección diseminada a partir de un foco primario. Una vez establecido este complejo se produce la diseminación post-primaria en la cual los bacilos dan origen a granulomas en los órganos donde se detienen; esta diseminación de las lesiones se puede realizar por vía linfática o sanguínea. En el caso de la diseminación por vía sanguínea los focos de infección se producen sobre todo en pulmón, riñón, hígado y bazo en animales viejos (Goodchild *et al.*, 2001).

Igualmente se encontraron lesiones en glándula mamaria y LN retromamarios, que coinciden con resultados similares en un estudio previo, donde solo un 2% de vacas tuberculosas tienen infección en glándula mamaria (Estrada, 1995)

Esta mastitis tuberculosa posee una importancia excepcional, no sólo por ser fuente de transmisión para los becerros, sino porque puede contagiar al hombre en el momento del ordeño. Las ubres infectadas por vía sanguínea pueden eliminar bacilos en leche sin que aparezca mastitis clínica y constituye la principal fuente de infección para el ser humano (Menzies *et al.*, 2000).

Es importante mencionar que para que el animal desarrolle la enfermedad es necesario que se conjunte factores propios del animal (función zootécnica, etapa reproductiva, sexo, edad, raza) y factores externos (prácticas zootécnicas, tamaño del hato, densidad de población, instalaciones, hacinamiento, deficientes prácticas de sanidad), las cuales intervienen en el proceso de desarrollo y transmisión de la enfermedad (Menzies *et al.*, 2000).

### **Estudio histopatológico**

En todos los órganos analizados se encontraron lesiones de los 4 tipos definidos. Las lesiones estaban localizadas principalmente en LN mediastínicos, traqueobronquiales y retrofaríngeos.

Las lesiones encontradas de tipo I corresponden a lesiones tempranas, donde se observó una acumulación de células epitelioides con bajo número de linfocitos y neutrófilos; respecto a las lesiones del tipo II se caracterizaron por tener poca necrosis, mineralización y una cápsula definida pero delgada; las lesiones encontradas del tipo III correspondieron a granulomas típicos crónicos bien encapsulados y mineralizados con necrosis central extensa, mientras que las lesiones de tipo IV nos indicaron cronicidad de la enfermedad, encontrándose en animales de mayor edad (Goodchild *et al.*, 2001).

Dentro del CAIT, es rara la movilización de animales, excepto cuando llegan por primera vez y son transferidos del área de cuarentena hacia el establo destino. Lo que puede sugerir que la principal vía de transmisión es la aerógena, dada por las condiciones de hacinamiento entre animales y por la cercanía de explotaciones contaminadas. En la mayoría de los animales se encontraron lesiones de los diversos tipos debido a que cada lesión es un proceso independiente.

Además, es importante definir si el inicio de los procesos es vía endógena o exógena, debido a confluencia y diseminación de bacilos a partir de un foco primario o debido a una reinfección resultado de la transmisión y contacto entre dos animales infectados (Goodchild *et al.*, 2001).

Algunas de las lesiones microscópicas mostraron una presencia importante de un infiltrado polimorfonuclear. Se sabe que los neutrófilos son atraídos al sitio por la acción quimiotáctica de la IL-8 y el TNF $\alpha$  los cuales juegan un papel importante en la etapa inicial de la patogenia y en la formación del granuloma como se pudo observar en algunos tejidos (Cassidy, *et al.*, 2006; Varello 2008).

Respecto a los resultados de la tinción de ZN, solo el 18 % de las muestras fue positiva a la tinción, situación que no concuerda con lo reportado en otro estudio, donde se obtuvo un 53% de muestras positivas a la tinción de ZN; esto podría explicarse debido a que la mayoría de las muestras analizadas presentaron granulomas tipo III y IV los cuales se caracterizan por tener mayor cantidad de necrosis y mineralización, que podría disminuir la viabilidad de los bacilos por la necrosis y licuefacción del tejido (Sulieman, 2002). Otro trabajo indica que para observar bacilos es necesario una cantidad de por lo menos  $10^5$  UFC/ml en el tejido, por lo que se puede aseverar que los tejidos examinados, tenían una menor cantidad de bacilos (Cassidy, 2006).

### **Cultivo**

Los resultados de cultivos fueron comparados con los resultados de las evaluaciones histopatológicas, encontrándose resultados compatibles. En la mayoría de los tejidos en donde se observaron lesiones características (granuloma), se pudo aislar bacilos ácido alcohol resistentes.

Los 50 bovinos presentaron lesiones sugerentes a TBb en al menos en uno de los siete órganos muestreados, en total se muestrearon 341 órganos. En la IPM 98% del total de órganos presentaba lesiones macroscópicas, para la prueba histopatológica por HE se obtuvieron lesiones sugerentes a TBb en 115 tejidos del total analizado (37%); en el caso de prueba histopatológica por ZN solo se observó el 18% de los tejidos con bacilos ácido alcohol resistente.

En el cultivo en medios específicos, se obtuvieron 78 muestras positivas de 84 cultivos realizado para *M. bovis*, además se aisló otras micobacterias como fueron: *M. vaccae*, *M. fortuitum* y *Mycobacterium sp* y en 3 cultivos no se aisló ninguna micobacteria, por lo que las lesiones encontradas en el estudio histopatológico y en la IPM pudieron ser causadas por otros agentes etiológicos como pueden ser actinomicosis, actinobacilosis, aspergilosis, arcanobacteriosis, migraciones larvarias y linfosarcoma (CFSPH, 2007).

El cultivo de *M. bovis* se considera como el estándar de oro en el diagnóstico definitivo de la TBb, sin embargo, requiere mucho tiempo, equipo, personal calificado y se pueden tener falsos negativos, debido a la baja sensibilidad que presenta el cultivo, situación que al igual que lo reportado en estudios previos obtuvimos en este trabajo, esto se debe entre otras causas a la escasez de microorganismos viables o cultivables en las lesiones crónicas, dado que la mayoría de las lesiones histopatológicas encontradas fueron del tipo III y IV las cuales se caracterizan por tener una extensa fibrosis, necrosis, y mineralización indicando en buena medida la cronicidad de las lesiones dificultando el aislamiento de la bacteria.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS), reconoce la alta incidencia de resistencia a las drogas de primera línea, por lo cual ha cobrado vital importancia realizar el antibiograma a todas las cepas del complejo *M. tuberculosis* (*M. bovis* y *M. tuberculosis*) aisladas para poder instaurar un tratamiento efectivo y así evitar que la resistencia vaya en aumento (Fagundo, 2004). De los aislados obtenidos en este trabajo se les realizó las pruebas de susceptibilidad, se encontraron 52 aislados susceptibles; del total uno fue resistente a isoniácida y otro a estreptomycinina

Con respecto a la concordancia entre las lesiones a la inspección *post mortem* (granulomas) e histopatológicas se obtuvo un resultado de  $k=0.59$  indicando que no es una concordancia debida al azar, ya que al tener una lesión visible sugerente a TBb se puede encontrar una lesión I, II, III y IV con las características histopatológicas antes descritas. Asimismo la concordancia entre la tinción de ZN y cultivo fue de  $k=0.53$ , lo que nos indica que al estar presentes los BAAR se pueden aislar en el cultivo.

La concordancia entre granuloma y cultivo fue  $k=0.70$  lo que está relacionado que al observar la lesión histopatológica característica de la TBb: granuloma se pudo aislar a la *M. bovis*. En estudios similares los resultados son semejantes a excepción de la concordancia obtenida en cultivo donde fue menor debido a que existen otras especies de bacterias que causan lesiones granulomatosas similares a la TBb, o bien pudo deberse a una toma de muestra inadecuada o errores durante el procesamiento de la misma (Estrada, *et al.*, 2004)

La detección de ganado tuberculoso durante la IPM, requiere la presencia de lesiones macroscópicas, en los sitios que se examinan de forma rutinaria en el rastro. Los resultados de este trabajo, indican que la mayoría del ganado infectado con lesiones macroscópicas, puede ser detectado por la inspección cuidadosa de los LN de la cavidad torácica y cabeza, siempre y cuando el diagnóstico sea complementario ya sea con la histopatología y cultivo o bien otra prueba. Hay una buena concordancia entre la histopatología y el cultivo, sugiriendo que la evaluación histopatológica es una herramienta confiable para el diagnóstico de la TBb, que nos permite la identificación de las lesiones tuberculosas típicas.

## X. CONCLUSIONES

- La infección por *M. bovis* es frecuente en el CAIT.
- El LN mediastínico fue el más afectado (87%) del total de los casos.
- El grado de granuloma predominante fue el tipo III (32%), de los cuatro tipos presentes.
- Con la tinción de ZN se detectó el BAAR con mayor frecuencia en el LN mediastínico (51%).
- El 18% de las muestras presentaron un ZN positivo.
- De los 36 establos de donde procedían los animales, solamente en uno de ellos se presentaron el mayor número de muertes (7 en total).
- Este trabajo permitió reforzar la importancia que tiene la clasificación (tipificación) histopatológica de las lesiones para obtener información de la epidemiología de la TBb en el complejo, para poder así determinar otras posibles causas de la formación de los granulomas.
- Se obtuvieron 52 aislados susceptibles; del total uno fue resistente a isoniacida y otro a estreptomina.

## **XI. PERSPECTIVAS**

- Realizar la genotipificación de los aislados obtenidos, y compararlos con los aislados de los demás establos.
- Determinar cuáles cepas aisladas son las más patógenas en cuanto a las lesiones macroscópicas y microscópicas.
- Realizar estudios en otras especies como perros, aves, fauna silvestre, por el desecho de las vísceras de forma inadecuada.

## XII. REFERENCIAS

Acha PN, Szyfres B. Zoonotic tuberculosis. (2007). In: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 2<sup>ad</sup> Ed. Washington: Pan American Health Organization/World Health Organization; Scientific Publication No. 503.pag:266-280.

Bernad, D.1987. Tratado de Microbiología. 4a .Edición .Salvat Editores S.A México. P.868-839.

Biet, F., Boschioli, M., Thorel, M., y Guilloteau, L. (2005) Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare complex* (MAC). American Journal of Veterinary Research. 36(3), 411-436.

Bloom BR. (1994).Tuberculosis: Pathogenrotection and control. American Society for Microbiology Press, USA. pag 145-155.

Bovine Tuberculosis .Disponible en URL: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine\\_tuberculosis.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf).The Center for Food Security and Public Health.Iowa State University. Consultado en: Julio 2010.

Estrada ,C. C. (1995). Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de intradermorreacción, interferón-gama y ELISA, bajado en la inspección *postmortem*. Tesis de Licenciatura. Departamento: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.

Campuzano, JC. (2001). Comparación de diferentes pruebas anatomopatológicas y microbiológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Tesis de Maestría. Ciudad Universitaria. UNAM. México.

Cassidy, J., Bryson, D., Pollock, J., Evans, R., Forster, F., y Neill, S. (2006) Lesions in Cattle Exposed to *Mycobacterium bovis* -inoculated Calves. Journal of Comparative Pathology.121(4), 321-337.

Cousins, D., Wilton, S., Francis, B., y Gow, B. (1992).Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. Journal Clinical Microbiology.30 (3), 255-258.

Corner, L. (1994). Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Microbiology. 40, 53-63.

Comer, L., Melville, L., y McCubbin, K (1990). Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. Australian Veterinary Journal. 67,389-392.

David, E. (2006). Granulomas in the liver. Seminars in Diagnostic Pathology. 23(2), 161-169.

De Lisle, G., Mackintosh, C., y Bengis, R. (2001). *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 20, 86–111. Office International des Épizooties

Díaz, O., Jaramillo, M., Arriaga, D., González S., y Estrada, C. (2003). Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Veterinaria México* .34 (2), 13-26.

Díaz, O., Arriaga, D., Villegas, S., Pérez, G., y González, S. (2004). Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*. 35, 3 1-8

Estrada, F. JJ. (2007). Expresión diferencial de los genes de la familia PE de los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado. Departamento de Inmunología.UNAM. México.

Fagundo, S., Cerros, S., y Herrera, P. (2004). Ventajas del cultivo en un equipo automatizado y la prueba de PCR para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis*. *Revista Mexicana de Patología Clínica* 51,2 70-74.

Felton, M., y Vermeulen, M. (1996). Inmunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infected Immunology*.64 (3), 683-690.

Gaby E. Pfyffer. *Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures*. En Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, PfallerMA. (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 9th edición. Washington, D.C. American Society of Microbiology Press. 2007, pag. 543-572.

García CL, Milian SF, Anaya EAM. Situación de la tuberculosis bovina en México 1990-2004. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. Memorias del XXXIX Congreso Nacional de Buiatría 2005. 11-13 de agosto de 2005. Puebla, (Puebla) México. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos. 2005.

Gorocica, P., Jiménez, M., Garfias, Y., Sada, I., y Lascurain, R. (2005). Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*.18 (2), 142-153.

Global tuberculosis control. Disponible en URL: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf) 2010. Organización Mundial de la Salud (OMS). Consultado en: Febrero 2011.

Goodchild, A., y Clifton, H. (2001). Cattle to cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. 81, 23-41.

Grange JM, Thoen OC. (1995). Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection Part 1. *Mycobacterium bovis* infection in animals and Humans. Steele, H.J. Iowa State University Press/Ames. pag 29-46.

Liebana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gomez-Mampaso E, y Tercero, J. (1995) Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal Clinical Microbiology*. 33 (4), 33-36.

Manual de la OIE sobre animales terrestres. Disponible en URL: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.3.03\\_Tuberculosis\\_bovina.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.03_Tuberculosis_bovina.pdf). 2008 Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Consultado en: Mayo 2010.

McNeill, M., Brennan, P., (1991). Structure ,function and biogénesis of the cell envelope of mycobacterial in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance , some thoughts and possibilities arising from recent structural information *Research Microbiolgy*. 142 (4), 451-463.

Menzies, F., y Neill, S. (1992). Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *The Veterinary Journal* . 160, 92–106.

Moda, G., Daborn, C., Grange, J., Cosivi, O. (1996) .The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and lung disease*. 77. 103-108.

Monaghan, L., Doherty, M., Collins, J., Kazda, J., y Qinn, P. (1994). The tuberculin test. *Veterinary microbiology*. 40 (2), 111-124.

*Norma Oficial Mexicana*. Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*), NOM-031-ZOO-1995. Diario Oficial marzo de 1996. Disponible en: URL: <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc468/> 2004. Consultado en: Septiembre 2009.

McNeill, S., Hanna, J., Mackie, D., y Bryson, T. (1992). Isolations of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test –negative cattle. *Veterinary record*. 131 (3), 45-47

Neill, S., Pollock, J., Bryson, D., y Hanna, J. (1994). Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle . *Veterinary Microbiology*. 40 (2), 41-52.

Palmer, M., Waters, W., y Thacker, T. (2007). Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Pathology*. 44 (4), 863-874.

Prophet EB, Millis B, Arrington JB, Sobin LH. (1995). Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). Washington, DC.

Ryan, T., Buddle, B., y De Lesli, G., (2000). An evaluation of the gamma interferon test for detecting Bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing Research in Veterinary Science. 69, 57–61

Robin, A., Skuce, M., Siobhan, H., Malcolm, J., Taylor, R., y Sydney, D. (2006). Detection of pathogenic *Mycobacteria* of veterinary importance. Methods in Molecular Biology. 216 (2), 201-221.

Roberts G, Koneman E. (1991). *Mycobacterium* .In: Manual of clinical microbiology. 5<sup>ed</sup> Ed. American Society for Microbiology .Washington D.C. pag 735-750.

Romero, T., Arriaga, D., Guevara, V., García, S., Torres, L., y Estrada, C. (2006) Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero. Veterinaria México. 37(1), 137-143.

Romero, T., Estrada, C., García, S., Guevara, V., y Arriaga, D. (2008). Asociación de la excreción de *Mycobacterium bovis* con la respuesta inmune específica en un hato de alta prevalencia. Veterinaria México 39,4 1-7

Schlossberg D. 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. 4 edición. Mc Graw Hill. pag 450-465.

Sudre, P., Ten, D., y Kochi, G. A. (1992). Tuberculosis in the present time. A global overview of tuberculosis situation .Bull World Health Organ. 70(2), 149-159

Suliman, M., y Hamid, M. (2002). Identification of acid fast bacteria from caseous lesions in cattle in Sudan. Journal of Veterinary Medicine. 49(9), 415-418.

Taylor, G., Worth, D., y Jahans, K. (2008). Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. Indian Journal Medical Research. 12 (3), 26-31.

Torres, L. R-A. (2005). Correlación histopatológica de lesiones sugestivas a tuberculosis bovina con la presencia de *Mycobacterium bovis* analizada mediante la prueba de reacción de la cadena de la polimerasa (PCR). Tesis de licenciatura. Departamento: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.

Trigo, F. (1996). Patología sistémica Veterinaria .3<sup>er</sup>. Edit. McGraw-Hill Internacional. México.

Vadillo MS, Píriz DS, Mateos YEM. Género *Mycobacterium*. (2002). En Manual de microbiología veterinaria. 2<sup>ad</sup> España: McGraw-Hill/interamericana de España, S.A.U. pag: 507-518.

Varello, K., Pezzolato, M., Mascarino D., Ingravalle F., Caramelle M y Bozzetta, E. (2008). Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20,2 1-6.

Véronique Vincent and M. Cristina Gutiérrez. *Mycobacterium: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria*. En Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 9th edición. Washington, D.C. American Society of Microbiology Press. 2007, pag.573-588

Wangoo, A., Johnson, J., Gough, R., Ackbar, S., Inglut, D., Hicks, Y., Spencer, G., Hewinson, T., y Vordermeier M. (2005). Advanced Granulomatous Lesions in *Mycobacterium bovis*-infected Cattle are Associated with Increased Expression of Type I Procollagen, gd (WC1C) T Cells and CD 68C Cells. *Journal of Comparative Pathology*. 133 (4), 223-234.

Whipple, D., Bolin, C., y Miller, J. (1996). Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 8,351-354.

WHO. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO report 2008. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2008.393). Disponible en URL: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/es/index.htm>. Consultado en: Agosto 2010

### XIII.ANEXOS

#### Anexo I: Preparación de soluciones

- Solución de formalina neutra al 10% tamponada

Para preparar 1 L de formalina

$$\begin{array}{r} 100 \text{ ——— } 1000 \\ 10 \quad \quad \quad x \end{array}$$

X= 100 mL de formalina más 900 mL de agua destilada

$$\begin{array}{r} 1000 \text{ ——— } 4 \\ 1000 \quad \quad x \end{array}$$

X= 4 g de fosfato monobásico

$$\begin{array}{r} 1000 \text{ ——— } 6.5 \\ 1000 \quad \quad x \end{array}$$

X= 6.5 g de fosfato dibásico

Procedimiento:

1. En una platina térmica-agitador se colocan 500 mL de agua destilada.
2. Posteriormente se agregan los 4 g de Fosfato monobásico.
3. Una vez disuelta totalmente la sal, se agregan 50 mL de la Formalina.
4. A continuación se agregan los 6.5 g de Fosfato dibásico mas el resto de agua destilada.
5. Por último se adicionan los 50 mL de Formalina restante, y se deja mezclar por 5 min.

- Alcohol etílico al 95 %

Para preparar 100 mL de Alcohol etílico al 95 %

$$\frac{100}{95} = \frac{100}{x}$$

X= 95 ml de Alcohol etílico absoluto más 5 ml de Agua destilada

Para preparar 1 Litro de Borato de Sodio saturado

Procedimiento:

1. Se pesan 20 g de Borato de Sodio
2. En una platina térmica-agitador se colocan 1000 mL de agua destilada.
3. Posteriormente se agrega los 20 g del Borato de Sodio.
4. Se deja mezclar por 10 min.

## Anexo II: Preparación de colorantes

- Carbol- Fucsina

Para preparar 50 mL de carbol- fucsina, se requirieron los siguientes reactivos

Cristal fenol derretido..... 2.5 mL

Alcohol etílico absoluto..... 5.0 mL

Fucsina básica..... 0.5 g

Agua destilada ..... 50.0 mL

Procedimiento:

1. En una platina térmica-agitador se coloca una probeta de 10 mL, agregándose poco a poco cristales de fenol hasta alcanzar un volumen de 2.5 mL.
2. En un vaso de precipitado se agregan los 5.0 mL alcohol etílico absoluto más 0.5 g de fucsina básica, mezclándola suavemente.
3. Posteriormente se le agregan 50 mL del agua destilada, junto con los 2.5 mL del cristal fenol derretido, hasta obtener una mezcla homogénea.

- Solución matriz de Azul de Metileno

Para preparar 100 mL de la solución matriz de azul de metileno

Procedimiento:

1. Se pesan 1.4 g de azul de metileno
2. En un vaso de precipitado se agregan los 100 mL alcohol etílico al 95% más 1.4 g de azul de metileno mezclando suavemente hasta homogenizar.

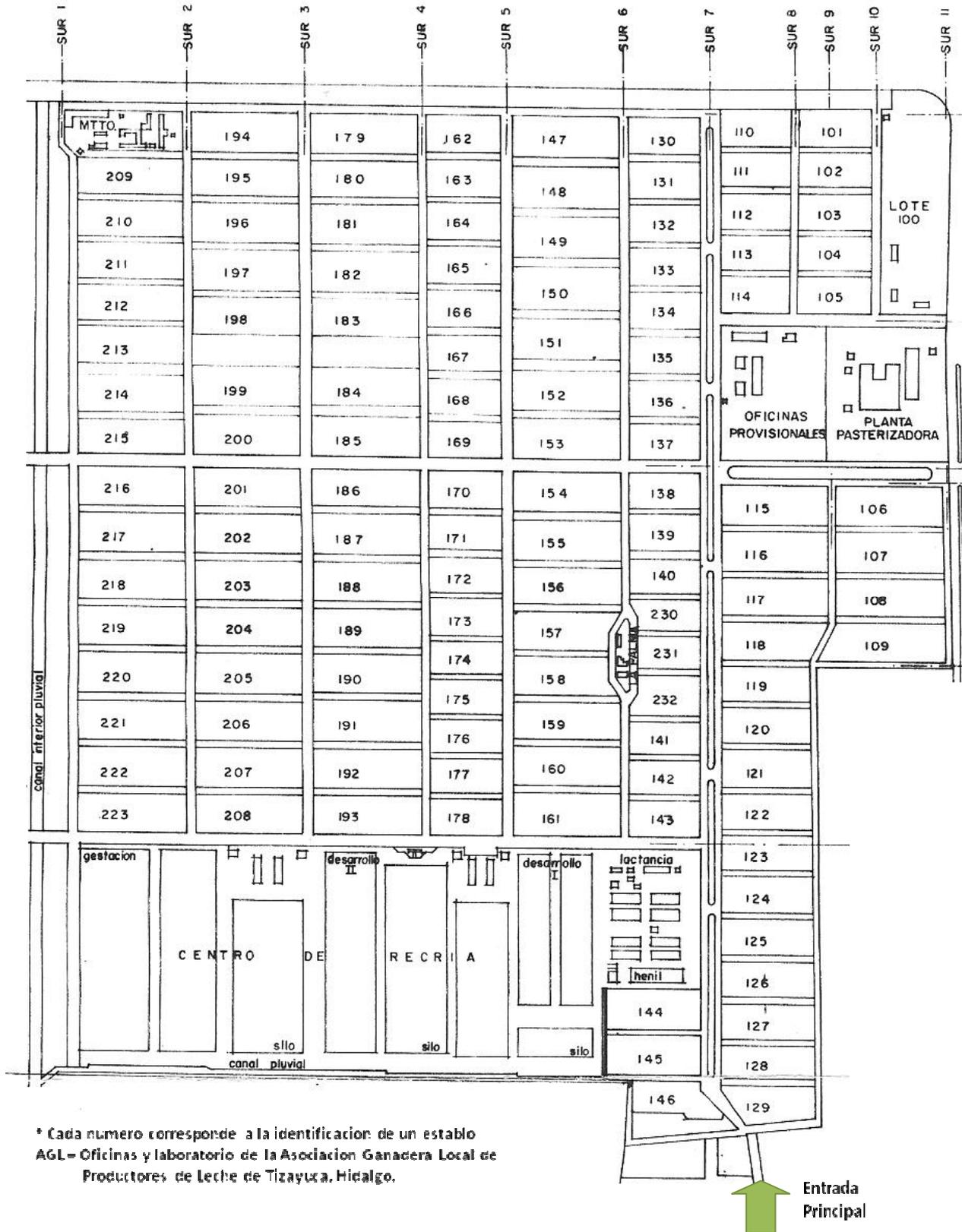
Para la solución diaria de azul de metileno se toman 10 mL de la solución madre más 90 mL de agua de la llave.

**Anexo III: Bitácora de muestras recolectadas de bovinos con lesiones sugerentes a tuberculosis bovina**

Fecha	Núm. muestra	Núm. arete	Metálico	Edad	Raza	Sexo
19-Oct-09	1	1409		1 año	H	H
20-Oct-09	2	945		4 años	H	H
20-Oct-09	3	43		3 años	H	H
20-Oct-09	4	411		4 años	H	H
26-Oct-09	5	431		4 años	H	H
26-Oct-09	6	867		6 años	H	H
26-Oct-09	7	861		6 años	H	H
27-Oct-09	8	34		5 años	H	H
04-Nov-09	9	280		3 años	H	H
05-Nov-09	10	140		4 años	H	H
05-Nov-09	11	293		5 años	H	H
05-Nov-09	12	1386		4 años	H	H
09-Nov-09	13	230		6 años	H	H
09-Nov-09	14	3EFN1122		2 años	H	H
09-Nov-09	15	101		3 años	H	H
09-Nov-09	16	470		3 años	H	H
11-Nov-09	17	165		4 años	H	H
23-Nov-09	18	6532	130025	3 años	H	H
24-Nov-09	19	4246		5 años	H	H
24-Nov-09	20	SIN ARETE		4 años	H	H
27-Nov-09	21	2135		7 años	H	H
27-Nov-09	22	494		4 años	H	H
27-Nov-09	23	722	3940	5 años	H	H
30-Nov-09	24	575	3440	3 años	H	H
30-Nov-09	25	536		6 años	H	H
01-Dic-09	26	216		5 años	H	H
01-Dic-09	27	860		3 años	H	H
01-Dic-09	28	57	6802	4 años	H	H
07-Dic-09	29	118		3 años	H	H
07-Dic-09	30	4127		2 años	H	M
07-Dic-09	31	1598		3 años	H	H
08-Dic-09	32	781		3 años	H	H
08-Dic-09	33	SIN ARETE		2 años	H	H
09-Dic-09	34	28		2 años	H	H
09-Dic-09	35	102	8838	5 años	H	H
15-Dic-09	36	954		3 años	H	H
15-Dic-09	37	333		4 años	H	H
15-Dic-09	38	1042		7 meses	H	H

Fecha	Núm. muestra	Núm. arete	Metálico	Edad	Raza	Sexo
17-Dic-09	39	272		2 años	H	H
23-Dic-09	40	339		3 años	H	H
23-Dic-09	41	337	50302	4 años	H	H
23-Dic-09	42	875		3 años	H	H
23-Dic-09	43	172	35115	5 años	H	H
23-Dic-09	44	586	5935	6 años	H	H
23-Dic-09	45	3369	3369	5 años	H	H
21-Ene-10	46	2057		3 años	H	H
22-Ene-10	47	514		3 años	H	H
13-Feb-10	48	67		3 años	H	H
13-Feb-10	49	1116		5 años	H	H
13-Feb-10	50	556		4 años	H	H

**Anexo IV: Mapa del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca Hidalgo  
(CAIT)**



\* Cada numero corresponde a la identificación de un estable  
AGL= Oficinas y laboratorio de la Asociación Ganadera Local de  
Productores de Leche de Tizayuca, Hidalgo.



**Anexo VI: Hojas de clasificación de los granulomas en los tejidos recolectados**

		I (inicial)				II (sólido)		III (necrosis)	IV (necrosis y mineralización)	Clasificación granuloma
		MΦ	Epitelioides	Gigantes	<LΦ y NΦ	Fibroblastos	LΦ y NΦ	Encapsulación fibrosa		
Núm. Animal	Órgano									
1	PULMÓN									
	MES									
2	MED									
3	RT									
	MED									
4	RT									
	MED									
	MES									
	TRA									

Elaborado Lizbeth Ramírez Pérez



Anexo VII Continuación

Núm. Animal	Órgano	I. crónica					MΦ					Epitelioides					Gigantes					LΦ					NΦ					N.caseosa					Fibroblastos					Fibroplasia			Fibrosis			ZN														
		SI	NO	L	M	S	SI	NO	L	M	S	SI	NO	L	M	S	SI	NO	L	M	S	SI	NO	L	M	S	SI	NO	L	M	S	SI	NO	L	M	S	SI	NO	L	M	S	L	M	S	L	M	S															
				1	2	3			1	2	3			1	2	3			1	2	3			1	2	3			1	2	3			1	2	3			1	2	3			1	2	3																
8	RT		*				*					*					*					*					*	*				*					*					*																				
	TRA	*					*		*			*			*		*					*					*	*				*					*					*																				
	MED	*																																																												
	MES		*														*				*					*																																				
	GM		*						*				*				*				*					*		*								*																										
	REM		*						*				*				*				*					*		*								*																										
	PULMÓN	*		*			*					*					*				*		*			*		*				*		*		*																										
9	RT	*			*		*			*		*		*	*		*			*	*					*	*				*	*			*	*				*	*				*	*																
	TRA	*					*		*			*		*	*		*			*	*					*	*		*		*	*		*		*				*	*				*	*																
	MED	*		*			*		*			*		*	*		*			*	*					*	*		*		*	*		*		*				*	*				*	*																
	MES	*		*			*		*			*		*	*		*			*	*					*	*		*		*	*		*		*				*	*				*	*																
	GM		*				*		*			*	*				*		*		*					*	*	*			*	*		*		*				*	*				*	*																
	HEPATICO	*				*	*		*			*		*	*		*		*	*	*					*	*		*		*	*		*		*				*	*				*	*			*			*										
	REM					*	*		*			*		*	*		*		*	*	*					*	*	*			*	*		*		*				*	*				*	*																
PULMÓN																																																														
10	RT	*			*		*		*			*		*	*		*		*	*	*					*	*		*		*	*		*		*				*	*				*	*				*	*											
	TRA																																																													
	MED	*			*		*		*			*		*	*		*		*	*	*					*	*		*		*	*		*		*				*	*				*	*				*	*											
	MES	*				*	*		*			*		*	*		*		*	*	*					*	*		*		*	*		*		*				*	*				*	*				*	*											
	GM		*				*		*			*	*				*		*	*	*					*	*	*			*	*		*		*				*	*				*	*				*	*											
	REM					*	*		*			*	*				*		*	*	*					*	*	*			*	*		*		*				*	*				*	*				*	*											
	PULMÓN	*		*			*		*			*	*				*		*	*	*					*	*	*			*	*		*		*				*	*				*	*				*	*											
11	RT																																																													
	TRA	*		*			*		*			*		*	*		*		*	*	*					*	*	*			*	*		*		*				*	*				*	*				*	*											
	MED	*		*		*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	MES		*	*		*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	GM		*	*		*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	REM		*			*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	PULMÓN	*		*		*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
12	TRA		*			*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	RT	*		*		*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	MES		*			*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	MED		*			*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	GM		*			*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	REM					*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	PULMÓN	*				*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
13	RT	*			*	*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	TRA	*			*	*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	MED	*		*		*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	MES	*			*	*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*				*	*						
	GM		*	*		*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											
	REM		*			*	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*	*	*					*	*	*			*	*	*	*		*				*	*				*	*				*	*											













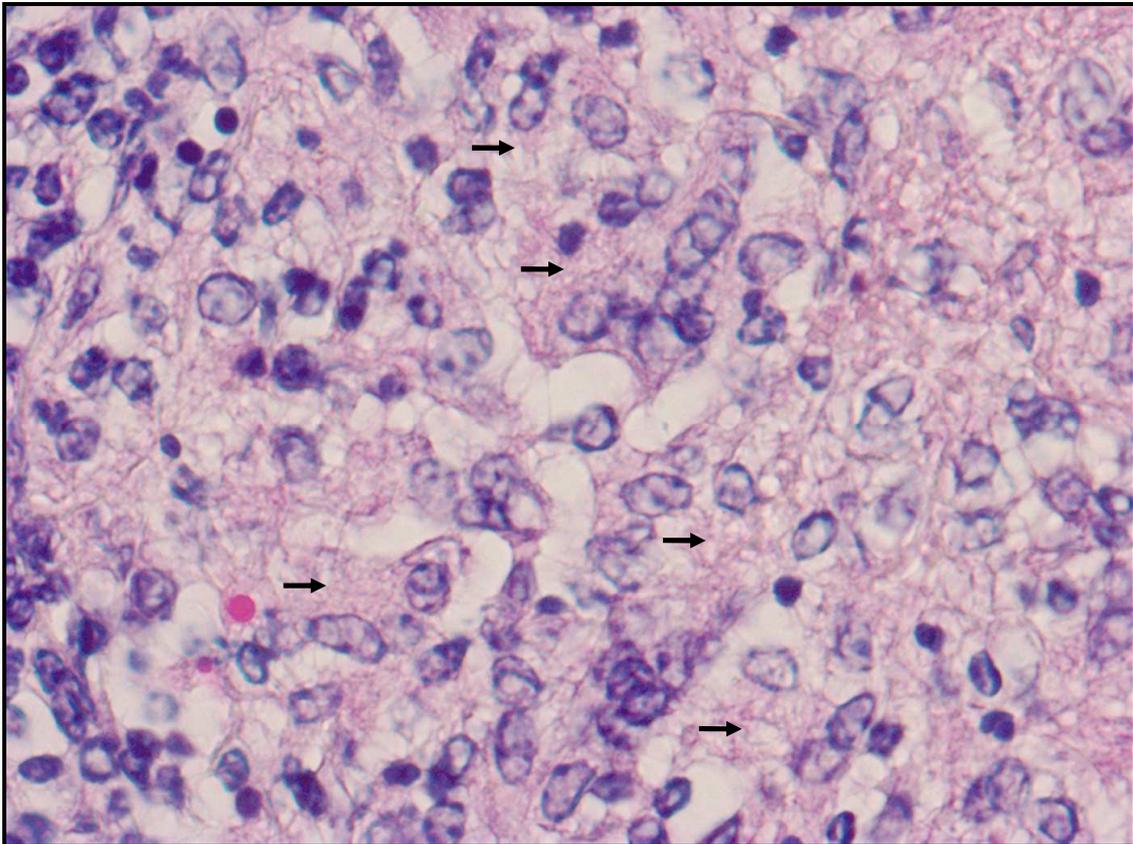




**Anexo VIII Continuación**

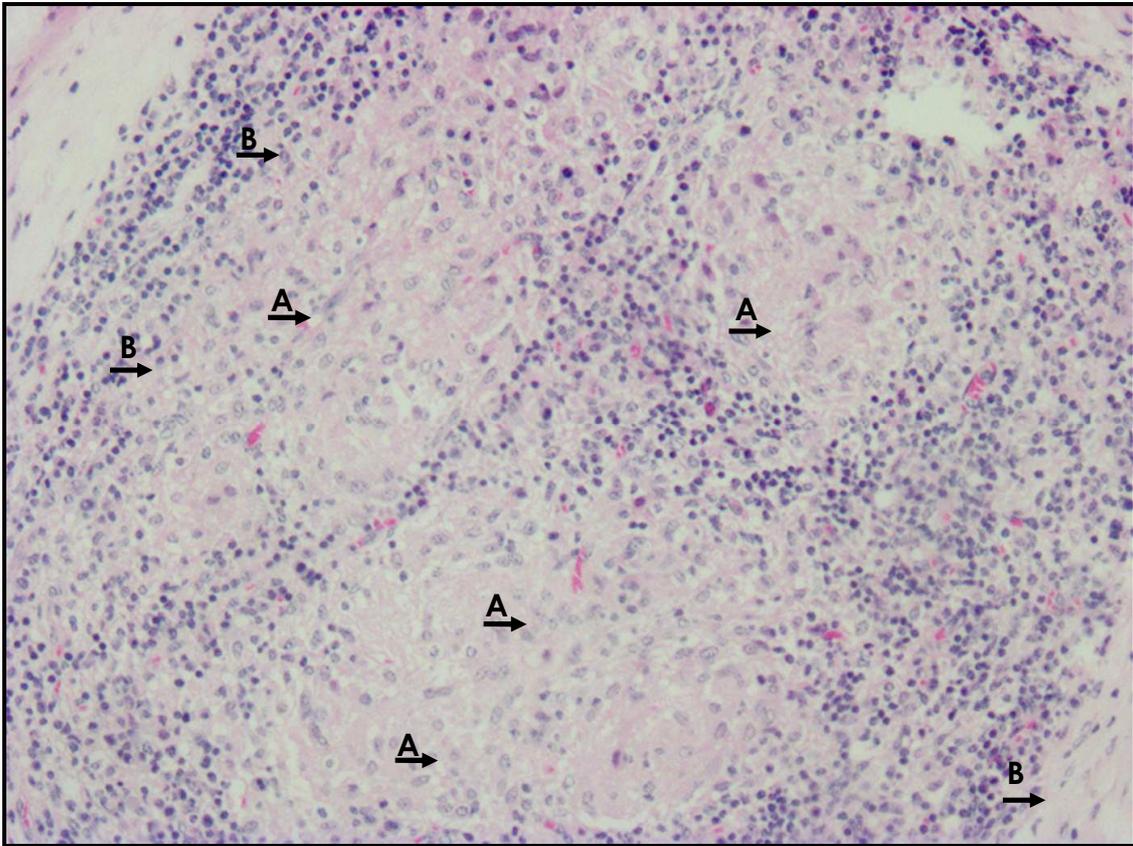
Núm. de muestra	#Animal	Edad (años)	REM							HEP							PULMÓN							GLM						
			M	GRANULOMA				ZN	CUL	M	S	N	GRANULOMA				ZN	CUL	M	S	N	GRANULOMA				ZN	CUL			
				S	N	1	2						3	4	1	2						3	4	1	2			3	4	
26	216	5	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
27	860	3	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
28	57	4	*			*		-	+		*						*					-		*						-
29	118	3	*	*				-		*	*				*	+	+	*	*			-		*	*					-
30	4127	2	*					-			*						*					-		*						-
31	1598	3	*	*				-			*						*	*			*	-		*	*					-
32	781	3	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
33	NO ARETE	2	*					-			*						*					-		*						-
34	28	2	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
35	102	5	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
36	954	3	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
37	333	4	*	*				-			*						*	*		*		+	+	*	*					-
38	1042	7 meses	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
39	272	2	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
40	339	3	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
41	337	4	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
42	875	3	*	*				-			*						*	*		*		-		*	*	*				-
43	172	5	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
44	586	6	*	*		*		+	+		*						*		*		*	+	+	*					-	+
45	3369	5	*	*				-			*						*	*				-		*						-
46	2057	3	*	*				-			*						*	*		*		+	+	*						-
47	514	3	*	*				-			*						*	*				-		*						-
48	67	3	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
49	1116	5	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-
50	556	4	*	*				-			*						*	*				-		*	*					-

**Anexo IX: Granuloma tipo I**



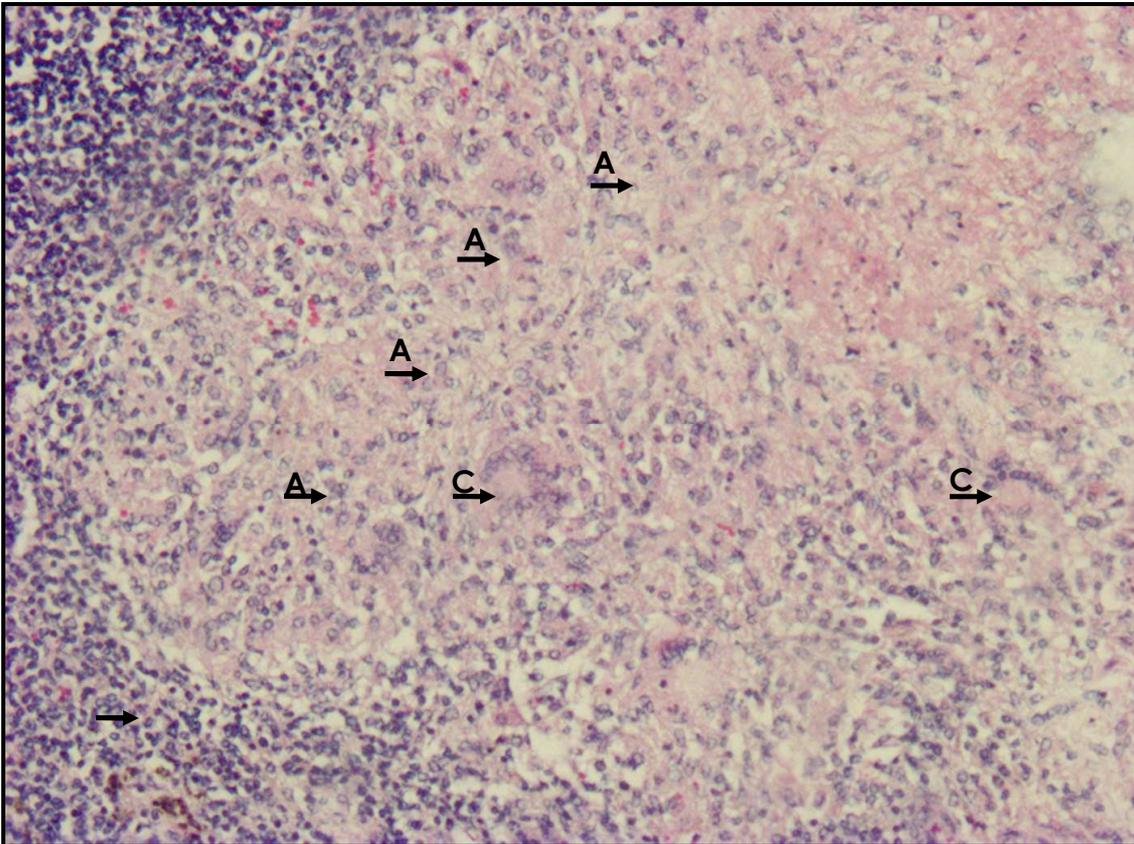
**Fig. 7. Linfonodo Mediastínico. H-E. 400x.** Granuloma grado Tipo I: Se observa una acumulación de células epitelioides (flechas).

**Anexo X: Granuloma tipo II**



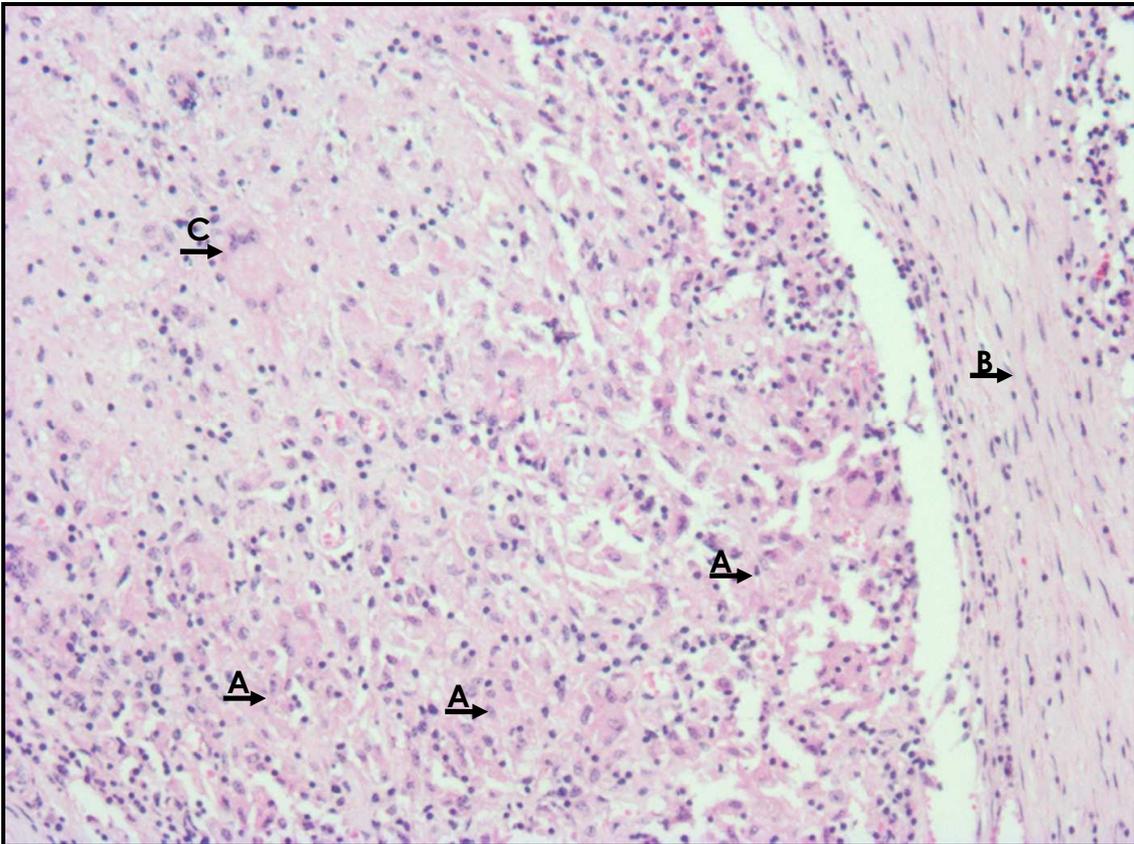
**Fig. 8. Linfonodo Mesentérico. H-E. 100x.** Granuloma grado Tipo II (sólido): Se observan acúmulos de macrófagos con algunas células epitelioides (A) y fibroblastos (B).

**Anexo XI: Granuloma tipo III**



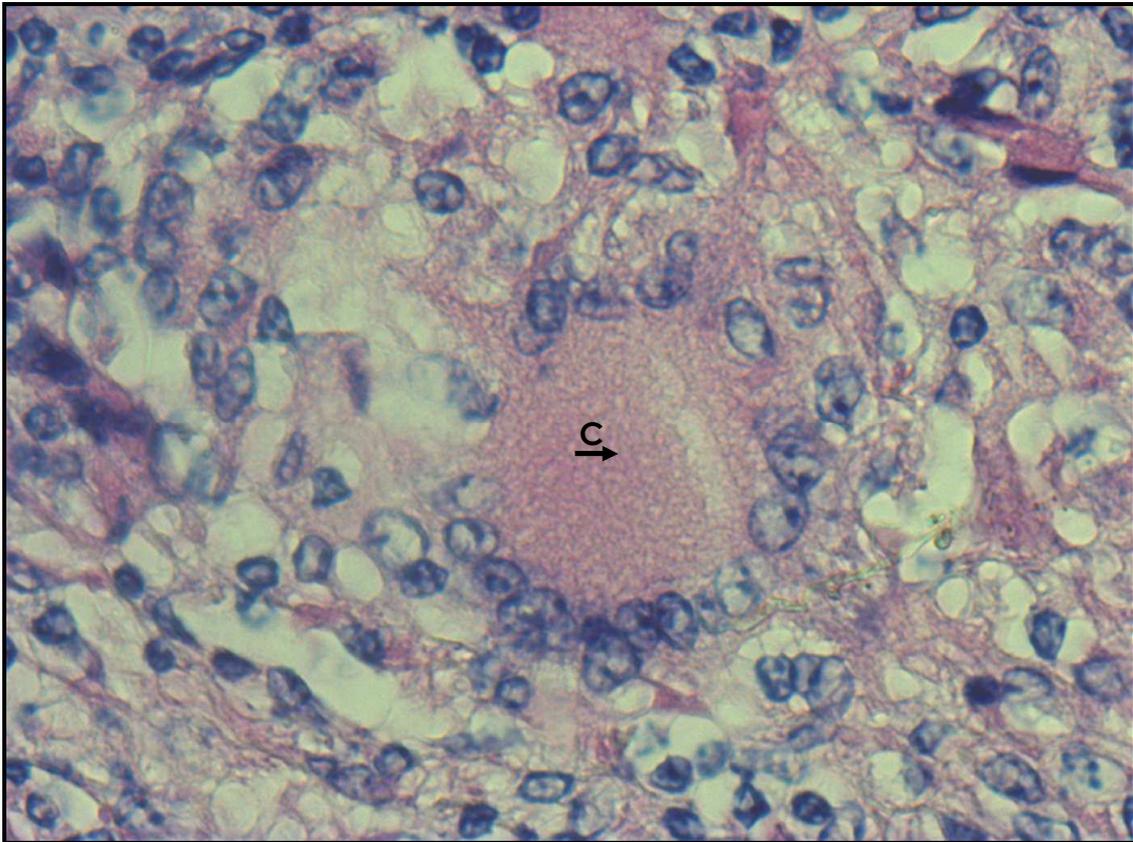
**Fig. 9. Linfonodo Retrofaríngeo. H-E 100x. Granuloma Grado III (necrosis). Se observan células epitelioides (A), células gigantes (C), alrededor tejido linfoide (flecha).**

**Anexo XII: Granuloma tipo III**



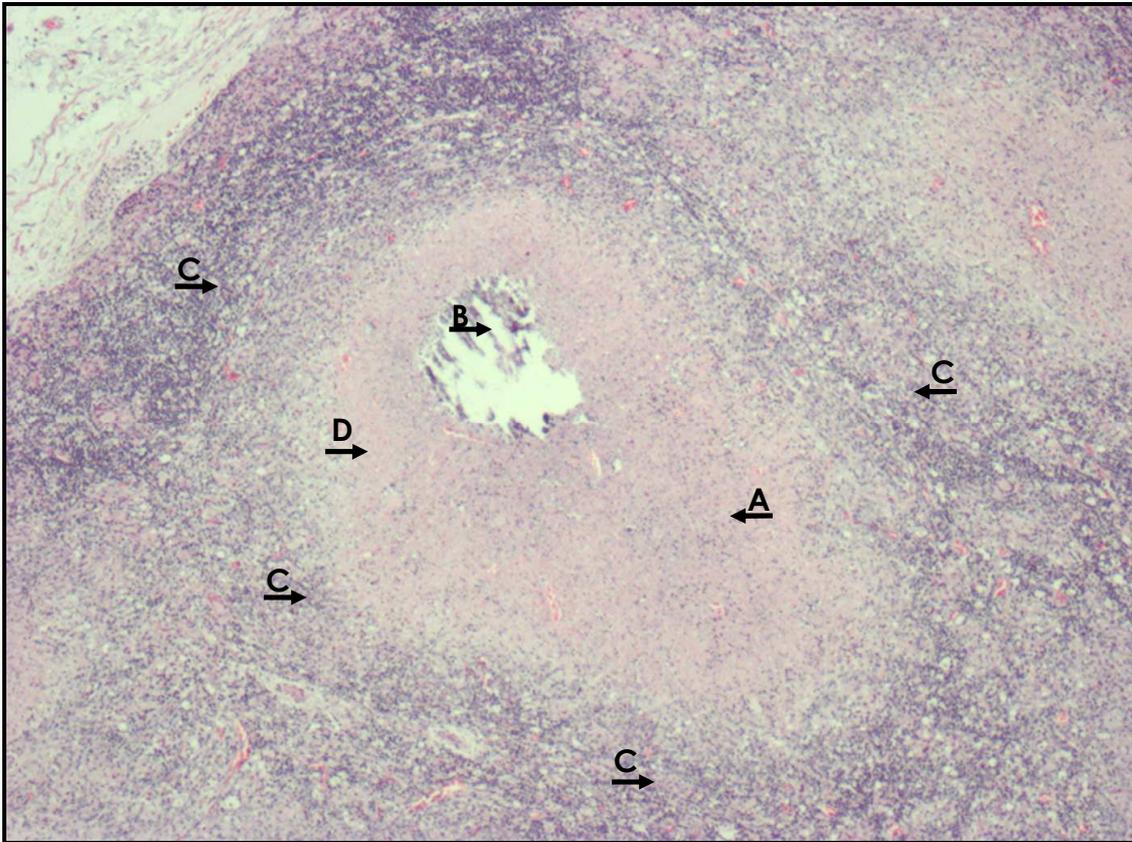
**Fig.10 Linfonodo Mesentérico. H-E 100x.** Granuloma Grado III (necrosis). Se caracteriza por una encapsulación fibrosa completa (B), células epitelioides (A), mezcladas con células gigantes (C).

**Anexo XIII: Célula Gigante**



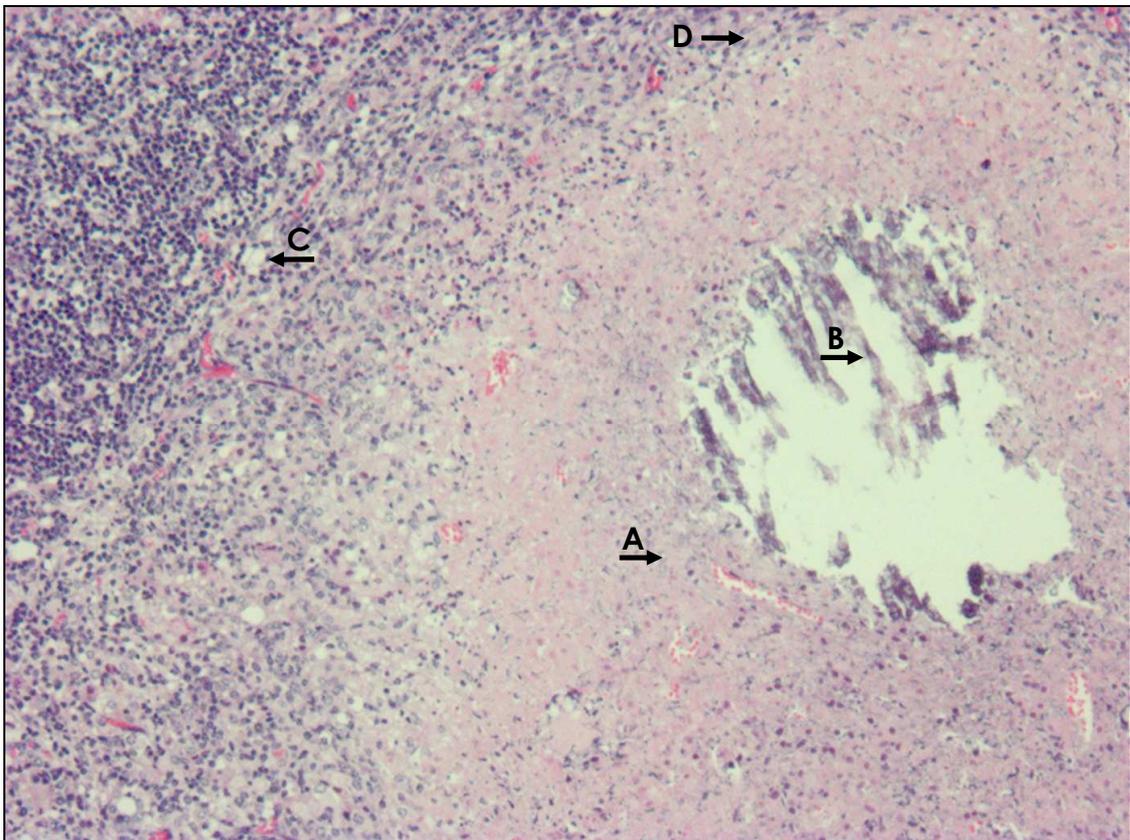
**Fig. 11. Linfonodo Retrofaríngeo. H-E. 400x.** Granuloma grado Tipo III (necrosis): Al centro se observa una célula gigante multinucleada (C) rodeada por células epitelioides principalmente.

**Anexo XIV: Granuloma tipo IV**



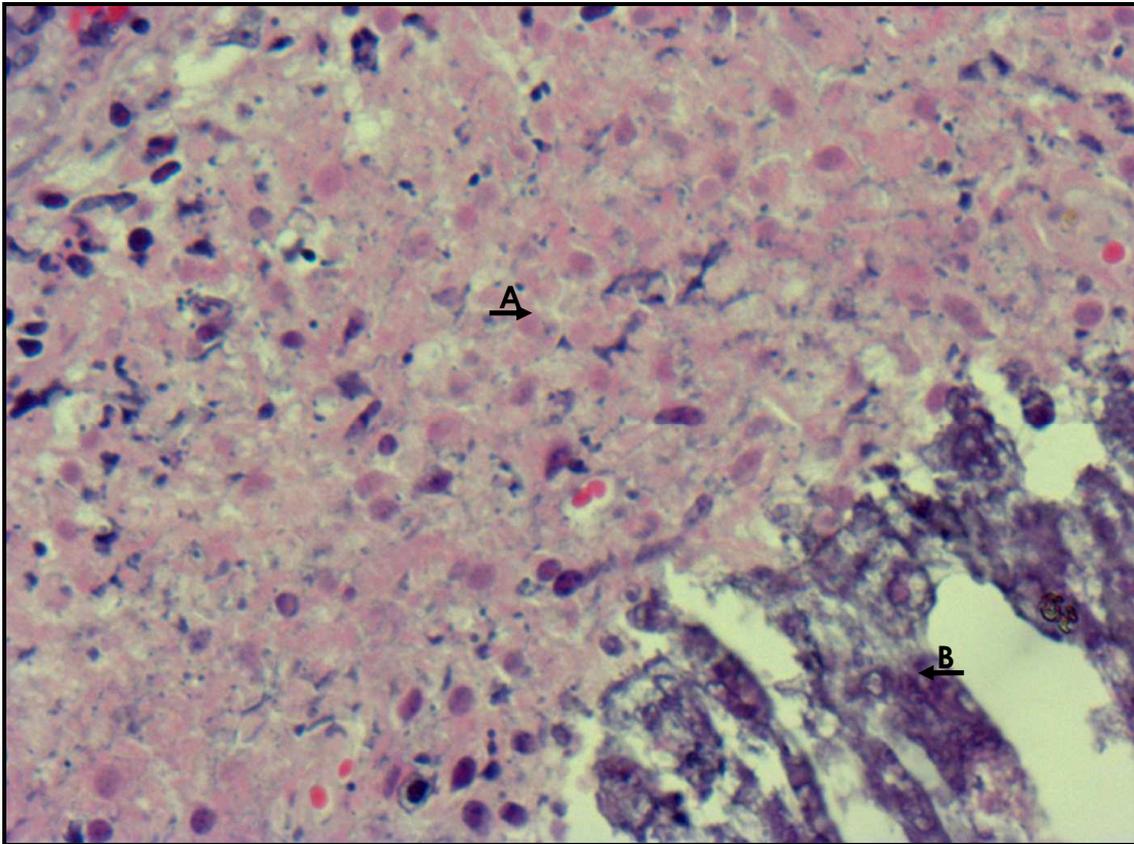
**Fig. 12. Linfonodo Mediastínico. H-E 40x.** Granuloma Grado IV (necrosis y mineralización). Se observa una zona de necrosis caseosa (A) con depósitos basófilos de mineralización (calcificación distrófica) (B). La necrosis está rodeada de un infiltrado de macrófagos, células epitelioides y linfocitos (C). También se aprecia una cápsula delgada de tejido fibroso (D).

**Anexo XV: Granuloma tipo IV**



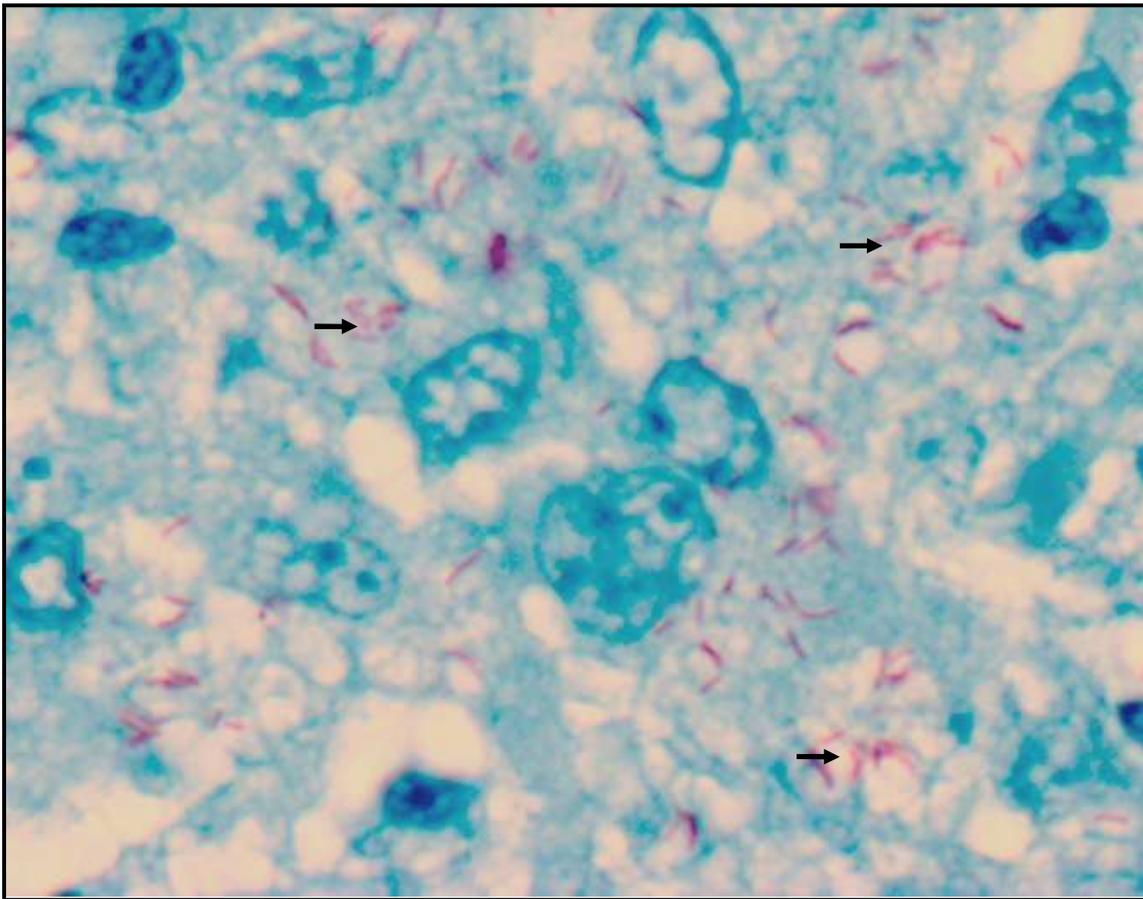
**Fig. 13. Linfonodo Mediastínico. H-E 400 x. Granuloma Grado IV (necrosis y mineralización).** Se observa una zona de necrosis caseosa (A) con depósitos basófilos de mineralización (calcificación distrófica) (B). La necrosis está rodeada de un infiltrado de macrófagos, células epitelioides y linfocitos (C). También se aprecia una cápsula delgada de tejido fibroso (D).

**Anexo XVI: Granuloma tipo IV**



**Fig. 14. Linfonodo Mediastínico. H-E 400 x. Granuloma Grado IV (necrosis y mineralización). Se observa una zona de necrosis caseosa (A) con depósitos basófilos de mineralización (calcificación distrófica) (B).**

**Anexo XVII: Tinción ZN**



**Fig. 15. Linfonodo Mediastínico. ZN 1000x.** Se observan bacilos alcohol ácido resistentes (BAAR), los cuales se observan de un color rojo brillante (flechas).

**Anexo XVIII: Análisis estadístico**

**Cuadro 6. Asociación entre granuloma con la tinción de ZN**

Asociación entre granuloma con la tinción de ZN					
Granuloma	ZN				
	0	1	Total		
0	225	1	226		
1	54	61	115		
<b>Total</b>	279	62	341		
Concordancia	Concordancia esperada	Valor de kappa	Error estándar	Valor Z	Probabilidad (p<0.05) significativa
83.87%	60.36%	0.5931	0.0498	11.91	0.0000

**Cuadro 7. Asociación entre ZN y Cultivo.**

Asociación entre la tinción de ZN y cultivo					
Tinción ZN	ZN				
	0	1	Total		
0	245	34	279		
1	18	44	62		
<b>Total</b>	263	78	341		
Concordancia	Concordancia esperada	Valor de kappa	Error estándar	Valor Z	Probabilidad (p<0.05) significativa
84.75%	67.26%	0.5342	0.0536	9.97	0.0000

**Cuadro 8. Asociación entre granuloma y cultivo**

Asociación entre granuloma y cultivo					
Granuloma	ZN				
	0	1	Total		
0	224	2	226		
1	39	76	115		
<b>Total</b>	263	78	341		
Concordancia	Concordancia esperada	Valor de kappa	Error estándar	Valor Z	Probabilidad (p<0.05) significativa
87.98%	58.83%	0.7080	0.0522	13.55	0.0000