

Veterinaria México

Volumen 37
Volume

Número 1
Number

Enero-Marzo 2006
January-March

Artículo:

Confirmación de la excreción de
Mycobacterium bovis en exudados
nasales mediante PCR anidada en un
hato lechero

Derechos reservados, Copyright © 2006:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de
este sitio:

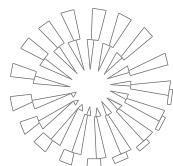
- 📖 Índice de este número
- 📖 Más revistas
- 🔍 Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- 📖 *Contents of this number*
- 📖 *More journals*
- 🔍 *Search*



medigraphic.com



Confirmación de la excreción de *Mycobacterium bovis* en exudados nasales mediante PCR anidada en un hato lechero

Confirmation of *Mycobacterium bovis* excretion in nasal exudates using nested PCR in a dairy cattle herd

Aurora Romero Tejeda*** Camila Arriaga Díaz*** Jesús Guevara Vivero* José Alfredo García Salazar*
Rubén Arturo Torres León* Ciro Estrada-Chávez***

Abstract

Transmission of bovine tuberculosis (BT) through aerosols in natural infections has been poorly characterized. With the aim of determining the frequency of respiratory excretion of *Mycobacterium bovis*, and its relationship with the immune response, the presence of *M. tuberculosis* complex bacteria in nasal exudates was analyzed using nested PCR during a period of 6 months, in a herd of dairy cattle with high risk of BT transmission. The results allowed the confirmation of respiratory excretion of *M. bovis*, together with BT transmission in this herd, suggesting also the influence of IFN γ in this event.

Key words: BOVINE TUBERCULOSIS, NASAL EXUDATES, DAIRY CATTLE, NESTED PCR.

Resumen

La transmisión de la tuberculosis bovina (TB) a través de aerosoles representa un fenómeno poco caracterizado en la infección natural. Con el objetivo de estudiar la frecuencia de excreción de *Mycobacterium bovis* vía respiratoria y su relación con la respuesta inmune, se analizó durante seis meses la presencia de bacterias del complejo *M. tuberculosis* en exudados nasales, utilizando PCR anidada, en un hato de bovinos lecheros con alto riesgo de transmisión de TB. Los resultados confirmaron la excreción de *M. bovis* vía respiratoria, colateralmente a la transmisión de TB en este hato, sugiriendo además la influencia de INF- γ en este fenómeno.

Palabras clave: TUBERCULOSIS BOVINA, EXUDADOS NASALES, VACAS LECHERAS, PCR ANIDADA.

Recibido el 27 de enero de 2005 y aceptado el 8 de agosto de 2005.

*Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 1.5, Xhala, Cuautitlán-Izcalli, 54700, Estado de México, México.

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

***Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hidalgo, 43600, México.

Correspondencia: Ciro Estrada-Chávez, Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Rancho Universitario, Exhacienda de Aquetzalpa, Apartado Postal 32, CP 43600, Tulancingo, Hidalgo, México. Tel. 01(771)7172000 Ext. 4640, 4641, 01(775)7533495, Fax: 01(771)7172125. Correo electrónico: estrada@uaeh.reduaeh.mx

Introduction

Bovine tuberculosis (BT) causes serious economic losses for the dairy industry.¹ Currently, there is an effort being made to eradicate *Mycobacterium bovis*, species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex that causes this disease, and that is a zoonosis that is considered an important public health problem.² The most common transmission form is by elimination of mycobacteria through respiration aerosols that may reach the lung alveoli.³ In some studies, the intermittent presence of *M. bovis* in nasal exudates of naturally⁴⁻⁷ or experimentally infected bovines has been described.^{8,9} Nevertheless, even though there is a persistence of BT in dairy herds, most of the infected animals exhibit limited pathology and scarce elimination of mycobacteria.¹⁰⁻¹² Experimental data suggest that an excessive immune response or a high virulence of the bacilli favor the transmission of BT.^{13,14}

M. bovis culture constitutes an optimal confirming diagnostic procedure for BT, but it requires a large amount of time, has a low sensitivity and there are also false positive results.^{15,16} Tuberculin tests are useful in the identification of tuberculosis infected cattle, but for an advanced BT control, complementary tests have been proposed, such as gamma interferon (IFN- γ) test, that detects infected animals before they react to tuberculin.¹⁷ Also, the polymerase chain reaction (PCR) allows a quick confirmation diagnosis of BT without prior culture. Through PCR for the single gene copy that codifies MPB70 protein secretion, it is possible to specifically identify mycobacteria of the *M. tuberculosis* complex, including *M. bovis* strains.^{18,19} With the recently described nested PCR technique for MPB70, up to 5 fg of DNA ($\approx$ 1 genome) may be detected. This test has good concordance with histopathology, as well as with culture of *M. bovis*²⁰ and by including specificity and inhibition controls, it may be used as an epidemiological tool.

Based on the above, this work was designed with the objective of studying the excretion of *M. bovis* by respiration during a period of six months, using as a positive indicator a nested PCR with DNA of nasal exudates. In addition, this indicator was compared with the tuberculin and IFN- γ tests. Under supervised control by the National Bovine Tuberculosis Eradication Campaign (CANETB) a sample was taken from 63% of the bovine herd confined in the Faculty of Superior Studies of Cuautitlan, that had a history of high BT prevalence and isolations of *M. bovis*. Sixty-nine Holstein Friesian females, older than two years of age were included since it is recognized that under these conditions the relative risk of BT transmission, as well as the probability of reacting to tuberculin tests, is increased.³

Introducción

La tuberculosis bovina (TB) ocasiona grandes pérdidas económicas en la industria lechera.¹ Actualmente se pretende erradicar a *Mycobacterium bovis*, especie del complejo *Mycobacterium tuberculosis* causante de esta enfermedad, considerada como zoonosis de importancia en salud pública.² Su vía de transmisión más común es la respiratoria a través de la eliminación de micobacterias en aerosoles que pueden alcanzar la luz alveolar en pulmones.³ En algunos trabajos se ha descrito presencia intermitente de *M. bovis* en exudados nasales de bovinos infectados natural⁴⁻⁷ o experimentalmente.^{8,9} No obstante, a pesar de la persistencia de TB en hatos lecheros, la mayoría de animales infectados exhibe patología limitada y eliminación escasa de micobacterias.¹⁰⁻¹² Los datos experimentales sugieren que una excesiva respuesta inmune o una alta virulencia del bacilo favorecen la transmisión de TB.^{13,14}

El cultivo de *M. bovis* constituye el procedimiento óptimo para el diagnóstico confirmativo de TB, pero requiere mucho tiempo, tiene poca sensibilidad y también se obtienen resultados falsos positivos.^{15,16} La prueba de tuberculina es útil para identificar ganado tuberculoso, pero para el control avanzado de la TB se han propuesto pruebas complementarias, como la de interferón gamma (IFN- γ), que permite identificar animales infectados antes de que reaccionen a la tuberculina.¹⁷ Asimismo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) confirma rápidamente el diagnóstico de TB sin cultivo previo. Mediante la PCR para la copia única del gen que codifica la proteína de secreción MPB70, se identifican micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, incluyendo cepas de *M. bovis*.^{18,19} Con una técnica de PCR anidada para MPB70 descrita recientemente se pueden detectar hasta 5 fg de ADN ($\approx$ 1 genoma) con buena concordancia tanto con histopatología como con cultivo de *M. bovis*.²⁰ Esta prueba puede ser utilizada como herramienta epidemiológica incluyendo testigos de especificidad e inhibición.

Con base en lo anterior, en este trabajo se planteó como objetivo estudiar la excreción de *M. bovis* vía respiratoria durante seis meses, utilizando como indicador el resultado positivo a PCR anidada con ADN de exudados nasales. Adicionalmente se comparó este indicador con pruebas de tuberculina e INF- γ . Bajo el control supervisado de la Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina (CANETB) se tomó como muestra a 63% del hato de bovinos lecheros en confinamiento, de la Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, con antecedentes de alta prevalencia de TB y aislamiento de *M. bovis*. Se incluyeron 69 hembras Holstein

At days one and 180 of this study, the simple caudal tuberculin test was performed, inoculating intradermally 0.1 mL of bovine purified protein derivative (PPD), in the caudal fold according to the procedures established by CANETB. Seventy-two hours after inoculation an increase of caudal fold thickness larger than 4 mm was considered to be a positive reaction to the test. The IFN- γ test was performed on two occasions, 15 days after the tuberculin test, as it has been recently suggested.²¹ To measure IFN- γ , blood samples were taken in heparin (1.5 mL), were stimulated 24 h with 100 μ L of PPD (300 μ g/mL) and plasma was collected for quantification of IFN- γ as indicated by the supplier of the immunoenzymatic test. Of the study herd sample (n = 69), 43% of the animals reacted to the tuberculin test (n = 30) and 35% to IFN- γ (n = 24). With both tests, a relative prevalence and incidence of 45% (average) and 11% (nine new cases) in six months, respectively were estimated.

Nasal exudates from both cavities were collected from the animals each month during six occasions, using sterile swabs submerged in 5 mL of sterile phosphate saline solution. Samples were maintained at 4°C for transfer, were centrifuged at 3 500 g during 20 min and the nasal sediments were frozen at -20°C. DNA was extracted from the sediments according to the method described for mycobacteria;¹⁸ it was quantified by spectrometry (DO at 260/280 nm) and evaluated by electrophoresis in 1% ethidium bromide agar gel (0.005%).²² A nested PCR was performed as previously described to amplify the 208 pb region of MPB70 gene of the *M. tuberculosis* complex.²⁰ Positive, negative and inhibition controls were included to control the technique. (Figure 1).²³ Programs were carried out in the Gene Amp PCR system 2400 and the PCR products were analyzed in 2% agar gels. Twenty six percent of tuberculin reactor animals (8/30) excreted *M. bovis* in a six month period, in one monthly sample, there was an exception of one animal with two positive samples in a three month interval (Table 1, number 3). This result is above of what has been described in other studies that mention 8% to 20% of excreting animals in different populations.^{24,25} Due to the monthly interval for sample taking and the total duration of this study, the reactors to the immunological tests, but negative to nested PCR, were not discarded as possible transmission sources for the herd. Also, it has been suggested that the intermittency period varies between 6 to 25 weeks due to factors that have yet to be described.¹⁴ In the same manner, the precise duration of the excretion period for *M. bovis* is unknown and the results of this study suggest it could be less than 30 days, since none of the eight animals that excreted were positive by

Friesian mayores de dos años, porque se reconoce que en esas condiciones aumentan tanto el riesgo relativo de transmisión de *M. bovis*, como la probabilidad de reacción a la tuberculina.³

A los días uno y 180 del estudio se realizó la prueba de tuberculina simple caudal, inoculando vía intradérmica en el pliegue ano-caudal 0.1 mL de derivado proteínico purificado (PPD) bovino, según el criterio de la CANETB. Un incremento del grosor de la piel 72 h después de la inoculación mayor a 4 mm se consideró como reacción positiva a la prueba. La prueba de INF- γ se realizó en dos ocasiones 15 días después de la prueba de tuberculina, como se ha sugerido recientemente.²¹ Para medir el IFN- γ se tomaron muestras de sangre heparinizada (1.5 mL), se estimularon 24 h con 100 μ L de PPD (300 μ g/mL) y se cosechó el plasma con el que se procedió a la cuantificación del INF- γ conforme indica el proveedor de la prueba inmunoenzimática. De la muestra del hato de estudio (n = 69), 43% de los animales reaccionó a la tuberculina (n = 30) y 35% al IFN- γ (n = 24). Con ambas pruebas se estimó una prevalencia e incidencia relativas de 45% (promedio) y 11% (nueve casos nuevos) en seis meses, respectivamente.

Los exudados nasales de ambas cavidades se recolectaron de los animales mensualmente en seis ocasiones, utilizando hisopos estériles sumergidos en 5 mL de solución salina de fosfatos estéril. Las muestras se mantuvieron a 4°C para su traslado, se centrifugaron a 3 500 g durante 20 min y los sedimentos nasales se congelaron a -20°C. Mediante un método descrito para micobacterias se extrajo el ADN de los sedimentos,¹⁸ se cuantificó por espectrometría (DO a 260/280 nm) y se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0.005%).²² De acuerdo con lo descrito previamente, se realizó una PCR anidada para amplificar una región de 208 pb del gen MPB70 del complejo *M. tuberculosis*.²⁰ Para control de la técnica se incluyeron testigos positivos, negativos y de inhibición (Figura 1).²³ 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 2%. El 26% de los animales reactores a la tuberculina (8/30) excretó *M. bovis* en un periodo de seis meses, en una sola muestra mensual, con excepción de un solo animal con dos muestras positivas en un intervalo de tres meses (Cuadro 1, número 3). Este resultado supera lo descrito en otras investigaciones que mencionan de 8% a 20% los animales excretores en distintas poblaciones.^{24,25} Debido al intervalo mensual para la toma de muestra y a la duración total de este estudio, los animales reactores a las pruebas inmunológicas, pero negativos a PCR anidada, no se descartan como fuentes de transmisión en el hato. Además, se ha

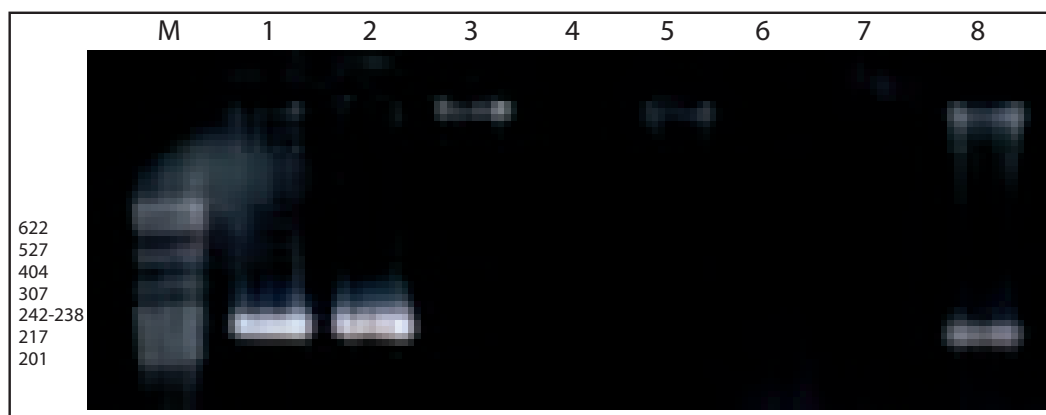


Figura 1. PCR anidada para amplificar un segmento del gen MPB70 del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Líneas: 1-2, *M. bovis* AN5 y *M. tuberculosis* H37Rv; línea 3, *M. avium* D4; línea 4, Agua; 5-8, exudados nasales de bovinos de un hato con alta prevalencia de TB. Gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.005%). M: Marcador de peso molecular.

Figure 1. Nested PCR for amplification of a segment of the *Mycobacterium tuberculosis* complex MPB70 gene. Lines: 1-2, *M. bovis* AN5 and *M. tuberculosis* H37Rv; line 3, *M. avium* D4; line 4, Water; 5-8, bovine nasal exudates from a herd with high BT prevalence. 2% Agarose gel with ethidium bromide (0.005%). M: Molecular weight marker.

nested PCR in two consecutive monthly samples.

Twenty-five tuberculin reactors, 22 of which were positive to IFN- γ and three control bovines, negative to all the tests were slaughtered, (Table 1, numbers 10, 11 and 12). *Post-mortem* inspection (PI) of reactor bovines was performed to search for BT suggestive lesions, mainly in submandibular, retropharyngeal, tracheobronchial, mediastinal, prescapular, precrural, supramammary and pulmonary tissue lymph nodes (LN).²⁶ Visible lesions were classified by size and amount (Table 1) according to previously established parameters.¹⁰ Tissue samples were set in 10% formaldehyde in PBS, set in paraffin and stained with hematoxylin-eosin (HE) to characterize the histopathology lesions and with Zielh-Neelsen (ZN) to determine BT compatible lesions with acid-alcohol resistant bacilli (Table 1).²⁷ Histopathology revealed BT compatible lesions in 36% of reactors (nine animals) with multifocal granulomatous lymphadenitis (HE) and acid-alcohol resistant bacilli (ZN), located mainly in mediastinal retropharyngeal, trachea-bronchial LN, and in two cases in the caudal insertion of medial (right) and apical pulmonary lobes (Table 1, numbers 1 and 2). Two animals had microscopic lesions without macroscopic lesions (Table 1, numbers 1 and 6). Histopathology suggested active BT in LN of the respiratory tract of most of the reactors with lesions, since they had a pattern of mixed lesions: diffuse (type I), in transition (II) and encapsulated (III). The most affected were the retro-pharyngeal LN and in lungs the lesions were characterized by being encapsulated, possibly primary foci. Open pulmonary lesions (diffuse) are considered the origin

sugerido que el periodo de intermitencia varía de entre seis a 25 semanas debido a factores aún no descritos.¹⁴ Asimismo, la duración precisa del periodo de excreción de *M. bovis* se desconoce y los resultados del presente estudio sugieren que podría ser menor a 30 días, ya que ninguno de los ocho animales excretores era positivo a PCR anidada en dos muestras mensuales consecutivas.

Se sacrificaron 25 bovinos reactivos a la tuberculina, 22 de ellos positivos a IFN- γ y tres bovinos testigos, negativos a todas las pruebas (Cuadro 1, números 10, 11 y 12). Se realizó la inspección *post-mortem* de bovinos reactivos para buscar lesiones sugestivas de TB, principalmente en nódulos linfáticos (NL) submandibulares, retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos, preescapulares, precrurales, supramamarios y tejido pulmonar.²⁶ Las lesiones visibles se clasificaron por tamaño y cantidad (Cuadro 1) de acuerdo con parámetros ya establecidos.¹⁰ Las muestras de tejido se fijaron en solución de formaldehído al 10% en PBS, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) para caracterizar las lesiones histopatológicas y con Zielh-Neelsen (ZN) para determinar lesiones compatibles a TB, con bacilos ácido-alcohol resistentes (Cuadro 1).²⁷ La histopatología reveló lesiones compatibles con TB en 36% de los reactivos (nueve animales) con linfadenitis granulomatosa multifocal (HE) y bacilos ácido-alcohol resistentes (ZN), localizadas principalmente en NL mediastínicos, retrofaríngeos, traqueobronquiales, y en dos casos en la inserción caudal de los lóbulos pulmonares medio (derecho), y apical (Cuadro 1,

Cuadro 1

CARACTERÍSTICAS DE LOS HALLAZGOS A LA INSPECCIÓN *Post mortem*,
HISTOPATOLOGÍA Y PCR

CHARACTERISTIC OF <i>Post mortem</i> INSPECTION, HISTOPHATOLOGY AND PCR FINDINGS								
No.	RF	TR	M	MS	HP	L	ZN	PCR
1		+++;I,III		II		+++;III	+	+
2			+++;I,II,III			+++;III	+	+
3			+++;I,II,III		+++;III		+	+
4	+++;II	+++;II					+	+
5	+++;I,III						+	+
6			I,II				+	+
7	+++;I,III	+++;III					+	-
8	+++;III			+++;III			+	-
9	+++;III						+	-
10			+				-	-
11			+				-	-
12			+				-	-

LN: Lymph nodes; RF: Retropharyngeal; TR: Tracheobronchial; M: Mediastinal; Ms: Mesenteric; Hp: Hepatic; L: Lungs.

+: 1 or 2 visible lesions (VL) 5mm in diameter; ++: up to 5 VL between 6 and 10 mm; ***: multiple VL > 10mm.

Type I: Multifocal granulomatous lymphadenitis with exudates mainly made up of macrophages, epithelioid cells, giant cells and lymphocytes without fibrosis (capsule);

Type II: Similar to type 1 with necrosis, fibrosis capsule and central necrosis.

Type III: Granuloma with well defined fibrous capsule and central necrosis

1: Cow without visible lesions (macroscopic) in Mesenteric LN, but with type II lesion by histopathology.

6: Cow without visible lesions, but with type I and II lesions in mediastinal LN 10 to 12: Control animals

of BT transmission, but only a small percentage of tuberculosis infected animals have them^{10,12,26} and the possibility of non apparent lesions must not be disregarded, as has been demonstrated in this, as well as other studies.⁴

Eight animals were detected by nested PCR with DNA samples of nasal exudates (Figure 1), all positive to tuberculin and IFN- γ and 6 with BT compatible lesions (Table 1, numbers 1 to 6). Absence of visible lesions in reactor animals does not indicate lack of capacity of transmission of the bacilli,^{11,28} and it can be associated with recent infection, when it has been described that the bacterial excretion could be larger.^{9,17} On mucous membrane surfaces of the nasal cavity, pharynx, and tonsils, up to 15% of reactors show microscopic lesions and bacilli,²⁹ sites that could probably also constitute primary foci from where

números 1 y 2). Dos animales presentaron lesiones microscópicas sin presentar lesiones macroscópicas (Cuadro 1, números 1 y 6). La histopatología sugirió TB activa en NL del tracto respiratorio de la mayoría de reactores con lesiones, ya que tenían un patrón mixto de lesiones: difusas (tipo I), en transición (II) y encapsuladas (III). El NL más afectado fue el retrofaríngeo y en pulmones las lesiones se caracterizaron por ser encapsuladas, posiblemente focos primarios. Las lesiones pulmonares abiertas (difusas) son señaladas como el origen de la transmisión de TB, pero sólo un bajo porcentaje de animales tuberculosos las presentan^{10,12,26} y no se descarta la posibilidad de lesiones desapercibidas, tal como se ha demostrado en éste y otros trabajos.⁴

Mediante PCR anidada con ADN de muestras de exudado nasal se identificó a ocho animales (Figura

the bacteria are liberated. In this study, the infected animals (reactors) originated nine new cases in six months and the excreting animals with lung lesions are considered the sources of infection even though the others are not eliminated as possible disseminators.

Cohen's Kappa k coefficient was used to measure the concordance between PCR, tuberculin, IFN- γ and histopathology (95% CI).³⁰ Concordance obtained between the nested PCR results and the tuberculin tests and IFN- γ was insufficient ($k = 0.3$) and good ($k = 0.4$), respectively. Between histopathology and nested PCR it was good ($k = 0.4$), but insufficient ($k < 0.4$) with immunological tests. The good concordance found between IFN- γ and the presence of lesions with nested PCR of nasal exudates suggests there is an influence of this cytokine on the process that leads to bacterial excretion.³¹⁻³³ IFN- γ may induce tissue necrosis and liquefaction of encapsulated lesions (immunopathology), mainly due to an excessive activation of macrophage derived factors, such as proteolytic enzymes, tumor necrosis factor- γ and oxygen and nitrogen free radicals.^{34,35}

In conclusion, the excretion of *M. bovis* through the respiratory tract of naturally infected dairy cattle was confirmed by nested PCR method and it is suggested that IFN- γ has an effect on this event. Later studies with larger amount of production units should shorten the sampling period and increase the total duration of the study to determine the duration and intermittency of the excretion periods with a higher precision, and thus study the possible trigger factors that lead to the excretion of *M. bovis*.

Acknowledgements

We thank the head of the Faculty of Superior Studies of Cuautitlan (UNAM) and the Almaraz ranch for the facilities granted for the execution of this study. Also, the valuable help given by CANETB personnel in the application of tuberculin tests and sample collection is recognized; and we thank PRONABIVE, for the donation of PPD and bacteria strains. This study was partially financed by National Council of Science and Technology of Mexico (Conacyt), ref. G34799-B.

Referencias

1. Epidemiologic/Economic Tuberculosis Studies and Bioeconomic Research considerations. In: Livestock disease eradication: Evaluation of the cooperative state-federal bovine tuberculosis eradication program. Committee on Bovine Tuberculosis, Board on Agriculture and National Research Council. Washington DC, USA: National Academy Press; 1994.
2. De Kantor IN, Ritacco V. Bovine tuberculosis in Latin

1), todos positivos a tuberculina e IFN- γ y seis con lesiones compatibles a la TB (Cuadro 1, núms. 1-6). La ausencia de lesiones visibles en animales reactores no indica incapacidad para la transmisión del bacilo,¹¹ incluso se asocia a infecciones recientes, cuando se ha descrito que la excreción de bacterias podría ser mayor.^{9,17} Se han demostrado lesiones microscópicas y bacilos en superficies mucosas de cavidad nasal, faringe y en tonsilas hasta en 15% de reactores,²⁹ sitios que quizá también constituyen focos primarios de donde se libera la bacteria. En este estudio los animales infectados (reactores) originaron nueve casos nuevos en seis meses y se considera en primer término a los excretores con lesiones en pulmón como fuentes de infección, pero sin descartar al resto.

Para medir la concordancia entre PCR, tuberculina, IFN- γ e histopatología se usó el coeficiente k de Cohen's Kappa (95% IC).³⁰ La concordancia entre los resultados de PCR anidada y las pruebas de tuberculina e IFN- γ fue insuficiente ($k = 0.3$) y buena ($k = 0.4$), respectivamente. Mientras que entre histopatología y PCR anidada fue buena ($k = 0.4$), pero insuficiente ($k < 0.4$) con las pruebas inmunológicas. La concordancia encontrada entre IFN- γ y la presencia de lesiones con la PCR anidada de exudado nasal sugiere influencia de esta citocina en el proceso que conlleva a la excreción bacteriana.³¹⁻³³ El IFN- γ induce necrosis tisular y licuefacción de lesiones encapsuladas (inmunopatología), debido a la activación excesiva de factores derivados de macrófagos, como enzimas proteolíticas, factor de necrosis tumoral- γ , radicales libres de oxígeno y nitrógeno.^{34,35}

En conclusión, mediante un método de PCR anidada se confirmó la excreción vía respiratoria de *M. bovis* en ganado lechero infectado naturalmente y se sugiere la influencia del IFN- γ en este suceso. Estudios posteriores en mayor número de unidades de producción deberán acortar el periodo de la toma de muestras y aumentar la duración total del estudio, tanto para determinar la duración de los periodos de excreción e intermitencia con mayor precisión, como para estudiar los posibles factores desencadenantes, que conllevan a la excreción de *M. bovis*.

Agradecimientos

Se agradece a las autoridades de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM y del rancho Almaraz las facilidades para la realización de este estudio. Se reconoce la ayuda del personal de la CANETB en la aplicación de pruebas de tuberculina y colección de muestras; y a PRONABIVE la donación de PPD y cepas bacterianas. Este trabajo fue financiado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, referencia G34799-B.

- America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet Microbiol* 1994;40: 5-14.
3. Francis J. The incidence of bovine tuberculosis. In: Francis J, editor. *Tuberculosis in animals and man. A study in comparative pathology*. London, UK: Cassell and Company limited, 1958:3-10.
 4. 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.
 5. Neill SD, O'Brien JJ, McCracken RM. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet Rec* 1988;122: 184-186.
 6. Ritacco V, Lopez B, De Kantor IN, Barrera L, Errico F, Nader A. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 1991; 50:365-367.
 7. Neill SD, Hanna J, Mackie DP, Bryson TG. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. *Vet Rec* 1992; 131: 45-47.
 8. Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet Rec* 1988;123: 340-343.
 9. Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *Vet Rec* 1989;124: 269-271.
 10. Estrada-Chávez C. Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de intradermorreacción, interferón- gamma y ELISA, basado en la inspección *post-mortem* (tesis de licenciatura). Cuautitlan Izcalli (Edo. de México) México: FES-Cuautitlán, UNAM, 1995.
 11. Costello E, Doherty ML, Monaghan ML, Quigley FC, O'Reilly PF. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet J* 1998; 155:245-250.
 - Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest* 1996;8:351-354.
 12. Wedlock DN, Aldwell FE, Collins DM, de Lisle GW.
 13. Wilson T, Buddle BM. Immune responses induced in cattle by virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* strains: correlation of delayed-type hypersensitivity with ability of strains to grow in macrophages. *Infect Immun* 1999;67: 2172-2177.
 14. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000;160: 92-106.
 15. 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.
 16. Kell DB, Young M. Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Opin Microbiol* 2000;3: 238-243.
 17. Neill SD, Cassidy J, Hanna J, Mackie DP, Pollok JA, Clements A, *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in skin negative cattle with an assay for interferon-gamma. *Vet Rec* 1994;135: 134-135.
 18. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 1991;27: 187-195.
 19. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995;43:227-240.
 20. Estrada-Chávez C, Díaz OF, Arriaga C, Villegas-Sepúlveda N, Pérez-González R, González SD. Concordancia de PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet Méx* 2004; 35:225-236.
 21. Ryan TJ, Buddle BM, De Lisle GW. An evaluation of the gamma interferon test for detecting bovine tuberculosis in cattle 8 to 28 days after tuberculin skin testing. *Res Vet Sci* 2000;69: 57-61.
 22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Col Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 23. Ron M, Verner N, Feldmesser E, Hochman D, Band M, Shani M. Amplification of the conserved cytochrome b locus as a versatile internal control for PCR analysis in animals. *Biotechniques* 1996;20:604-608.
 24. de Kantor IN, Roswurm JD. *Mycobacteria* isolated from nasal secretions of tuberculin test reactor cattle. *Am J Vet Res* 1978;39: 1233-1234.
 25. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *J Clin Microbiol*. 1998; 36:1050-1055.
 26. Corner LA. *Post-mortem* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994;40: 53-63.
 27. Campuzano GJ. Comparación de diferentes pruebas anatomopatológicas y microbiológicas empleadas en el diagnóstico de la tuberculosis bovina (tesis de maestría). México (DF) México: FMVZ, UNAM, 1998.
 28. Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis (Edinb)* 2001;81: 23-41.
 29. Cassidy JP, Bryson DG, Neill SD. Tonsillar lesions in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec* 1999a; 144: 139-142.
 30. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. London UK: Chapman and Hall, 1991.
 31. Wedlock DN, Vesosky B, Skinner MA, de Lisle GW, Orme IM, Buddle BM. Vaccination of cattle with *Mycobacterium bovis* culture filtrate proteins and interleukin-2 for protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2000;68: 5809-5815.
 32. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, Evans RT, Forster F, Neill SD. Lesions in cattle exposed to *Mycobacterium bovis*-inoculated calves. *J Comp Pathol* 1999;121: 321-337.
 33. Cassidy JP, Bryson DG, Gutierrez Cancela MM, Forster F, Pollock JM, Neill SD. Lymphocyte subtypes in experimentally induced early-stage bovine tuberculous lesions. *J Comp Pathol* 2001;124: 46-51.
 34. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996;64: 683-690.
 35. Dannenberg AM Jr. Immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Hosp Pract (Off Ed)* 1993;28: 51-58.