

Veterinaria México

Volumen 35
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2004
July-September

Artículo:

Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina

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*



Medigraphic.com

Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina

Agreement between PCR and conventional methods for diagnosis of bovine tuberculosis

Ciro Estrada-Chávez*
Fernando Díaz Otero*
Camila Arriaga Díaz*
Nicolás Villegas-Sepúlveda**
Rafael Pérez González***
Dante González Salazar*

Abstract

Diagnosis of bovine tuberculosis (TB) was analyzed using polymerase chain reaction (PCR) in 2 groups of animals: the first formed by 21 tuberculin reacting cattle from a TB endemic zone, and the second by 20 tuberculin negative cattle from a TB-free zone. All 41 animals were sacrificed and *post mortem* inspection, histopathology and *Mycobacterium bovis* culture were performed. In the first group, tuberculous-like lesions were found in all 21 cases by histopathology (hematoxylin-eosin), 15 of them had compatible lesions (Ziehl-Neelsen positives) and *M. bovis* was cultured only in 11. Lesions were not found in any of the animals from the second group. Histopathology showed good concordance with culture, both for tuberculosis-like lesions (Cohen's Kappa value, $k = 0.52$) as well as for compatible lesions ($k = 0.44$). DNA was obtained from lymphatic nodes associated to the respiratory tract in all 41 cases. A simple PCR directed towards the gene of the MPB70 protein was implemented and a new nested PCR was developed. The nested PCR detected as positives the 21 cases with tuberculous-like lesions (100%). Both PCR methods showed good concordance with histopathology ($k = 0.44-0.71$), but in the case of *M. bovis* culture this concordance was observed only with nested PCR ($k = 0.52$). Considering the compatible lesions (ZN) as a confirmative diagnosis, both culture and simple PCR showed 53% of sensitivity and 88% of specificity, while the nested PCR showed 100% of sensitivity and 77% of specificity. The nested PCR can allow the confirmation of TB diagnosis in 24 hours.

Key words: POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) POST MORTEM INSPECTION (PI), HISTOPATHOLOGY, BOVINE TUBERCULOSIS (TB), *MYCOBACTERIUM BOVIS*.

Resumen

Se analizó el diagnóstico de tuberculosis bovina (TB) usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en dos grupos de animales: El primero de ellos constituido por 21 bovinos reactivos a la tuberculina de una zona endémica de TB y el segundo de 20 animales negativos a la tuberculina, de una zona libre. Los 41 animales se sacrificaron y se realizó inspección *post mortem*, histopatología y cultivo de *Mycobacterium bovis*. En el primer grupo, a la histopatología se identificaron lesiones sugestivas de TB (hematoxilina-eosina) en los 21 casos, 15 de ellos tenían lesiones compatibles (Ziehl-Neelsen positivas) y sólo en 11 se aisló *M. bovis*. No se encontraron lesiones en ninguno de los animales del segundo grupo. La histopatología mostró buena concordancia con cultivo, tanto para lesiones sugestivas (valor de Cohen's Kappa, $k = 0.52$) como para lesiones compatibles ($k = 0.44$). En los 41 casos se obtuvo ADN de nódulos linfáticos del tracto respiratorio. Se

Recibido el 12 de septiembre de 2003 y aceptado el 10 de marzo de 2004.

* Departamento de Biotecnología Aplicada, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera México-Toluca Km 15.5, Palo Alto, Cuajimalpa, 05110, México, D. F.

** Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, México, D. F.

*** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Carretera Cuautitlán- Teoloyucan, Km. 1.5 Xhala, Estado de México. Correspondencia: Ciro Estrada-Chávez, Departamento de Biotecnología Aplicada. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, Departamento de Biotecnología Aplicada, Carretera México-Toluca Km 15.5, Palo Alto, Cuajimalpa, 05110, México, D. F. Tel. 0152+55703100 Ext. 34, Fax 0152+55704073, e-mail: estradaciro@hotmail.com

instrumentó un método de PCR simple dirigido contra un segmento de la secuencia que codifica para la proteína MPB70 y se desarrolló una nueva técnica de PCR anidada. La PCR anidada detectó como positivos los 21 casos con lesiones sugestivas de TB (100%). Ambos métodos de PCR mostraron buena concordancia con histopatología ($k = 0.44-0.71$), pero en el caso del cultivo de *M. bovis* ésta sólo se observó con la PCR anidada ($k = 0.52$). Considerando las lesiones compatibles (ZN) como diagnóstico confirmativo, tanto el cultivo como la PCR simple mostraron 53% de sensibilidad y 88% de especificidad, mientras que la PCR anidada mostró 100% de sensibilidad y 77% de especificidad. La PCR anidada puede permitir la confirmación del diagnóstico de TB en 24 horas.

Palabras clave: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR), INSPECCIÓN *POST MORTEM* (IP), HISTOPATOLOGÍA, TUBERCULOSIS BOVINA (TB), *MYCOBACTERIUM BOVIS*.

Introduction

Bovine tuberculosis (TB) constitutes a very serious animal health problem and a risk to public health.¹ The causal agent, *Mycobacterium bovis*, is widely distributed in Mexico. At this time the National TB Eradication Campaign (CANETB) considers that the states on the northern border, with the exception of Baja California Norte; as well as Quintana Roo and Yucatan, are in eradication phase. The rest of the national territory is considered as control zone.²

For routine field diagnosis, the Campaign uses the intradermal test with the purified protein derivative (PPD) or tuberculin. Whenever a higher sensitivity is required, such as when the prevalence is high, the caudal fold test is applied; and in case more specificity is required (low prevalence), then the comparative cervical test is preferred. Nevertheless, as with all diagnostic tests, the tuberculin test has its glitches. The simple caudal test has a sensitivity of 72% to 91% and specificity of 78% to 96%.^{3,4} False positive diagnosis generate economical and social problems, since, according to the Mexican Official Norm,⁵ animals positive reactors to the test shall be slaughtered.

In order to confirm infection, a postmortem inspection (PI) is performed and lesions suggestive of TB are searched for. Tuberculous lesions found during the IP are mainly seen in the lymph nodes (LN) associated to the respiratory tract.⁶ The PI is considered to be a practical method, if it is used together with histopathology, to identify compatible lesions with the presence of acid-fast bacilli detected by the Ziehl-Neelsen method.^{5,7} For a definitive diagnosis samples of the lesions are sent to the bacteriology laboratory. Nevertheless, TB diagnosis by culture of *M. bovis* represents a true barrier of time, money and efforts. Due to the problems associated with the isolation of this mycobacterium, the possibility of confirming the TB diagnosis through the polymerase chain reaction has been considered, using specific oligonucleotides to amplify the DNA fragments

Introducción

La tuberculosis bovina (TB) constituye un grave problema de salud animal y un riesgo en la salud pública.¹ El agente causal, *Mycobacterium bovis*, está ampliamente distribuido en México. Actualmente la Campaña Nacional para la Erradicación de TB (CANETB) considera los estados fronterizos del norte, con excepción de Baja California Norte, y a Quintana Roo y Yucatán en etapa de erradicación. El resto del territorio nacional se considera zona en control.²

Para el diagnóstico de rutina en campo, la campaña utiliza la prueba intradérmica con derivado proteínico purificado (PPD) o tuberculina. Cuando se requiere mayor sensibilidad, como en casos de alta prevalencia, se aplica en el pliegue caudal y para el caso de requerir mayor especificidad (baja prevalencia), se utiliza la doble comparativa en el cuello. No obstante, como todas las pruebas de diagnóstico, la prueba de tuberculina tiene fallas. La simple caudal tiene sensibilidad de 72% al 91% y especificidad del 78% al 96%.^{3,4} Los diagnósticos falsos positivos generan problemas económicos y sociales, ya que conforme a la Norma Oficial Mexicana,⁵ los animales reactores positivos a la prueba se deben sacrificar.

Para confirmar la infección se realiza una inspección *post mortem* (IP) y se buscan lesiones sugestivas de TB. Las lesiones tuberculosas encontradas en la IP se presentan principalmente en nódulos linfáticos (NL) asociados al tracto respiratorio.⁶ La IP 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 Ziehl-Neelsen.^{5,7} Para el diagnóstico definitivo se envían muestras de estas lesiones al laboratorio de bacteriología. Sin embargo, el diagnóstico de TB mediante el cultivo de *M. bovis* representa una verdadera barrera de tiempo, dinero y esfuerzo. Debido a los problemas asociados al aislamiento de esta micobacteria, se ha considerado confirmar el diagnóstico de TB mediante la reacción en cadena de la polime-

of the genome of bacteria included in the *M. tuberculosis* complex. PCR for the gene that codifies the MPB70 protein has shown good sensitivity and excellent specificity in the diagnosis of tuberculosis in humans and bovines.^{8,9} A single copy of this gene has been shown in strains of *M. bovis* and bacteria of the *M. tuberculosis* complex, as well as its absence in 24 different other species of mycobacteria and other bacterial genus.⁹ Other techniques directed towards insertion sequences (IS) have been questioned due to their specificity as opposed to the PCR of MPB70.¹⁰⁻¹⁴ Nevertheless, it is necessary to instrument this technique in tissue samples, analyzing its sensitivity and specificity under different epidemiological situations. The instrumentation of a highly sensitive and specific PCR to confirm the diagnosis of TB would permit having the results in a few hours, as compared to culture that usually requires months. The objective of this study was the evaluation of PCR in two different modalities: simple and nested. The results were compared with the *post mortem* inspection (PI), histopathology and bacteriology culture results.

Material and methods

Study groups

This study had a first group of 21 Holstein Friesian cows with two to five calvings, reactors to the simple caudal tuberculin test, from a dairy farm found in a high TB prevalence zone in the State of Mexico, Mexico. As negative controls, a second group was used of 20 Holstein Friesian cows with two to five calvings, negative to the simple caudal tuberculin test, and which came from TB free herds located in a TB free zone in Sonora. All 41 animals in the study were slaughtered, as part of the management process of each farm, and for the purposes of this study, the confirmation diagnosis for TB was performed.

PI, histopathology and bacteriology

The animals were inspected postmortem (PI), the following lymph nodes (LN) were examined: tracheal-bronchial, mediastinal, retropharyngeal, submaxillary, mesenteric, hepatic, prescapular, prefemoral, iliac and supramammary, as well as lungs, liver and spleen. Each one of the inspected organs was subjected to an exhaustive macroscopic examination, performing cuts to find lesions. Samples were taken for histopathology and bacteriology, and they were processed according to that which was established, not withstanding if lesions were found or not.^{7,15} The samples for histopathology were fixed in a 10% formaldehyde in PBS solution and then were embedded in paraffin. The histology preparations were stained

rasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de ADN en el genoma de 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.^{8,9} Se ha demostrado 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.⁹ Otras técnicas dirigidas contra secuencias de inserción (IS) que han sido cuestionadas por su especificidad a diferencia de la PCR contra MPB70.¹⁰⁻¹⁴ Sin embargo, es necesario instrumentar esta técnica en muestras de tejido, analizando su sensibilidad y especificidad bajo distintas situaciones epidemiológicas. La instrumentación de una PCR altamente sensible y específica para confirmar el diagnóstico de TB, permitiría obtener resultados en pocas horas, en comparación con el cultivo que requiere usualmente meses. El objetivo del presente estudio fue evaluar la PCR en dos distintas modalidades, simple y anidada. Los resultados se compararon con la inspección *post mortem* (IP), histopatología y cultivo bacteriológico.

Material y métodos

Grupos de estudio

En el presente estudio se utilizó un primer grupo de 21 vacas Holstein Friesian de entre dos y cinco partos, rectoras a la tuberculina simple caudal, de un hato lechero ubicado en una zona de alta prevalencia de TB en el Estado de México. Como testigos negativos del estudio se utilizó un segundo grupo de 20 vacas Holstein Friesian de entre dos y cinco partos, negativas a la tuberculina simple caudal, de zona y hatos libres de TB ubicados en Sonora. Los 41 animales del estudio se sacrificaron como parte del manejo propio de cada explotación y para fines del presente trabajo se realizó en todos el diagnóstico confirmativo de TB.

IP, histopatología y bacteriología

Los animales se sometieron a una IP, se examinaron los nódulos linfáticos (NL): traqueobronquiales, mediastínicos, retrofaríngeos, submandibulares, mesentéricos, hepáticos, preescapulares, prefemorales, iliacos y supramamarios, así como pulmones, hígado y bazo. Cada uno de los órganos revisados se sometió a un examen macroscópico exhaustivo, realizando cortes para tratar de evidenciar lesiones. Se colectaron muestras para histopatología y bacteriología, independientemente de la presencia o no de lesiones se proce-

with Hematoxylin-Eosin (HE) and Ziehl-Neelsen (ZN). They were examined looking for lesions suggestive of TB and the presence of acid-fast bacilli, in order to identify lesions compatible with TB.⁷ The samples were macerated independently in mortars with 5 ml of PBS, and with red phenol as pH indicator, digested and decontaminated with 0.5 N NaOH, neutralized with 6 N HCL and centrifuged at 3 500 g for 20 min. The sediment, of all the tissue samples that were processed, was cultured at 37°C in medium for primary isolation: Stonebrink's supplemented with pyruvate, Milddlebrooks 7H11, and Herrold's with egg yolk or Lowenstein Jensen. After that, the colonies that were obtained were cultured again in Proskauer-Beck with 5% equine serum to perform the biochemical test and identify the genus and species. The cultures without growth after three months were considered negative.¹⁵

Simple and nested PCR

From the LN tissue samples associated to the respiratory tract (tracheal-bronchial, mediastinal or retropharyngeal) DNA was extracted, as previously described.⁸ Approximately 0.5 ml of each sample of macerated tissue was transferred to a micro-centrifuge tube (1.9 ml), and was centrifuged at 10 000 g during 10 minutes and the supernatant was decanted. The pellet was homogenized with 400 µl of TE (100 mM tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA), with 50 µl of lysozyme (100 mg/ml) and it was incubated during 1 h at 37°C. Then 70 µl of 10% SDS were added with 6 µl of a proteinase K solution (10 mg/ml) and incubated for 10 min at 65°C. Then 100 µl of 5 M NaCl were added to each sample followed by 80 µl of a 5M NaCl solution with 5% N-cetyl- N, N, N, - trimethyl ammonium bromide (CTAB); this was incubated during 10 min at 65°C. The DNA was extracted with one volume of chloroform/ isoamylic alcohol (24:1). The DNA was precipitated with 0.6 volumes of absolute isopropanol and it was washed with 1 ml of 70% ethanol. The DNA was re-suspended in 25 µl water (MILI-Q) and quantified using 1:50 dilutions with a GeneQuant II spectrometer.* The readings were performed at 260 nm and at 280 nm, to calculate the concentration and pureness of the DNA.¹⁶ Genomic DNA, purified and homogenized at 100 ng/µl, was visualized by means of electrophoresis in a 0.7% agar gel stained with 0.005% ethidium bromide, run at 120 volts during 50 minutes. The gels were observed in a UV transilluminator** and were photographed with an instant camera.***

The PCR reactions were made in a final volume of 20 µl. The PCR mix had a final concentration of 10 mM of tris-HCl (pH 8.3); 50 mM of KCl; 250 µM of

saron conforme a lo establecido.^{7,15} Las muestras para histopatología se fijaron en solución de formaldehído al 10% en PBS y se incluyeron en parafina. Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y Ziehl-Neelsen (ZN). Las preparaciones se examinaron para detectar lesiones sugestivas de TB y la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes, para identificar lesiones compatibles con TB.⁷ Las muestras fueron maceradas de manera independiente, en morteros con 5 ml de PBS, con rojo de phenol como indicador de pH, digeridas y decontaminadas con 0.5 N de NaOH, neutralizadas con 6 N de HCL y centrifugadas a 3 500 × g por 20 min. El sedimento de todas las muestras de tejidos procesados se cultivaron a 37°C en medios para primoaislamiento: Stonebrink's suplementado con piruvato, Milddlebrooks 7H11, y Herrold's con yema de huevo o Lowenstein Jensen. Posteriormente las colonias obtenidas se resembraron en medio Proskauer-Beck con 5% de suero equino para realizar pruebas bioquímicas e identificar género y especie. Los cultivos sin crecimiento después de tres meses se consideraron negativos.¹⁵

PCR simple y PCR anidada

A partir de muestras de tejido de NL asociados al tracto respiratorio (traqueobronquiales, mediastínicos o retrofaríngeos) se extrajo ADN, como se describió previamente.⁸ Aproximadamente 0.5 ml de cada muestra de tejido macerado se transfirió a un tubo para microcentrifuga (1.9 ml), se centrifugó a 10 000 × g durante diez minutos y se decantó el sobrenadante. La pastilla se homogenizó con 400 µl de TE (100 mM tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA), con 50 µl de lisozima (100 mg/ml) y se incubó 1 h a 37°C. Se agregaron 70 µl de SDS al 10% y 6 µl de una solución de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó 10 min a 65°C. Se agregaron 100 µl de NaCl 5 M a cada muestra y posteriormente 80 µl de una solución de NaCl 5M con 5% de N-cetyl- N, N, N, - trimethyl bromuro de amonio (CTAB) y se incubó 10 min a 65°C. El ADN se extrajo con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). El ADN se precipitó con 0.6 volúmenes de isopropanol absoluto y se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El ADN resuspendido en 25 µl agua (MILI-Q) se cuantificó utilizando diluciones 1:50, con un espectrómetro GeneQuant II.* Las lecturas se realizaron a 260 nm y a 280 nm, para calcular la concentración y pureza del ADN.¹⁶ El ADN genómico purificado y homogenizado a 100 ng/µl se visualizó mediante electrophoresis en geles de agarosa al 0.7% y 0.005% de bromuro de etidio, a 120 volts durante 50 minutos. Los geles se obser-

*Gibco BRL.

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

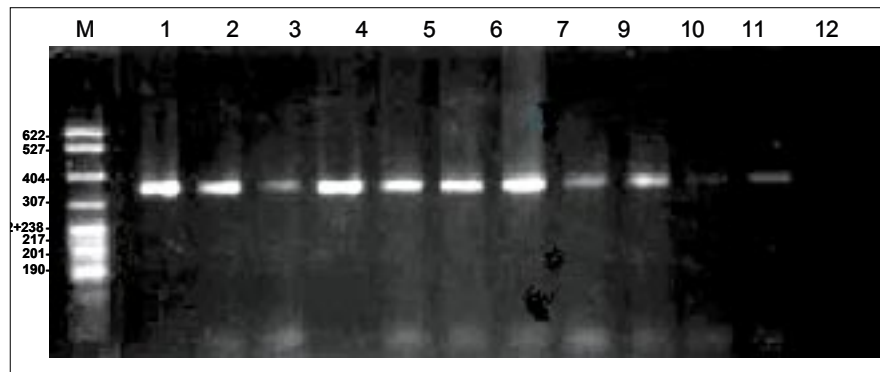


Figura 1. PCR testigo en muestras de tejido. Líneas 1-11. Productos de la amplificación con los oligonucleótidos (cyb1 y2) utilizando ADN extraído de muestras de tejido macerado de nódulos linfáticos de bovinos. Línea 12. Testigo negativo de la reacción donde se omitió el ADN. Se observa una banda de 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.

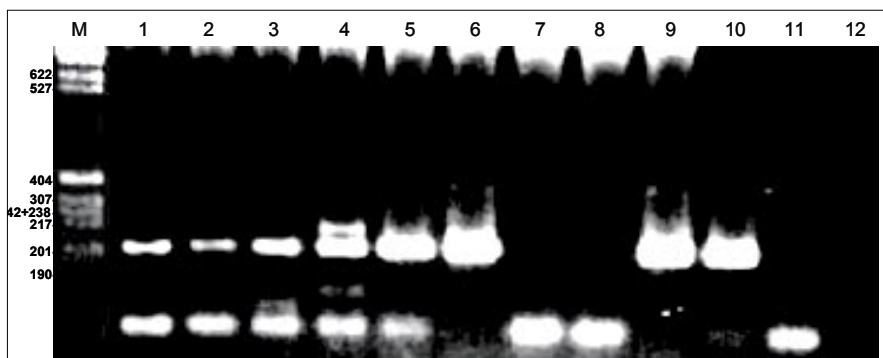


Figura 2. Resultados de la PCR anidada en muestras de tejido para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Líneas 1-6 Bovinos reactivos a la tuberculina, 7-8 bovinos sanos, libres de TB. Productos de la amplificación con los oligonucleótidos M22/3 y M22/4 (208 pb) utilizando ADN extraído de muestras 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-

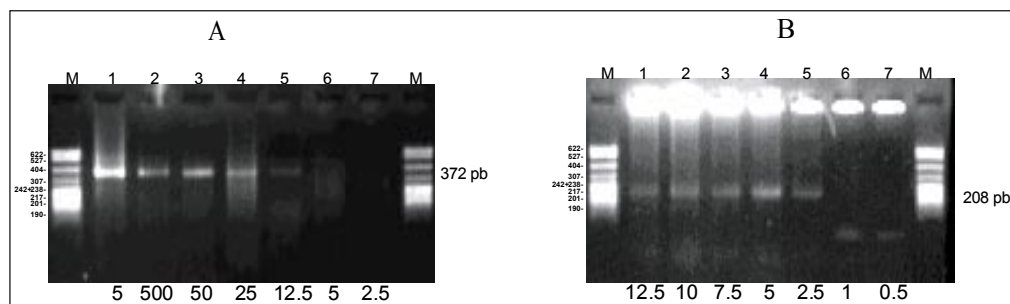


Figura 3. Sensibilidad de la PCR simple y anidada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Estimación de la sensibilidad para la PCR utilizando ADN genómico de la biomasa del cultivo de *M. bovis* cepa AN5, a distintas concentraciones. Panel A. Para la PCR simple se amplificó un segmento de 372 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 actinobacillosis 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.