

Veterinaria México

Volumen 35
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2004
July-September

Artículo:

Composición de la dieta de la codorniz moctezuma (*Cyrtonyx montezumae*) en el noroeste del Estado de México, México

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.Medigraphic.com

Composición de la dieta de la codorniz Moctezuma (*Cyrtonyx montezumae*) en el noroeste del Estado de México, México

Diet composition of Montezuma quail (*Cyrtonyx montezumae*) in the northwestern region in the State of Mexico, Mexico

Cecilia Zaragoza Hernández*
Germán David Mendoza Martínez*
Salvador Ibarra Zimbrón*
María Magdalena Crosby Galván*
Fernando Clemente Sánchez**
Beatriz Aguilar Valdez***

Abstract

A study was conducted to analyze winter diet of Mearns quail (*Cyrtonyx montezumae*) in the northwestern region of the State of Mexico. Fourteen quails were collected during 1999-2000 winter season and their crops were analyzed. The volume and dry matter (DM) of each food item was determined by conventional procedures. Bulbs of *Oxalis alpino* were the main feed with 61.43% of dry matter (DM) followed by legume seeds (22.94%), corn grain (10.76%), wheat seed (4.71%), and inorganic matter (0.15%). Since *Oxalis* was also one of the main plant species in the Montezuma quail's habitat, nutrient concentration was analyzed. Bulbs had a mean composition of 93.7% DM, 92.6% organic matter, 6.82% fat, 6.92% crude protein, 49.61% neutral detergent fiber and 41.52% acid detergent fiber. With the exception of arginine, essential amino acid concentration (mg/g protein) was low (serine 20.2; histidine 10.2; glycine 22.3; threonine 18.2; arginine 90.0; methionine 15.5; valine 6.6; phenylalanine 10.5; isoleucine 17.3; leucine 20.4; and lysine 16.9). These results indicate that the *Oxalis* bulb is an important energetic source with low quality protein. During the winter, legumes provided essential amino acids. *Oxalis* biomass varied from 0.75 to 5.00 g/m² in sampled plots. This study confirms the importance of *Oxalis* bulbs in the winter in the State of Mexico as the main feed source for Montezuma quail.

Key words: MEARNS QUAIL, *CYRTONYX MONTEZUMAE*, DIET.

Resumen

Se realizó un estudio para analizar la dieta invernal de la codorniz Moctezuma (*Cyrtonyx montezumae*) en la región noroeste del Estado de México. Se recolectaron 14 buches de codorniz durante el invierno 1999-2000. Se determinó el volumen y la materia seca (MS) de cada alimento por procedimientos convencionales. Los bulbos de *Oxalis alpino* constituyeron el principal alimento (61.43% de la MS), seguido de semillas de leguminosas (22.94%), grano de maíz (10.76%), semillas de trigo (4.71%) y materia inorgánica (0.15%). La concentración de nutrimentos se determinó en el *Oxalis*. Los bulbos tuvieron una composición media de MS, 93.7%; MO, 92.6%; grasa, 6.82%; proteína cruda, 6.92%; FDN, 49.61%; y FDA, 41.52%. Con excepción de arginina, la concentración de aminoácidos esenciales (mg/g proteína) fue baja (serina, 20.2; histidina, 10.2; glicina, 22.3; treonina, 18.2; arginina, 90.0; metionina, 15.5; valina, 6.6; fenilalanina, 10.5; isoleucina, 17.3; leucina, 20.4; y lisina, 16.9). Los resultados indican que el bulbo de *Oxalis* es un ingrediente energético importante con bajo contenido de proteína. Durante el invierno, las leguminosas suministran aminoácidos esenciales. La disponibilidad de *Oxalis* varió de 0.75 a 5.00 g MS/m² de biomasa en las parcelas muestreadas. Este estudio confirma la importancia de los bulbos de *Oxalis* en la dieta invernal de la codorniz Moctezuma en el Estado de México.

Palabras clave: CODORNIZ MOCTEZUMA, *CYRTONYX MONTEZUMAE*, DIETA.

Recibido para su publicación el 22 de enero de 2003 y aceptado el 8 de julio de 2003.

* Programa de Ganadería, Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco, km 36.5, Montecillo, 56230, Estado de México, México, Tel. (01) 595 95 2 02 79, ext. 1716.

** Área de Fauna Silvestre, Campus-San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados, Iturbide 73, Salinas, San Luis Potosí, 78600, México.

***División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

Introduction

The knowledge of wildlife nutrition is an important matter in ecology and management, to understand survival and productivity of wildlife populations,¹ as well as to estimate the nutritional carrying capacity.² Montezuma quail is fed mainly of a type of bulb (*Oxalis*) and tubers. Another food group included in its diet is lupinus and gramineae seeds as the *Paspalum* sp.^{3,4} and depending on the season of the year, its diet may include acorns and insects.⁵

In the State of Mexico, it has been reported a quail populational density of 0.0466 quails/ha in the forest stratum and 0.00089 quails/ha in the rangeland stratum,⁶ which can be considered low. It is important to point out that in Mexico there are not existent reports of the characteristics of the diet. However, it has been reported that *Oxalis* is one of the main components⁷ and it has been the main feed to estimate the nutritional carrying capacity of this specie.⁸ The objective of the present study was to know the diet composition of Moctezuma quail in the northwestern region of the State of Mexico, *Oxalis* bulbs chemical composition and to estimate the dietary nutrient concentration.

Material and methods

Fourteen crop contains of *Cyrtonyx montezumae* were obtained from quails trapped by hunters in the northwestern region of the State of Mexico, in the region II of the cynegetic calendar 1997, previously described,⁶ collected in the 2000 and 2001 hunting seasons in the Municipalities of Aculco, Oztoltepec, San Felipe del Progreso and Polotitlan (Figure 1). The crop contains were placed in polyethylene bags and were stored at -4°C until their analysis. Feeds were identified, separated and dried at a constant weight at 65°C.^{9,10} Diet composition was estimated as percentage of dry matter⁹ and it was also registered the frequency of presentation.¹¹

Because the capacity of the crops is limited, the quantity of sample obtained was not enough to carry out the analysis, reason why bulbs of *Oxalis* were collected in the Municipalities where the quails were found (Figures 1). The sampling sites were established in areas of transition between forest and rangeland where the quail inhabits.^{7,12} To estimate *Oxalis* bulbs availability, in each locality 4 parcels of sampling of 1 m² each were settled down randomly, with a modification of banks seeds collection methodology.¹³ It was dug to an average depth of 5 cm and bulbs were separated from the emergent vegetation.⁸ The bulbs were sampled in the winter of 1999 in geographically referenced areas.¹²

Introducción

El conocimiento de la nutrición de la fauna silvestre constituye un aspecto de importancia en la ecología y el manejo de animales, para entender la supervivencia y la productividad de las poblaciones de la fauna silvestre,¹ así como para estimar la capacidad nutrimental de carga.² La codorniz Moctezuma se alimenta principalmente de un tipo de bulbo (*Oxalis*) y tubérculos; otro tipo de alimento que incluye en su dieta es el lupinus y semillas de gramíneas como el *Paspalum*^{3,4} y, según la época del año, su dieta puede incluir bellotas e insectos.⁵

En el Estado de México, México, se ha registrado una densidad poblacional de 0.0466 codornices/ha en el estrato forestal y 0.00089 codornices/ha en el estrato pastizal,⁶ que pueden considerarse bajas. Es importante señalar que no existen informes de las características de la dieta en México; sin embargo, se ha dicho que el *Oxalis* es uno de los principales componentes⁷ y ha sido el alimento principal para estimar la capacidad nutrimental de carga de esta especie.⁸ El objetivo del presente estudio fue conocer la composición de la dieta de la codorniz Moctezuma en la región noroeste del Estado de México, la composición de los bulbos de *Oxalis* y estimar la concentración de nutrimentos en la dieta.

Material y métodos

Se obtuvieron 14 buchec de *Cyrtonyx montezumae* de codornices atrapadas por cazadores de la región noroeste del Estado de México, en la región cinegética II del calendario cinegético 1997 descrita previamente,⁶ recolectados en las temporadas de cacería 2000 y 2001 en los municipios de Aculco, Oztoltepec, San Felipe del Progreso y Polotitlán (Figura 1). Los buchec se colocaron en bolsas de polietileno y se almacenaron a -4°C hasta su análisis. Los alimentos fueron identificados, separados y secados a peso constante a 65°C.^{9,10} La composición de la dieta se estimó como porcentaje de la materia seca⁹ y también se registró la frecuencia de presentación.¹¹

Debido a que la capacidad de los buchec fue limitada, la cantidad de muestra obtenida no fue suficiente para realizar el análisis, por lo que se recolectaron bulbos de *Oxalis* en los municipios donde se encontraron las codornices (Figura 1). Los sitios de muestreo se establecieron en zonas de transición de bosque y pastizal donde habita la codorniz.^{7,12} Para estimar la disponibilidad de bulbos de *Oxalis* en cada localidad se establecieron al azar cuatro parcelas de muestreo de 1 m² cada una con una modificación a la metodología de colección de bancos de semillas.¹³ Se escarbó a

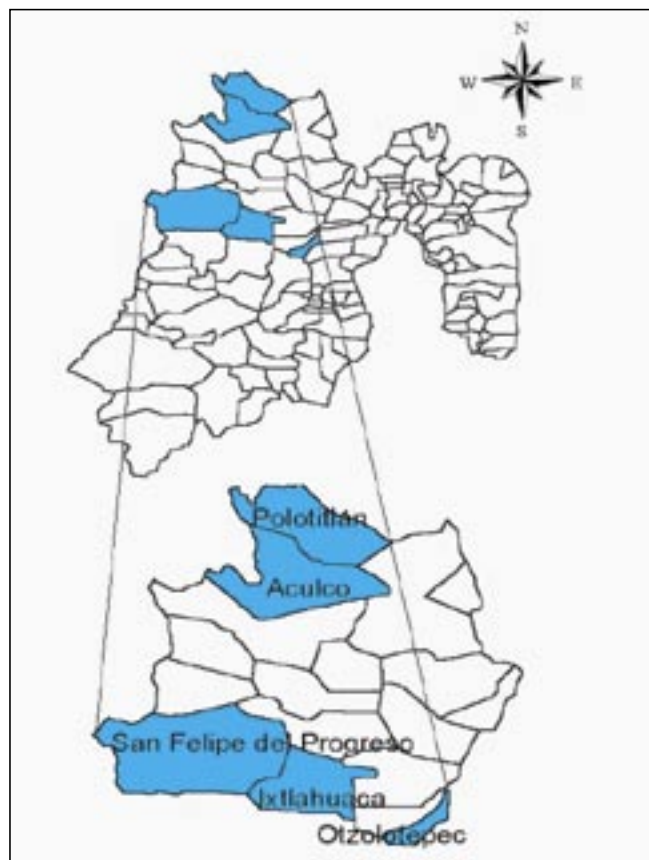


Figura 1. Municipios donde se recolectaron las codornices en el Estado de México, México.
Municipalities where quails were collected in the State of Mexico, Mexico.

Composited samples were prepared by parcel in each locality for their analysis. The determination of dry and organic matter, ashes, crude fat, and crude protein for Kjeldahl, were made according to the techniques recommended by the AOAC,¹⁴ and the cellular wall fractions by the Van Soest *et al.* method.¹⁵ Starch content was determined by enzymatic methods by the glucose concentration released from the sample.¹⁶

The concentration of amino acids was also determined in the *Oxalis* sp. The bulbs were freeze dried (lyophilization -4°C) and later were ground. Amino acids were determined by high precision liquid chromatography (HPLC), using the 2-mercaptoethanol, o-phthalaldehyde method.¹⁷ A Varian chromatograph* was used with fluorescence detector,** with wavelength of excitation and emission wave of 360 and 455 nm. A C-18, 15 cm $\times$ 4.5 mm column was used. The mobile phase was formed by two solvents: A, sodium acetate buffer 0.1 M, pH 6.2 + 10 mL of tetrahydrofuran per liter of buffer solution; and B, methanol HPLC grade. The concentration of the amino acids was determined by area integration in relation to a standard reference. The determined amino acids were: aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, glycine, threonine, arginine, alanine, tyrosine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine and

una profundidad promedio de 5 cm y se separaron los bulbos de la vegetación emergente.⁸ Los bulbos se muestrearon en el invierno de 1999 en lugares georreferenciados.¹²

Para su análisis se prepararon muestras compuestas por parcela en cada localidad. La determinación de materia seca, materia orgánica, cenizas y extracto etéreo, y proteína cruda por Kjeldahl, se realizó de acuerdo con las técnicas recomendadas por el AOAC,¹⁴ y el fraccionamiento de las paredes celulares con el método de Van Soest *et al.*¹⁵ El contenido de almidón se determinó por métodos enzimáticos por la concentración de glucosa liberada en la muestra.¹⁶

También se determinó la concentración de aminoácidos en el *Oxalis* sp. Los bulbos se secaron por liofilización (-4°C) y luego se molieron. Los aminoácidos se determinaron por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC), usando el método de 2-mercaptoethanol, o-phthalaldehyde.¹⁷ Se utilizó un cromatógrafo* con detector de fluorescencia,** con longitud de onda de excitación y emisión de 360 y 455 nm. Se usó una columna C-18, 15 cm $\times$ 4.5 mm. La fase móvil estuvo formada por dos disolventes: A, amortiguador de acetato de sodio 0.1 M, pH 6.2 + 10 mL de tetrahidrofurano por litro de solución amortigua-

*Varian 9010.

**Varian 9070.

each dNTP; 0.4 μ M of each oligonucleotide; 0.5 U. of Taq polymerase,* 1% of triton; 0.15mg/ml of bovine serum albumin and 500 ng of DNA. The programs were carried out in a Gene Amp PCR system 2400* and the PCR products were analyzed in 3% agar gels.

In order to discard the presence of PCR inhibitors and to show the viability of the DNA, a control PCR was performed with specific oligonucleotides for amplification of a 375 base-pair fragment (bp) of the *cyb* gene, which codifies cytochrome b (CYB1 5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' and CYB2 5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA 3'; 24 cycles of 94°C for 30'', 58°C for 30'', and 72°C for 30'') in the bovine mitochondrial DNA. (Figure 1).¹⁷ Once the DNA samples were optimized for PCR amplification, the simple PCR was executed for diagnosis of TB, by amplifying a 372 bp segment of the MPB70 gene of the *M. tuberculosis* bacteria complex¹⁸⁻²⁰ according to what was reported (TB1F 5' GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA 3' and TB1R 5' TAC ATG ATT GAC AGC GTG CT 3'; 24 cycles of 94°C for 45'', 60°C for 30'', and 72°C for 1').^{8,9} After that, a tenth of the product obtained from the previous reaction was used to amplify a 208 bp fragment, within the 372 bp region, of the MPB70 gene by means of a nested PCR with the oligonucleotides designed for this work (M22/3 5' GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC 3' and M22/4 5' CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3'; 35 cycles of 94°C for 30'' and 1' at 72°C), using the same associative and extensive temperatures.

Statistics

The Cohen's Kappa ($k =$) coefficients were estimated to determine the concordance between the implemented tests. The values $k < 0.04$, 0.40 to 0.75, and > 0.75 , indicate insufficient, good and excellent concordance respectively.²¹ The real prevalence was estimated with the total of true positives (TP) + false negatives (FN) $\div$ true positives (TP) + false negatives (FN) + total true negatives (TN) + false positive (FP). The sensitivity was estimated with $TP \div TP + FN$ and the specificity with $TN \div TN + FP$. The positive predictive value (PPV) was estimated as the result of $TP \div TP + FP$ and the negative predictive value (NPV) as the result of $TN \div TN + FN$.²²

Results

Visible lesions were found during PI in 19 cases of the first group of 21 animals that came from a high TB prevalence zone, in the other two, lesions were only detected by histopathology (Table 1). The lesions were found in tracheal-bronchial and mediastinal lymph

varon en un transiluminador* y se fotografiaron con una cámara instantánea.**

Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 20 μ l. La mezcla de PCR contenía una concentración final 10 mM de tris-HCl (pH 8.3); 50 mM de KCl; 250 μ M final de cada dNTP; 0.4 μ M de cada oligonucleótido; 0.5 U. de Taq polimerasa,* 1% de triton; 0.15mg/ml de albúmina sérica bovina y 500 ng de ADN. Los programas se llevaron a cabo en el Gene Amp PCR system 2400* y los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 3%.

Para descartar la presencia de inhibidores de la PCR y demostrar la viabilidad del ADN se realizó una PCR control con oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 375 pares de bases (pb) del gen *cyb*, que codifica el citocromo b (CYB1 5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' y CYB2 5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA 3' 24 ciclos de 30'' a 94°C, 30'' a 58°C, 30'' 72°C) en el ADN mitocondrial del bovino (Figura 1).¹⁷ Una vez optimizadas las muestras de ADN para la amplificación por PCR se realizó la PCR simple para el diagnóstico de TB, mediante la amplificación de un segmento de 372 pb del gen MPB70 de las bacterias del complejo *M. tuberculosis*,¹⁸⁻²⁰ conforme a lo reportado (TB1F 5' GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA 3' y TB1R 5' TAC ATG ATT GAC AGC GTG CT 3' 24 ciclos de 45'' a 94°C, 30'' a 60°C, 1' a 72°C).^{8,9} Posteriormente, utilizando una décima parte del producto obtenido en la reacción anterior se procedió a la amplificación de un fragmento de 208 pb del gen MPB70, dentro de la región de 372 pb, mediante una PCR anidada con los oligonucleótidos diseñados para este trabajo (M22/3 5' GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC 3' y M22/4 5' CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3' 35 ciclos de 30'' a 94°C y 1' a 72°C),[†] utilizando una misma temperatura de re-asociación y extensión.

Estadística

Se calcularon los coeficientes de Cohen's Kappa ($k =$) para determinar la concordancia entre las pruebas implementadas. Los valores de $k < 0.04$, de 0.40 a 0.75 y > 0.75 , indican insuficiente, buena y excelente concordancia, respectivamente.²¹ La prevalencia real se calculó con el total de positivos verdaderos (PV) + falsos negativos (FN) $\div$ positivos verdaderos (PV) + falsos negativos (FN) + total de negativos verdaderos (NV) + falsos positivos (FP). La sensibilidad se calculó con $PV \div PV + FN$ y la especificidad con $NV \div$

* Stratagene.

** Polaroid.

*** Perkin Elmer.

† GENBANK Acceso: M37840

Cuadro 1

BREVE DESCRIPCIÓN DE LESIONES ENCONTRADAS Y RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS, EN BOVINES REACTORS A LA TUBERCULINA SIMPLE CAUDAL

BRIEF DESCRIPTION OF FOUND LESIONS AND RESULTS OF THE TUBERCULOSIS DIAGNOSTIC TESTS, IN CATTLE REACTORS TO THE SIMPLE CAUDAL TUBERCULIN TEST.

Animal Num	LN: Lesion Degree	MGL	IP	HE	HISTOLOGY		PCR	
					ZN	Cultivo	Simple	Nested
1	SLM	I	-	+	-	+	-	+
2	Tr:2,M:2	I, II	+	+	-	-	+	+
3	Tr:3,M:3	I, II	+	+	-	-	-	+
4	Tr:3,M:3	III	+	+	-	-	+	+
5	Tr:3,M:3	III	+	+	-	+	+	+
6	Tr:3,M:3	III	+	+	-	+	-	+
7	SLM	I, II, III	-	+	+	-	-	+
8	R:2	I, III	+	+	+	-	-	+
9	Tr:2,M:2	I, II	+	+	+	+	-	+
10	Tr:3,M:3	I, II	+	+	+	-	-	+
11	Tr:3,M:3	I, II	+	+	+	+	+	+
12	Tr:1,M:3	I, III	+	+	+	+	+	+
13	Tr:2,M:3	I, III	+	+	+	+	+	+
14	Tr:2,M:2	I, III	+	+	+	-	+	+
15	Tr:2,M:1	I, III	+	+	+	-	+	+
16	Tr:2,M:2	III	+	+	+	-	+	+
17	Tr:1,M:1	III	+	+	+	+	-	+
18	Tr:1,M:1	III	+	+	+	-	+	+
19	Tr:2,M:1	III	+	+	+	+	-	+
20	Tr:1,M:2, :3	I, II, III	+	+	+	+	+	+
21	Tr:2,M:1,r:3	III	+	+	+	+	-	+
T -			2	0	6	10	10	0
%			10	0	29	48	48	0
T +			19	21	15	11	11	21
%			90	100	71	52	52	100

LN: Lymph node; Tr Tracheal-bronchial; M: Mediastinal; R: Retropharyngeal

WML: Without macroscopic lesions

1, 1 or 2 lesions $\leq$ 5mm in diameter

2, Up to 5 lesions between 6 and 10 mm in diameter

3, more than 5 lesions $>$ 1 cm in diameter

MGL Multifocal granulomatous lymphadenitis

I. Without fibrosis or necrosis; II. Moderate; III, Extensive

PI Postmortem inspection

HE Hematoxylin-Eosin

ZN Ziehl Neelsen

T+ Total positive animals

T- Total negative animals

nodes in 18 cases (85.7%); two of them also presented lesions in the retropharyngeal nodes. In total, 71.4% of the animals had lesions compatible with TB, ZN positives (15/21) and in 52.4% (11/21) *M. bovis* was isolated. In all the lesions by histopathology (HE) multifocal granulomatous lymphadenitis was observed. For the purpose of this work, the ones that were circumscribed by a thick fibrous capsule with extensive central necrosis and mineralization were considered as type III granuloma; type II were the ones where fibrosis, necrosis and moderate mineralization were

NV + FP. El valor predictivo positivo (VPP) se calculó con el total de PV $\div$ PV + FP y el valor predictivo negativo (VPN) con el total de NV $\div$ NV + FN.²²

Resultados

En el primer grupo de 21 animales provenientes de una zona de alta prevalencia de TB, se identificaron lesiones tuberculosas visibles a la IP en 19 casos y en los dos restantes únicamente, detectados por histopatología (Cuadro 1). Las lesiones se encontraron en

found, and as type I those which did not have evident capsule, necrosis or fibrosis. The predominant cells were macrophages, epithelioid cells, giant cells, lymphocytes, some plasmatic cells and degraded neutrophils. In the PI of LN a yellow-white, dry and grainy caseous exudate was found in 18 cases corresponding to type III granuloma (Table 1). The second group of animals, considered as the negative control group, did not have lesions observed during slaughter and resulted negative to the confirmatory tests.

By simple PCR a 372 bp band of the MPB70 gene was amplified in 11 animals (Table 1) of the first group, all of them had tuberculous lesions, eight had compatible lesions (ZN) and five had *M. bovis* cultured. Using nested PCR the 208 bp fragment of the MPB70 gene was amplified in the 21 animals of the first group. With the samples of the animals of

NL traqueobronquiales y mediastínicos en 18 casos (85.7%) dos de ellos además presentaron lesiones en NL retrofaríngeos. El 71.4% de los animales tenían lesiones compatibles con TB, ZN positivas (15/21) y en el 52.4% se aisló *M. bovis* (11/21). En todas las lesiones a la histopatología (HE) se observó linfadenitis granulomatosa multifocal y para este trabajo se consideraron como granulomas tipo III aquellas circunscritas por una cápsula fibrosa gruesa, con necrosis central extensa y mineralización, tipo II en las que se encontró fibrosis, necrosis y mineralización moderada y como tipo I aquellas sin cápsula, necrosis o fibrosis evidentes. Las células predominantes eran macrófagos, células epitelioides, células gigantes, linfocitos, algunas células plasmáticas y neutrófilos degradados. A la IP de NL se encontró exudado caseoso de color blanco-amarillento, seco y arenoso en 18 casos

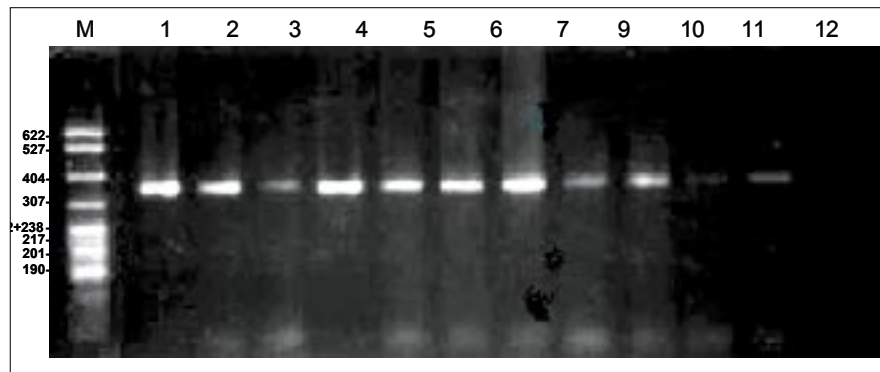


Figura 1. PCR testigo en muestras de tejido. Líneas 1-11. Productos de la amplificación con los oligonucleótidos (cyb1 y2) utilizando ADN extraído de muestras de tejido macerado de nódulos linfáticos de bovinos. Línea 12. Testigo negativo de la reacción donde se omitió el ADN. Se observa una banda de 375 pb correspondiente al gen cyb de la mitocondria del bovino. M. Marcador de peso molecular expresado en pares de bases.

PCR control in tissue samples. Lines 1-11. Products of amplification with the oligonucleotides (cyb1 and 2) using DNA extracted from macerated tissue samples of bovine lymph nodes. Line 12. Negative control of the reaction where DNA was omitted. A 375 pb band is observed, corresponding to the cyb gene of the bovine mitochondria. M. Molecular weight marker expressed in base pairs.

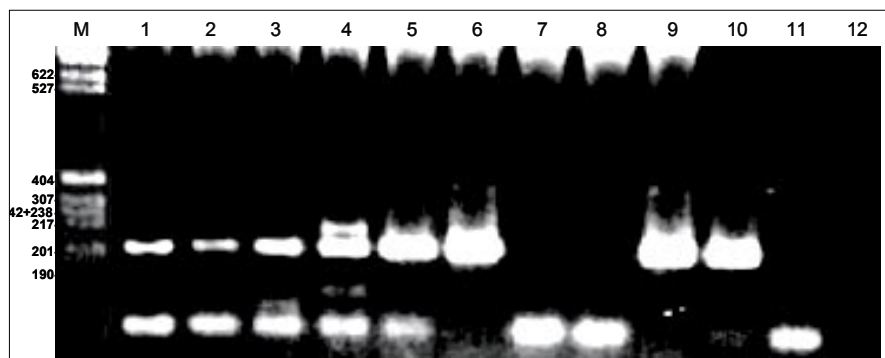


Figura 2. Resultados de la PCR anidada en muestras de tejido para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Líneas 1-6 Bovinos reactivos a la tuberculina, 7-8 bovinos sanos, libres de TB. Productos de la amplificación con los oligonucleótidos M22/3 y M22/4 (208 pb) utilizando ADN extraído de muestras de tejido macerado; línea 9, ADN de *M. tuberculosis* cepa H37Rv; línea 10, ADN de *M. bovis* cepa AN5; línea 11, ADN de *M. avium* cepa D4. Línea 12. Testigo negativo de la reacción donde se omitió el ADN. M. Marcador de peso molecular.

Results of the nested PCR in tissue samples for the diagnosis of bovine tuberculosis. Lines 1-6 Tuberculin reactor bovines, 7-8 TB free, healthy bovines. Products of the amplification with oligonucleotides M22/3 and M22/4 (208 pb) using DNA extracted from macerated tissue samples; line 9, DNA of *M. tuberculosis* strain H37Rv; line 10, DNA of *M. bovis* strain AN5; line 11, DNA of *M. avium* strain D4. Line 12. Negative reaction control where DNA was omitted. M. Molecular weight marker.

the second group there was no amplification in any of the PCR's. In both PCR procedures, amplification was observed in the positive controls used: genomic DNA of the strains AN5 of *M. bovis* (Figure 2, line 10) and H37Rv of *M. tuberculosis* (line 11) cultured *in vitro*. In the same manner, amplification was not observed with DNA of *M. avium* strain D4 (line 12) or when the DNA was omitted (line 13), corroborating the specificity of the test. Whenever *M. bovis* AN5 DNA was used, a 12.5 fg sensitivity was shown with the simple PCR, and of 2.5 fg with nested PCR (Figure 3). Approximately 10% of the DNA samples had PCR inhibitors, in light of the fact that there was no amplification of the 375 bp product of the *cyb* gene (Figure 1) on the first try. These samples were optimized by making a 1:10 dilution with water and then the diagnostic PCR was performed.

Cohen's Kappa values for concordance between simple PCR with the culture of *M. bovis*, and the presence of compatible lesions (ZN) by histopathology were $k = 0.26$ and $k = 0.44$, respectively. While for the nested PCR these same values were $k = 0.52$ and $k = 0.71$. The concordance between the culture and histopathology of suggestive lesions (HE) was $k = 0.52$, and of compatible lesions (ZN) was $k = 0.44$. Taking into account these results, the identification of compatible lesions (ZN) was considered to be confirmative diagnosis to estimate sensitivity and specificity of the PCR tests. Simple PCR showed a sensitivity of 53% and a specificity of 58%, while for the nested PCR these values were 100% and 77%, respectively. Also, with the purpose of analysis the 41 animals were considered as a simulated population with a real estimated prevalence of 37%. The predictive negative (PNV) and positive (PPV) values for culture and the simple PCR were 77% and 73%, respectively. Nested PCR showed a PNV of 100% and a PPV of 71%.

correspondientes a granulomas tipo III (Cuadro 1). El segundo grupo de animales considerados como testigos negativos no tenían lesiones al sacrificio y resultaron negativos a las pruebas confirmatorias.

Mediante PCR simple se amplificó la banda de 372 pb del gen MPB70 en 11 animales (Cuadro 1) del primer grupo, todos ellos con lesiones tuberculosas, ocho con lesiones compatibles (ZN) y cinco con cultivo de *M. bovis*. Utilizando la PCR anidada se amplificó el fragmento de 208 pb del gen MPB70 en los 21 animales del primer grupo. Con las muestras de los animales del segundo grupo no hubo amplificación en ninguna de las PCR. En ambos procedimientos de PCR se observó amplificación de los testigos positivos utilizados: ADN genómico de las cepas AN5 de *M. bovis* (Figura 2, línea 10) y H37Rv de *M. tuberculosis* (línea 11) cultivados *in vitro*. Asimismo, no se observó la amplificación con ADN de *M. avium* cepa D4 (línea 12) o cuando se omitió el ADN (línea 13), corroborando la especificidad de la prueba. Utilizando ADN de *M. bovis* AN5 se demostró una sensibilidad de 12.5 fg con la PCR simple, y de 2.5 fg con la PCR anidada (Figura 3). Aproximadamente, 10% de las muestras de ADN tenían inhibidores de la PCR, en vista de que no se amplificó de primera instancia el producto de 375 pb del gen *cyb* (Figura 1). Estas muestras se optimizaron mediante una dilución 1:10 con agua y se procedió con la PCR de diagnóstico.

Los valores de Cohen's Kappa para la concordancia entre la PCR simple con el cultivo de *M. bovis*, y la presencia de lesiones compatibles (ZN) a la histopatología, fueron $k = 0.26$ y $k = 0.44$, respectivamente. Mientras que para la PCR anidada estos mismos valores fueron de $k = 0.52$ y $k = 0.71$. La concordancia entre el cultivo y la histopatolo-

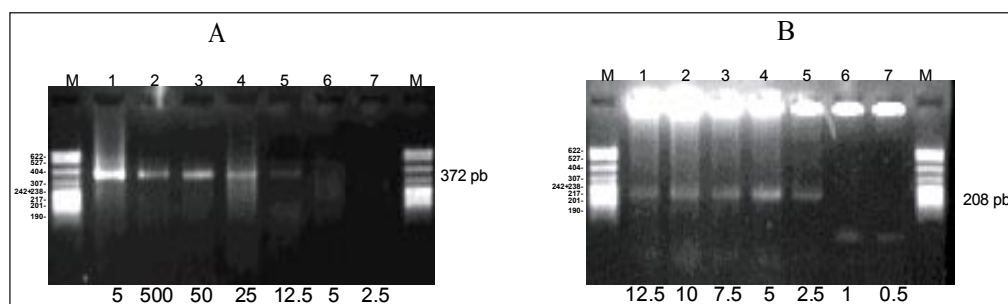


Figura 3. Sensibilidad de la PCR simple y anidada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Estimación de la sensibilidad para la PCR utilizando ADN genómico de la biomasa del cultivo de *M. bovis* cepa AN5, a distintas concentraciones. Panel A. Para la PCR simple se amplificó un segmento de 372 pb del gen MPB70 del complejo *M. tuberculosis*, empleando los oligonucleótidos TB F y TB R. Panel B. Para la PCR anidada se reamplificó a partir de una décima parte del producto de la PCR simple, un segmento de 208 pb con los oligonucleótidos M22/3 y M22/4. M. Marcador de peso molecular. Sensitivity of simple and nested PCR for the diagnosis of bovine tuberculosis. Estimate of the sensitivity for PCR using genomic DNA from the culture biomass of *M. bovis* strain AN5, at different concentrations. Panel A. For the simple PCR a segment of 372 pb of the gene MPB70 of the *M. Tuberculosis* complex was amplified using the oligonucleotides TB F and TB R. Panel B. For nested PCR a segment of 208 pb with the oligonucleotides M22/3 and M22/4 was amplified from a tenth of the product of the simple PCR. M. Molecular weight marker.

Discussion

This study was performed with 21 dairy cattle from a herd with a high TB prevalence and it included 20 TB-free animals as healthy controls. All the animals included were slaughtered due to reasons detached from the project and were subjected to the PI with the purpose of comparing the efficiency of the diagnostic tests that were performed. The 21 animals of the infected herd had TB suggestive lesions (HE), 71.4% compatibles (ZN), but only 52.4% were confirmed by isolation of *M. bovis*. The culture of *M. bovis* is the optimal procedure for the definitive diagnosis of TB; nevertheless, it requires a lot of time, equipment and qualified personnel and there is a possibility of obtaining false positive results.^{22,23} The low sensitivity of culture, as observed in this work and other previous ones,²⁴ is due, amongst other causes, to the scarcity of viable or culturable microorganisms in chronic lesions.²⁵ The extensive fibrosis, necrosis and mineralization observed in the vast majority of the cases indicate to a great extent the measure of how chronic were the found lesions. Two animals without visible lesions showed lesions only by histopathology, and this underlines the importance of considering this technique to detect and characterize lesions,^{22,24,26} as well as to differentiate other etiologies that produce granulomatous lesions, such as actinobacillosis and actinomycosis, amongst others.²⁷ Because of the above cited, once the isolation of *M. bovis* is confirmed in a herd, IP and histopathology have been suggested instead as routine procedures, to confirm the diagnosis in reactor cattle.⁵⁻⁷ The concordance obtained between histopathology and culture in this work suggests that it is useful for a definitive diagnosis in herds where there is high prevalence, as well as for the evaluation of other diagnostic tests.²⁸

At the present time the diagnostic tests have been enriched with the development of the PCR technique. Specifically, it is possible to identify *M. bovis* without requiring a previous culture. For the instrumentation of this test, it is possible to begin with any biological sample, achieving important sensitivity and specificity in the diagnosis of tuberculosis, as has been shown in humans and bovines.^{8,9,11} The use of molecular tests permits the identification of specific sequences of the *M. tuberculosis* complex, including *M. bovis*. One of them corresponds to the gene that codifies the secretion MPB70 protein, the most abundant antigen found in culture supernatants of vaccine and virulent strains of *M. bovis*.^{18,19,29,30} MPB70 stimulates the immune cell (Th1 type) and humoral response during the infection in bovines and humans.³¹⁻³³ By virtue of the specificity of the MPB70 antigen and the previous description of the oligonucleotides (TB1

gía de lesiones sugestivas (HE) fue de $k = 0.52$, y de lesiones compatibles (ZN) de $k = 0.44$. Teniendo en cuenta estos resultados, se consideró la identificación de lesiones compatibles (ZN) como el diagnóstico confirmativo para calcular la sensibilidad y especificidad de las pruebas de PCR. La PCR simple mostró una sensibilidad del 53% y una especificidad de 58%, mientras que para la PCR anidada estos valores fueron del 100% y 77%, respectivamente. Asimismo, con fines analíticos se consideró a los 41 animales de estudio como una población simulada, con prevalencia real calculada de 37%. Los valores predictivos negativo (VPN) y positivos (VPP) para el cultivo y la PCR simple fueron del 77% y 73%, respectivamente. La PCR anidada mostró un VPN del 100% y un VPP del 71%.

Discusión

El presente estudio se realizó con 21 bovinos lecheros de un hato con alta prevalencia de TB y se incluyeron 20 testigos sanos, libres de TB. Todos los animales incluidos se sacrificaron por razones ajenas al proyecto y se sometieron a una IP con el propósito de comparar la eficiencia de las pruebas de diagnóstico realizadas. Los 21 animales del hato infectado tenían lesiones sugestivas de TB (HE), 71.4% compatibles (ZN), pero únicamente 52.4% confirmadas por aislamiento de *M. bovis*. El cultivo de *M. bovis* es el procedimiento óptimo para el diagnóstico definitivo de TB. Sin embargo, requiere de mucho tiempo, equipo y personal calificado y se pueden obtener resultados falsos positivos.^{22,23} La poca sensibilidad del cultivo observada en este trabajo y en otros previos,²⁴ se debe entre otras causas a la escasez de microorganismos viables o cultivables en las lesiones crónicas.²⁵ La extensa fibrosis, necrosis y mineralización observadas en la gran mayoría de los casos indica en buena medida esta cronicidad en las lesiones encontradas. Dos animales sin lesiones visibles presentaron lesiones únicamente a la histopatología, lo cual señala la importancia de considerar esta técnica para detectar y caracterizar lesiones,^{22,24,26} así como para diferenciar otras etiologías que producen lesiones granulomatosas, como son actinobacilosis y actinomycosis, entre otras.²⁷ Por lo anterior, una vez confirmado el aislamiento de *M. bovis* en un hato, en su lugar se ha sugerido como procedimientos de rutina la IP e histopatología, para confirmar el diagnóstico en bovinos reactores.⁵⁻⁷ La concordancia obtenida entre la histopatología y el cultivo en este trabajo sugiere su utilidad para el diagnóstico definitivo en hatos de alta prevalencia, así como para evaluar otras pruebas de diagnóstico.²⁸

Actualmente las pruebas de diagnóstico se han

and TB2) to amplify the gene segment,^{8,9} this method was considered to confirm the TB diagnosis in tissue samples. The instrumented simple PCR showed a low sensitivity (53%), even in almost all of the detected animals more than one tissue sample was used for the execution of the technique (LN: tracheal-bronchial, mediastinal or retropharyngeal). Nevertheless, the specificity was 88%, since eight identified animals had compatible lesions (ZN). Similar results have been obtained in previous works.^{9,28} In this study, specific oligonucleotides were designed to amplify a central region (208 bp) contained in the sequence amplified by simple PCR (nested PCR). The technique that was developed allowed to increase the sensitivity of the diagnosis, achieving an amplification of a specific sequence of MPB70 beginning with, approximately half genome of *M. bovis* (2.5 fg). These results agree with other studies in which with the use of nested PCR, the amplification of even less than one genome of the mycobacteria is achieved.¹¹

As it is commonly observed with other diagnostic tests, the specificity (77%) diminished inversely to the increase of sensitivity, since of the 21 animals that were positive to nested PCR only 15 had compatible lesions (ZN).^{34,35} Notwithstanding this, this technique allowed to identify 100% of the TB suggestive granulomatous lesions (HE), under maximum stringency conditions (association and extension at 72°C). In view of the fact that 21 animals were reactive to tuberculin, the epidemiological condition of the zone and the confirmation of TB in the herd of origin, it is possible to suggest that the presence of acid fast bacilli is unobserved by the ZN stain (false negatives), due amongst other causes, to the low amount of mycobacteria present in tuberculous lesions.^{22, 25,36}

The good concordance of nested PCR with the culture of *M. bovis*, as well as with the identification of tuberculosis compatible and suggestive lesions (ZN) allows to suggest its use to confirm the diagnosis of TB. The use of PCR tests for the confirmatory diagnosis of TB allows to increase the sensitivity, which is extremely important for the control of the disease. The execution of the nested PCR towards a single copy of the gene that codifies for the MPB70 antigen, under maximum stringency conditions, permits to the reach high specificity in the diagnosis of TB. As part of the diagnostic PCR and avoid false negatives, the amplification of the mitochondrial *cyb* gene may be instrumented in the processed samples.

The sensitivity and specificity of the nested PCR developed in this work would allow to confirm the TB diagnosis in 24 hours. The instrumentation of alternative tests should be established according to the diagnostic needs in the different epidemiological situations.

enriquecido con el desarrollo de la técnica de PCR. En particular, es posible la identificación de *M. bovis* sin requerir del cultivo previo. Para la instrumentación de esta prueba, se puede partir de cualquier muestra biológica, lográndose importante sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la tuberculosis, como se ha demostrado en humanos y bovinos.^{8,9,11} El uso de pruebas moleculares permite identificar secuencias específicas del complejo *M. tuberculosis*, incluyendo a *M. bovis*. Una de ellas corresponde al gen que codifica para la proteína de secreción MPB70, el antígeno más abundante en sobrenadantes de cultivo de cepas vacunales y virulentas de *M. bovis*.^{18,19,29,30} MPB70 estimula las respuestas inmune celular (tipo Th1) y humoral durante la infección en bovinos, y humanos.³¹⁻³³ En virtud de la especificidad del antígeno MPB70 y a la descripción previa de oligonucleótidos (TB1 y TB2) para amplificar un segmento del gen,^{8,9} se consideró este método para confirmar el diagnóstico de TB en muestras de tejido. La PCR simple implementada mostró una sensibilidad baja (53%), aun cuando en casi todos los animales detectados se utilizó más de una muestra de tejido para la realización de la técnica (NL: traqueobronquiales, mediastínicos o retrofaríngeos). Sin embargo, la especificidad fue del 88%, ya que ocho animales identificados tenían lesiones compatibles (ZN). Resultados similares se han obtenido en trabajos previos.^{9,28} En este trabajo se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar una región central (208 pb) contenida en la secuencia amplificada por PCR simple (PCR anidada). La técnica desarrollada permitió aumentar la sensibilidad del diagnóstico, lográndose amplificar la secuencia específica de MPB70 a partir de, aproximadamente, medio genoma de *M. bovis* (2.5 fg). Estos resultados concuerdan con estudios que utilizan la PCR anidada, logrando amplificar hasta menos de un genoma de la micobacteria.¹¹

Como se observa comúnmente con otras pruebas de diagnóstico, la especificidad disminuyó (77%) de manera inversa al aumento de la sensibilidad, ya que de los 21 animales positivos a PCR anidada sólo 15 tenía lesiones compatibles (ZN).^{34,35} No obstante, esta técnica permitió identificar al 100% de lesiones granulomatosas sugestivas de TB (HE), bajo condiciones de máxima rigidez (reasociación y extensión a 72°C). En virtud de la reactividad de los 21 animales a tuberculina, la condición epidemiológica de la zona y la confirmación de TB en el hato de origen, es posible sugerir que la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes pasa desapercibida a la tinción de ZN (falsos negativos), debido entre otras causas a la poca cantidad de micobacterias presentes en lesiones tuberculosas.^{22, 25,36}

Acknowledgements

We thank the CANETB personnel for the valuable help in the collection of samples and the application of the field tests; specially José Ramón Gastellum, coordinator of the CANETB in Sonora, Mexico; also to the National Producer of Biological Veterinary Products, for the donation of antigens (PPD) and bacterial strains. This work was financed in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología in Mexico, 28637-B; G34799, and INIFAP, PRECI-2954.

Referencias

1. De Kantor IN, Ritacco V. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet Microbiol* 1994;40:5-14.
2. CANETB, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Disponible en: URL : <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc468/2004>
3. Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Rec* 1978;103:420-425.
4. Costello E, Egan JW, Quigley FC, O'Reilly PF. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet Rec* 1997;141:222-224.
5. NOM-031-ZOO-1995. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoosanitaria (CONAPROZ), Normas Oficiales Mexicanas en materia de Salud Animal en URL : <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/mrni/Doc222/2004>
6. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest* 1996;8:351-354.
7. Corner LA. *Postmortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994;40:53-63.
8. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:255-258.
9. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 1991;27:187-195.
10. Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, *et al.* Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33:33-36.
11. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995;43:227-240.
12. Liebana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1996;34:933-938.

La buena concordancia de la PCR anidada tanto con cultivo de *M. bovis*, como con la identificación de lesiones compatibles (ZN) y sugestivas de tuberculosis, permite sugerir su empleo para confirmar el diagnóstico de TB. El empleo de pruebas de PCR para diagnóstico confirmativo de TB permite incrementar la sensibilidad, lo cual es de suma importancia para el control de la enfermedad. La realización de PCR anidada contra la copia única del gen que codifica para el antígeno MPB70, bajo condiciones de máxima rigidez, permite alcanzar una alta especificidad para el diagnóstico de la TB. Como parte de la PCR de diagnóstico y para evitar diagnósticos falsos negativos, se puede instrumentar la amplificación de la secuencia del gen mitocondrial *cyb* en las muestras procesadas.

La sensibilidad y especificidad de la PCR anidada desarrollada en este trabajo permitiría confirmar el diagnóstico de TB en 24 horas. La instrumentación de pruebas alternativas se deberá establecer en función de las necesidades de diagnóstico, para diversas situaciones epidemiológicas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al personal de la CANETB su valiosa ayuda en la colección de muestras y aplicación de pruebas en campo; en particular, al MVZ José Ramón Gastellum, coordinador de la CANETB en Sonora, México; asimismo, a la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, por la donación de antígenos (PPD) y cepas bacterianas. Este trabajo fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, 28637-B; G34799, e INIFAP, PRECI-2954.

13. Kent LW, Rahemtulla F, Hockett RD Jr, Gilleland RC, Michalek SM. Effect of lipopolysaccharide and inflammatory cytokines on interleukin-6 production by healthy human gingival fibroblasts. *Infect Immun* 1998;66:608-614.
14. Dziadek J, Sajduda A, Borun TM. Specificity of insertion sequence-based PCR assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:569-574.
15. Payeur J, Jarganin J, Marquart J, Schaper IY, Martin B. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. National Services Laboratories Iowa, USA: United States Department of Agriculture, 1993.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.
17. Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:6196-6200.

18. Radford AJ, Duffield BJ, Plackett P. Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun* 1988;56:921-925.
19. Harboe M, Nagai S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:444-452.
20. Fifis T, Plackett P, Corner LA, Wood PR. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand J Immunol* 1989;29:91-101.
21. Altman DG. Practical statistics for medical research. London UK: Chapman and Hall; 1991.
22. Committee on Bovine Tuberculosis. Livestock disease eradication: Evaluation of the cooperative state-federal bovine tuberculosis eradication program. Washington DC, USA: National Academy Press; 1994.
23. Bauer J, Thomsen VO, Poulsen S, Andersen AB. False-positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross-contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1997;35:988-991.
24. Corner L, Melville L, McCubbin K, Small KJ, McCormick BS, Wood PR, et al. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust Vet J* 1990;67:389-392.
25. Kell DB, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Opin Microbiol* 2000;3:238-243.
26. McIlroy SG, Neill SD, McCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec* 1986;118:718-721.
27. Norton JH. Tuberculosis-like granulomas in cattle caused by *Actinomyces*. *Aust Vet J* 1976;52:455-457.
28. Duffield BJ, Norton JH, Hoffmann D. An analysis of recent isolations of *Mycobacterium bovis* and saprophytic mycobacteria from cattle in northern Queensland. *Aust Vet J* 1989;66:307-308.
29. Harboe M, Nagai S. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am Rev Respir Dis* 1984;129:444-452.
30. Wood PR, Ripper J, Radford AJ, Bundesen PG, Rylatt DB, Cottis LE, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Mycobacterium bovis*. *J Gen Microbiol* 1988;134:2599-2604.
31. Fifis T, Plackett P, Corner LA, Wood PR. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand J Immunol* 1989;29:91-101.
32. Lightbody KA, Girvin RM, Mackie DP, Neill SD, Pollock JM. T-cell recognition of mycobacterial proteins MPB70 and MPB64 in cattle immunized with antigen and infected with *Mycobacterium bovis*. *Scand J Immunol*. 1998;48:44-51.
33. Al-Attayah R, Shaban FA, Wiker HG, Oftung F, Mustafa AS. Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted mycobacterial antigen MPB70. *Infect Immun*. 2003;71:1953-1960.
34. Wilesmith JW, Williams DR. Observations on the incidence of herds with non-visible lesioned tuberculin test reactors in south-west England. *Epidemiol Infect*. 1987;99:173-178.
35. Estrada-Chávez C, Mancilla R, Arriaga DC, Pérez GR, Díaz OF. Determinación de anticuerpos anti-PPD en hatos lecheros con distintas prevalencias de tuberculosis bovina en México. *Veterinaria México* 2001; 33:207-211.
36. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol*. 1998;119:27-44.