

COMPARACIÓN DE HISTOPATOLOGÍA, CULTIVO Y PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA

Comparison of Histopathology, Culture and PCR for Diagnosis of Bovine Tuberculosis

Alberto Morales¹, Irma Martínez², Adriana Carlos³, Genoveva Álvarez¹, Mario Álvarez² y Jesús Maldonado⁴

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)

Teléfono y Fax: 01 81 83674487 Ext. 132. E-mail: morales.alberto@inifap.gob.mx. ² Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL),

México. ³ Instituto Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey, México. ⁴ Decanato de Ciencias Veterinarias,

Núcleo "Héctor Ochoa Zuleta", Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Venezuela.

RESUMEN

En México, el diagnóstico de tuberculosis bovina se realiza mediante las pruebas de tuberculina, cultivo e histopatología, pero éstas presentan algunas limitantes de sensibilidad y especificidad. Se evaluó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de tejidos embebidos provenientes de animales sospechosos de tuberculosis, con la finalidad de compararla con las pruebas de histopatología y cultivo microbiológico. La prueba de PCR, a partir de tejidos embebidos en parafina de animales de matanza regular, permitió detectar un 56,0% de muestras positivas a diferencia de la histopatología que detectó un 29,0% y cultivo un 22,0%. El valor de sensibilidad al comparar la PCR con el cultivo fue de 82%, y con respecto a la histopatología fue de 72%. De las muestras negativas a histopatología, la PCR detectó el 45,6% como positivas. De las muestras negativas a cultivo, la PCR detectó un 51,8% como positivas. De las muestras reportadas como sugestivas en histopatología, es decir con granuloma pero sin presencia de patógeno, resultaron positivas por PCR un 60,6% de los casos. Con base en lo anterior, podemos recomendar el uso de la PCR como prueba complementaria a la histopatología con la ventaja de que la PCR identifica bacterias del complejo *M. tuberculosis* donde se incluye a *M. bovis*.

Palabras clave: Tuberculosis, histopatología, bacilos ácido alcohol resistentes, cultivo, *Mycobacterium*, diagnóstico molecular, PCR.

ABSTRACT

In Mexico, diagnosis of the bovine tuberculosis, is conducted by using the tuberculin test, bacteriologic isolation and histo-

pathological analysis. Considering that some diagnosis methods are not sufficiently reliable and specific to detect the presence of the casual agent of this disease, the use of the polymerase chain reaction (PCR) test was evaluated from tissues with lesion caused by possible *Mycobacterium*. PCR allowed to detect the presence of members of the complex *Mycobacterium tuberculosis* in 56% of the cases, compared with 29% obtained histopathological analysis and 22.0% with bacteriologic isolation. The sensibility of PCR compared with histopathological analysis was of 82% and compared with bacteriologic isolation was of 72%. The 45.6% of samples negative by histopathological analysis were positive by PCR. The PCR test is recommended to support the histopathological analysis with the advantage that PCR identified species from *M. tuberculosis* complex where *M. bovis* is included.

Key words: Tuberculosis, histopathology, acid-fast-bacillus, microbiological isolation, *Mycobacterium*, molecular diagnosis, PCR.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades zoonóticas más importantes del país, debido a que provoca cuantiosas pérdidas económicas en la ganadería nacional, además del impacto en la salud pública. Esta enfermedad, en el bovino, es causada principalmente por *Mycobacterium bovis*, perteneciente al complejo *M. tuberculosis* [12]. En México, la tuberculosis limita la movilización, comercialización y/o exportación del ganado, con las consiguientes pérdidas económicas para los productores y el país [11].

En la campaña de control y erradicación de la tuberculosis bovina, el diagnóstico se realiza por medio de la prueba de la tuberculina, el análisis bacteriológico e histopatológico. Un

animal que resulta positivo a la prueba de tuberculina se conoce como reactor [11]. La prueba de tuberculina es relativamente rápida, en comparación al cultivo que dura de 7 a 8 semanas, pero tiene una sensibilidad del 72,0% y presenta reacciones antigénicas cruzadas con bacterias atípicas [7]. El aislamiento del agente etiológico es una prueba confirmatoria, pero el cultivo es un proceso largo, pues se trata de un microorganismo que crece lentamente por lo que se requieren semanas para que las colonias puedan ser observadas [6].

Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han implementado diferentes protocolos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en humanos y animales. Particularmente para el caso de la tuberculosis se han utilizado como blanco para la amplificación, regiones específicas del cromosoma de microorganismos causantes de la patología, entre estas se encuentran las secuencias de inserción IS6110, IS1081, genes que codifican proteínas como la MPB70 y una de 65 kDa [2, 10, 13]. Con base en los reportes anteriores, se plantearon los siguientes objetivos: estandarizar la prueba de PCR para la detección de organismos del complejo *M. tuberculosis* en cepas de referencia y tejidos de bovinos reactivos y no reactivos a la prueba de tuberculina. Y comparar las pruebas de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina a partir de muestras de campo del noreste de México, recibidas en el laboratorio regional del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del estado de Nuevo León, A. C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron cepas de referencia de *M. bovis* AN5 y *M. tuberculosis* H37RV, proporcionadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). Se analizaron 176 bloques de tejidos embebidos en parafina de ganglios pulmonares y tejido pulmonar de bovinos con y sin lesiones características a tuberculosis bovina que habían resultado positivos o negativos al cultivo microbiológico.

Selección de iniciadores, análisis con secuencias reportadas en bancos de genes y simulaciones de PCR.

Se seleccionaron los iniciadores que reconocen la secuencia de inserción IS6110 de especies del complejo *M. tuberculosis*; M1 y M2 y TB294, TB850, TB670 y TB505 [10, 14]. Los últimos 4 iniciadores se utilizan en una PCR anidada. Del Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina/Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica, se obtuvieron las secuencias reportadas para *Mycobacterium* con las que se realizaron las simulaciones de PCR's utilizando el programa computacional Amplify 1,2 [4]. Los iniciadores reportados por Wilson y col. [14] para la PCR anidada, fueron modificados debido a que al incluir los dos pares en reacciones de

PCR, éstos formaron dímeros. Estos iniciadores los llamaremos TB294M, TB850, TB670 y TB 505M.

Extracción del DNA

Para obtener el DNA de los tejidos embebidos en parafina se utilizó el método extracto crudo a partir de 3 cortes de 5 micras descrito por Miller y col. [10]. También, se realizó la extracción del DNA, a partir de 3 cortes de 5 micras de espesor, usando el siguiente protocolo: A los tres cortes realizados en el micrótopo se les agregó 400 µL de solución amortiguadora TE pH 8,0, se calentaron los tubos a 70°C durante 10 min y centrifugaron inmediatamente a 6000 x g durante 1 min. Se eliminó la capa de parafina formada en la parte superior del tubo. Se repitió el calentamiento y centrifugado hasta que no se observó la capa de parafina en la parte superior del tubo. Se agregó 50 µL de Lisozima (5 mg/ml), se mezcló e incubó a 37°C durante 1 h. Posteriormente se agregaron 75 µL de SDS 10% mas 10 µL de proteinasa K (10 mg/ml), se agitaron e incubaron 10 minutos a 65°C. Se agregan 100 µL de NaCl 5M y agitaron. Se agregó a la mezcla 100 µL de CTAB (2% CTAB, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0; 1,4 M NaCl; 1% PVP 40,000) previamente calentado a 65°C. Se mezcló y se incubó nuevamente por 10 minutos a 65°C. Se incubó la mezcla 5 minutos en agua hirviendo para inactivar enzimas. Se agregó 750 µL de SEVAG (Cloroformo:Isoamílico; 24:1), se homogenizó la solución y centrifugó a 10,000 x g durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó 0,6 volúmenes de alcohol isopropílico para precipitar los ácidos nucleicos. Se dejó la mezcla a -20°C durante 30 min. Se sacaron los tubos de -20°C y centrifugaron a 10,000 x g durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de etanol 70% frío y se centrifugó a 10,000 x g durante 5 minutos. Se dejó secar para finalmente disolver el DNA en 20 µL de TE 1X pH 8 y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Reacciones de PCR con muestras de tejidos de bovinos

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL, utilizando 25 pmoles de cada iniciador, 200 µM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos trifosfatados (GIBCO-BRL), 1 mM de MgCl₂, 1X de Buffer *Taq* (200 mM Tris-HCl pH 8,0 y 500 mM KCl) y 2,5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Promega). Las condiciones del termociclador para los iniciadores M1 y M2, fueron: un ciclo 2 min/93°C, seguido de 50 ciclos de dos pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 93°C por 45 seg, alineamiento de iniciadores y extensión a 72°C por 1,25 min con una extensión final de 10 min/72°C. Las condiciones del termociclador para los iniciadores externos TB294M y TB850, fueron: un ciclo 2 min/93 °C, seguido de 35 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 93°C por 45 seg, alineamiento de iniciadores a 65°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min, con una extensión final de 10 min/72°C. Para los iniciadores internos TB670 y TB505M, fueron: un ciclo 2 min/93°C, seguido de 50 ciclos de tres pasos/ciclo siguientes: desnaturalización a 93°C por 45 seg, alinea-

miento de iniciadores a 48°C por 45 seg y una extensión a 72°C por 45 seg, con una extensión final de 10 min/72°C.

Análisis histopatológico y microbiológico

Las muestras de tejidos con lesiones macroscópicas recibidas en el laboratorio, se procesaron para análisis histopatológico y cultivo microbiológico, mediante las metodologías oficiales descritas en la NOM-031-ZOO-15 [11].

Análisis comparativo de pruebas diagnósticas

Se determinó la sensibilidad de la técnica de PCR en comparación con la histopatología y el cultivo, mediante la fórmula descrita por Malorny y col. [8]. El porcentaje de sensibilidad relativa = $100 \times (\text{concordancia de positivos con la prueba de referencia y PCR}) / (\text{concordancia de positivos con la prueba de referencia y PCR}) + (\text{falsos negativos por PCR})$. El porcentaje de especificidad relativa = $100 \times (\text{concordancia de negativos con la prueba de referencia y PCR}) / (\text{concordancia de negativos con la prueba de referencia y PCR}) + (\text{falsos positivos por PCR})$. Para representar los datos de estimación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas de PCR se utilizó la tabla de contingencia descrita por Burkhard y col. [3]. Por conveniencia, referiremos a los cuadrantes de la matriz con dos signos y una letra, donde el primer signo corresponde a la prueba de referencia. El cuadrante (a) es [(+)(+)] y representa el número de muestras con concordancia positiva; el cuadrante (b) es [(-)(+)] y representa falsos negativos por PCR; el cuadrante (c) es [(+)(-)] y representa falsos positivos por PCR y el cuadrante (d) es [(-)(-)] y representa concordancia negativa entre las dos técnicas. Los cuadrantes (a) y (d) de la matriz representan el número de muestras donde hubo coincidencia positiva o negativa en los resultados. De este modo, la especificidad es la relación porcentual entre congruencias negativas y la sumatoria de la concordancia negativa y los falsos positivos $[(d)/(d+c) \times 100]$, también denominada predictibilidad negativa, que es el cociente de concordancia negativa y resultados negativos totales por prueba estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reacciones de PCR con DNA de cepas de referencia de *Mycobacterium*

El PCR anidado con los iniciadores externos generó un fragmento de 583 pb en *M. bovis* (FIG. 1, Carril 1). A partir de esta primera amplificación se realizó una segunda con los iniciadores internos y se observaron dos fragmentos de aproximadamente 200 pb (FIG. 1, Carril 2). La PCR realizada con los iniciadores M1 y M2 generó un fragmento de 123 pb (FIG. 1, Carril 3).

Reacciones de PCR con DNA obtenido de tejido embebido en parafina

Al utilizar tejidos embebidos en parafina y los iniciadores M1 y M2, se generó el fragmento de 123 pb y además se observaron amplificaciones inespecíficas de menor tamaño (FIG. 2).

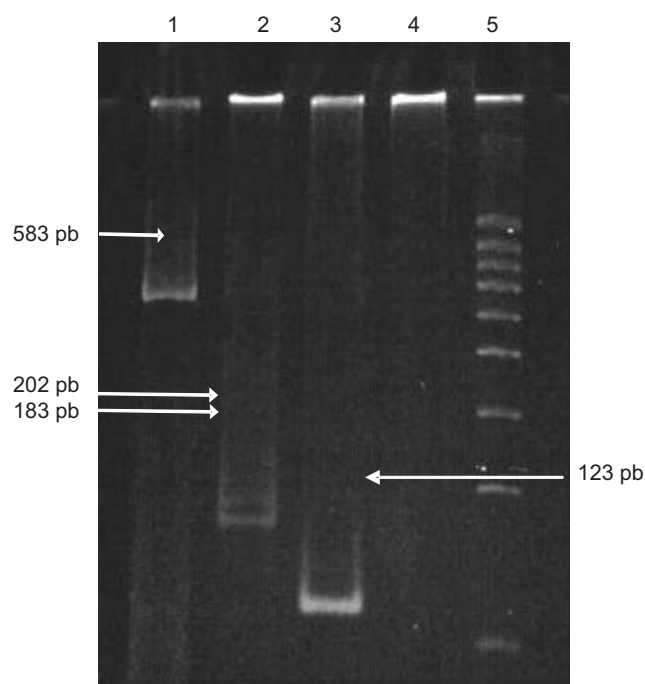


FIGURA 1. AMPLIFICACIONES DE CEPAS DE *Mycobacterium bovis* (AN5). ELECTROFORÉSIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA 10%. CARRIL 1= INICIADORES EXTERNOS TB294M Y TB850. CARRIL 2= INICIADORES INTERNOS TB670 Y TB505. CARRIL 3= INICIADORES M1 Y M2 DE MILLER Y COL., [10]. CARRIL 4= NEGATIVO Y CARRIL 5= MARCADOR LADDER 100. AMPLIFICATION OF *Mycobacterium Boris* STRAINS (AN5). ROW 1= INTERNAL PRIMERS TB670 AND TB505. ROW 3= PRIMERS M1 AND M2 FROM MILLER ET AL. ROW 4= NEGATIVE. CARRIL 5= LADDER'S MARKERS 100.

Cuando se realizó la PCR con los iniciadores externos (TB294M y TB 850), no se observó amplificación, solamente barridos (datos no mostrados) y al utilizar como templado el producto de PCR anterior, con los iniciadores TB670 y TB505M, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 200 pb en las muestras positivas (FIG. 3).

Análisis comparativo de pruebas diagnósticas para tuberculosis

De las 176 muestras evaluadas, 39 fueron positivas por cultivo microbiológico, 51 por histopatología y 99 por PCR para microorganismos del complejo *M. tuberculosis*. La prueba de PCR, a partir de tejidos embebidos en parafina, permitió detectar un 56,2% de muestras positivas a diferencia de la histopatología que detectó un 28,9% y cultivo un 22,1% (TABLA I).

De las muestras negativas a histopatología, la PCR detectó el 45,6% como positivas. De las muestras negativas a cultivo, la PCR detectó un 51,8% como positivas. De las muestras reportadas como sugestivas en histopatología, es decir con granuloma pero sin presencia de patógeno, resultaron positivas por PCR un 60,6% de los casos.

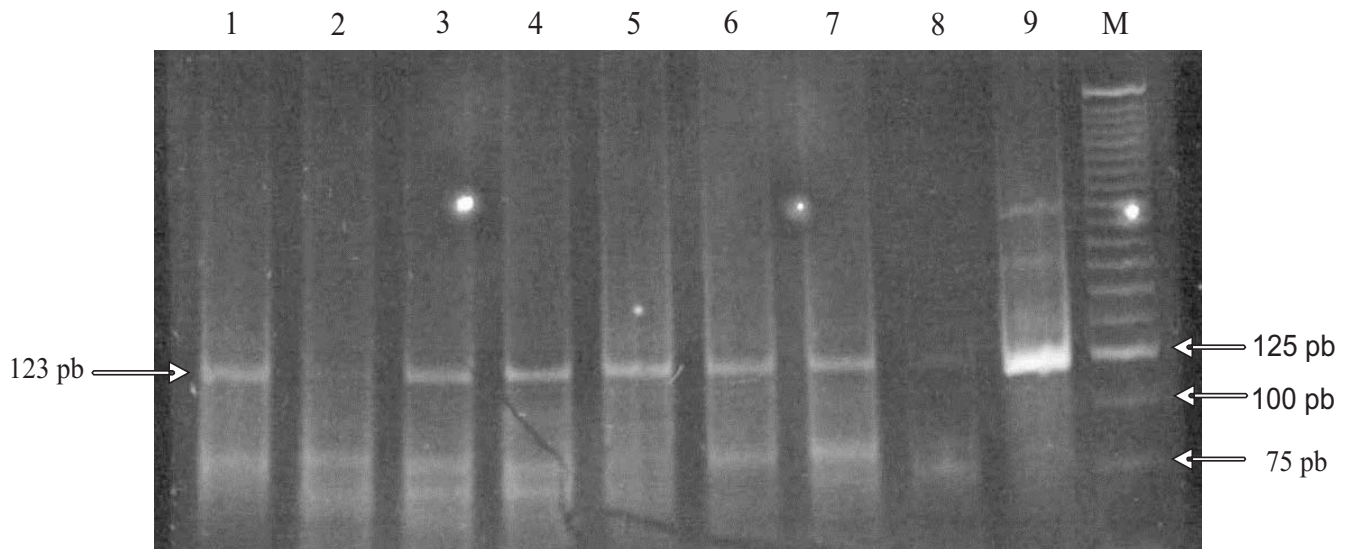


FIGURA 2. AMPLIFICACIONES A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA CON LOS INICIADORES DE MILLER Y COL. [10]. CARRILES 1 AL 8 = AMPLIFICACIONES A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA. CARRIL 9 = AMPLIFICACIÓN A PARTIR DE ADN DE CEPA DE REFERENCIA [AN5] Y M = MARCADOR DE PESO MOLECULAR LADDER 25. AMPLIFICATION OF *Mycobacterium bovis* STRAINS FROM TISSUES EMBEDDED INTO PARAPHINE WITH THE MILLER'S PRIMERS. ROWS 1 TO 8= AMPLIFICATION FROM SAMPLES OF TISSUES EMBEDDED INTO PARAPHINE. ROW 9= AMPLIFICATION FROM DNA [AN5] AND M=MARKER OF MOLECULAR WEIGHT LADDER 25.

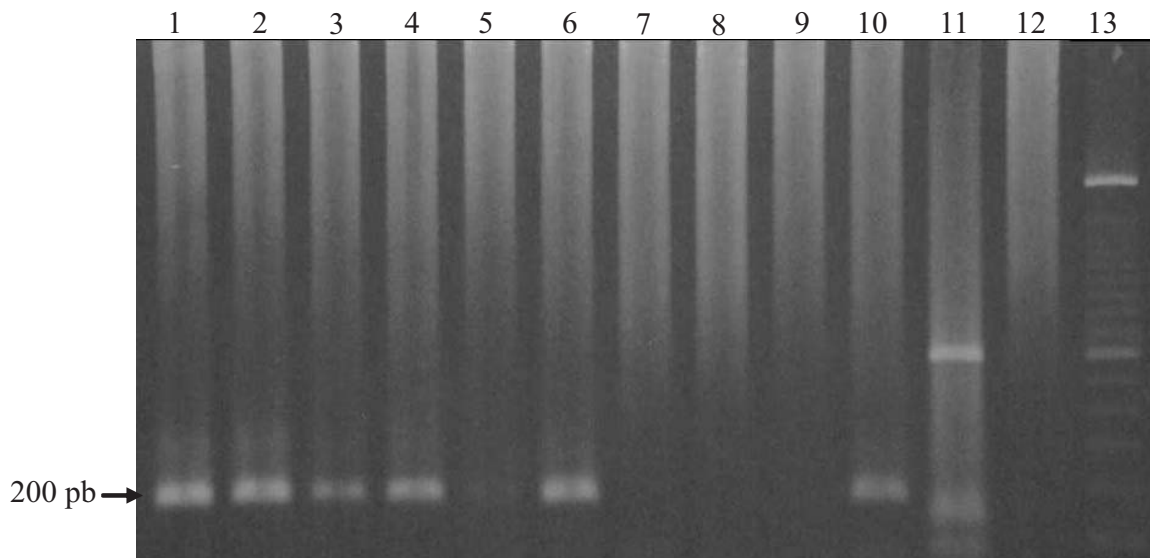


FIGURA 3. AMPLIFICACIONES A PARTIR DE MUESTRAS DE TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA CON LOS INICIADORES INTERNOS MODIFICADOS. CARRILES 1-4, 6 Y 10= MUESTRAS POSITIVAS, CARRILES 5, 7-9 Y 12= MUESTRAS NEGATIVAS. CARRIL 13 = MARCADOR DE PESO MOLECULAR LADDER 100. AMPLIFICATIONS FROM SAMPLES OF TISSUE EMBEDDED INTO PARAPHINE WITH MODIFIED INTERNAL PRIMERS. ROWS 1-4, 6 AND 10= POSITIVE SAMPLES. ROW 5, 7-9 AND 12= NEGATIVE SAMPLES. ROW 13= MARKER OF MOLECULAR WEIGHT LADDER 100.

La sensibilidad de la prueba de PCR (comparada con cultivo) resulta en un valor de 72% (TABLA II) y este valor relativamente bajo es debido a que existieron 11 muestras que resultaron positivas a cultivo microbiológico pero negativas a PCR. Lo anterior, puede ser debido a que no se utilizó la misma porción de la muestra para el cultivo y para la PCR, es decir la PCR se realizó a partir del tejido embebido en parafina.

Existió concordancia positiva de 42 muestras entre histopatología y PCR, sin embargo 9 resultaron positivas a histopatología y negativas a PCR. Por otro lado, 57 fueron positivas a PCR y negativas a histopatología y 68 muestras fueron negativas en ambas técnicas. La sensibilidad es la relación porcentual de concordancia positiva (42) muestras del cuadrante (a) y la sumatoria de el cuadrante (a) y (b). Expresado de otra forma, la sensibilidad es un indicador de predictibilidad positiva (congruencia positiva/total de resultados positivos por prueba estándar) $[(a)/(a+b)] \times 100$.

La sensibilidad de la prueba de PCR (comparada con histopatología) resulta en un valor de 82% (TABLA III). Esto implica que, asumiendo que la prueba de referencia (histopatología) es confiable al 100%, sólo en el 82% de los casos la prueba PCR coincidiría en predicciones positivas.

Este aparentemente bajo valor de sensibilidad es causado por el supuesto alto número de falsos negativos (9 muestras). Los falsos negativos por PCR pueden ser atribuibles a dos razones: I.- falsos positivos en la técnica de histopatología, fundamentalmente por presencia de bacilos ácido alcohol-resistentes no pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En este sentido estudios realizados indican que aun realizando una selección minuciosa de las lesiones típicas a tuberculosis existe un 7% de lesiones que son causadas por organismos no pertenecientes al complejo *M. Tuberculosis*, como lo son *Actinomyces* spp., *Actinobacillus* spp., *Coccidioides immitis* y *Nocardia* spp. [5]. Esto implicaría que el ensayo de PCR es realmente más sensible que la histopatología. II.- fracaso en detección por PCR a partir de los tejidos embebidos en parafina probablemente por fragmentación de ADN originado por el tipo y características de la muestra. Esto ha sido reportado previamente en muestras embebidas en parafina [15], especialmente en aquellas almacenadas por largos tiempos, o por ausencia de la bacteria en la porción específica del corte utilizado.

La especificidad de la prueba de PCR comparada con la histopatología derivada de los datos presentados en la TABLA III, es del 54%. El aparente bajo porcentaje de especificidad observado en PCR se debe al alto número de muestras (57) detectadas como positivas por PCR que mediante histopatología fueron negativas. Esto puede ser atribuido a que para que la histopatología sea positiva se requiere la observación de lesiones características y la presencia de un bacilo ácido-alcohol resistente, en cambio la muestra puede ser positiva por PCR si solamente se encuentra presente el ADN de la bacteria y no la bacteria completa como en el caso de la histopatología.

TABLA I
RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS DETECTADOS POR HISTOPATOLOGÍA, CULTIVO Y PCR DE UN TOTAL DE 176 MUESTRAS ANALIZADAS

Resultado	Prueba		
	Histopatología	Cultivo	PCR
Positivos	51 (28,9%)	39 (22,1%)	99 (56,2%)
Negativos	125 (71,0%)	137 (77,8%)	77 (43,7%)

TABLA II
TABLA DE CONTINGENCIA DE REGULACIÓN DE 2 COLUMNAS POR DOS RENGLONES PARA LA COMPARACIÓN DE PCR Y CULTIVO

PCR	Cultivo	
	Positivos	Negativos
Positivos	a (28)	c (71)
Negativos	b (11)	d (66)

TABLA III
TABLA DE CONTINGENCIA DE REGULACIÓN DE 2 COLUMNAS POR DOS RENGLONES

PCR	Histopatología	
	Positivos	Negativos
Positivos	a (42)	c (57)
Negativos	b (9)	d (68)

La sensibilidad de 82% observada en PCR, supera a la reportado por Liebana y col. [7] quienes encontraron un 71,4% de sensibilidad en muestras de tejido fresco [7] y los valores de 27, 45 y 73% en tejidos embebidos en parafina reportados por Marchetti y col. [9]. Así mismo, el valor que reportamos, está dentro del rango obtenido por otros autores [10] en tejidos de bovinos embebidos en parafina (81 y 83%), en tejidos humanos embebidos en parafina (82%) [1] y en muestras de esputo de humanos [9]. Sin embargo comparando nuestros resultados con los reportados por Miller y col. [10] de 93%, quedan por debajo, debido a que este autor combina dos métodos de extracción de ADN y toma los positivos a PCR de cualquiera de los dos métodos utilizados [10].

CONCLUSIONES

Se observó un 82% de sensibilidad para PCR, al tomar en cuenta las 9 muestras detectadas como positivas a histopatología y negativas a PCR. Esto puede deberse a la presencia de bacilos ácido alcohol-resistentes no pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y que son reportados de manera incorrecta como positivos por histopatología. No obstante, puede

deberse también a la ausencia de ADN en los cortes tomados para PCR.

El ensayo de PCR detectó como positivas el 45,6% de las muestras negativas por la prueba de histopatología y el 60,6% de las reportadas como sugestivas. Debido a esto y a que se tomaron las muestras de la misma fuente (tejido embebido en parafina) se recomienda su uso como prueba complementaria a histopatología.

AGRADECIMIENTOS

Al Sistema de Investigación Regional Alfonso Reyes-CONACyT por el financiamiento mediante el Proyecto 19980060209, Fundación Produce N. L., A. C. mediante el proyecto 08 y al Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del estado de Nuevo León, A.C.

Se agradece la Unión Ganadera Regional de Nuevo León por el apoyo recibido para establecer un laboratorio de biología molecular en el CFPP.

Al apoyo prestado por el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX) ULA, Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBAY, A.; KISA, O.; BAYLAN, O.; DOGANCI, L. The evaluation of FASTPlaqueTB® test for the rapid diagnosis of tuberculosis. **Diagn Microbiol and Infect Dis.** 42: 211-215 2003.
- [2] BIGI, F.; ESPITIA, C.; ALITO, A. A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. **Microbiol.** 143: 3599-3605. 1997.
- [3] BURKHARD, M.; JOORFAR, J.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of *Salmonella* PCR: towards an International Standard. **Appl and Environ Microbiol.** 69: 290-296. 2002.
- [4] ENGELS, W. **Amplify version 1.2B. Amplify for analyzing PCR experiments.** University of Wisconsin, Genetics Madison, Macintosh Software. WI 53706. 1992.
- [5] GONZALEZ, L.; GUTIERREZ, B.; ARANAZ, A. M.; LIÉBANA, E.; DOMÍNGUEZ, R. Comparison of different methods for diagnosis of bovine tuberculosis from tuberculin-or interferon-gamma-reacting cattle in Spain. **J Appl Microbiol.** 87: 465-471. 1999.
- [6] KINGSBURY, D.; WAGNER, E., **Microbiology.** 2nd Edition. The National Medical Series for Independent Study. Harwal Pub. Co. New York. 1-436pp. 1990.
- [7] LIÉBANA, E.; ARANAZ, A.; MATEOS, A.; VILLAFRANCIA, M.; GOMEZ-MAMPASO, E.; TERCERO, J.; ALEMANY, J.; SUAREZ, G.; DOMINGO, M.; DOMINGUEZ, L. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organisms in Bovine Tissue Samples by PCR. **J Clin Microbiol.** 33: 33-36. 1994.
- [8] MALORNY, B.; HOORFAR, J.; HUGAS, M.; HEUVELINK, A.; FACH, P.; ELLERBROEK, L.; BUNGE, C.; DORN, C.; HELMUTH, R. Interlaboratory diagnostic accuracy of *Salmonella* specific PCR-based method. **Internat J Food Microbiol.** 89: 241-249. 2003.
- [9] MARCHETTI, G.; GORI, A.; CATOZZI, L.; VAGO, L.; NEBULONI, M.; ROSSI, M.; ESPOSTI, A.; BANDERA, A.; FRANZETTI, F. Evaluation of PCR in Detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues: Comparison of Four Amplification Assays. **J Clin Microbiol.** 36: 1512-1517. 1998.
- [10] MILLER, J.; JENNY, A.; RHYAN, J.; SAARI, D.; SUAREZ, D. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. **J Vet Diagn Invest.** 9: 244-249. 1997.
- [11] NORMA OFICIAL MEXICANA - NOM-031-ZOO-96. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina [*Mycobacterium bovis*]. **Diario Oficial de la Federación.** DX 6: 35. 1996.
- [12] O'REILLY, L.; DABORN, C. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. **Tuber Lung Dis.** 76: 1-46. 1995.
- [13] TALBOT, E.; WILLIAMS, D.; FROTHINGHAM, R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. **J Clin Microbiol.** 35: 566-569. 1997.
- [14] WILSON, S.; MC.NERNEY, R.; NYE, P.; GODFREY-FAUSSETT, P.; STOKER, N.; VOLLER, A. Progress toward a simplified polymerase chain reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. **J Clin Microbiol.** 31: 776-782. 1993.
- [15] WRIGTH, D.; MANOS, M.; MICHAEL, A.; INNIS, D.; GELFAND, J.; SNINSKY, J.; WHITE, T. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, New York. 153-158. 1990.