



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
POSGRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y  
DE LOS ALIMENTOS**

## **TESIS**

**PREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS Y RUMIANTES  
SILVESTRES EN SIERRA FRIA, AGUASCALIENTES, MÉXICO**

QUE PRESENTA

**MVZ, M. en M.A.R.N. LUIS FERNANDO CISNEROS GUZMÁN**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y  
DE LOS ALIMENTOS**

### **COMITÉ TUTORAL**

**Dr. Arturo Valdivia Flores (Tutor)**

**Dr. Efrén Díaz Aparicio**

**Dr. Carlos R. Cruz Vázquez**

**Dr. Raúl Ortiz Martínez**

**Dr. Efraín Islas Ojeda**

AGUASCALIENTES, AGS., MÉXICO, JUNIO DEL 2011.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
POSGRADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y  
DE LOS ALIMENTOS  
ÁREA: SALUD ANIMAL

**PREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS Y RUMIANTES  
SILVESTRES EN SIERRA FRIA AGUASCALIENTES, MÉXICO**

**MVZ, M. en M. A. R. N. LUIS FERNANDO CISNEROS GUZMÁN**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y  
DE LOS ALIMENTOS**

*“El presente documento fue revisado, presentado, defendido y aprobado en  
el examen de grado correspondiente”.*

COMITÉ REVISOR

Tutor ARTURO VALDIVIA FLORES

\_\_\_\_\_

Asesor DR. EFREN DIAZ APARICIO

\_\_\_\_\_

Asesor DR. CARLOS R. CRUZ VAZQUEZ

\_\_\_\_\_

Asesor DR. RAÚL ORTIZ MARTINEZ

\_\_\_\_\_

Asesor DR. EFRAÍN ISLAS OJEDA

\_\_\_\_\_

**DEDICATORIA**

*"A mi Madre y Padre,*

*...por enseñarme el amor al trabajo y el estudio.*

*"A Luz María, María Fernanda, Fernando y Diego...*

*...por hacer más perfecto aquello en que creo.*

*"A mis hermanos Salvador y Leticia,*

*...por su fraternidad.*

*"A mis profesores de la Universidad Autónoma de Aguascalientes,*

*...por su ejemplo de profesionalidad que nunca he olvidado.*

*"A Nancy, Daniel, Bryan, Erick y John (Harp's Hunting Lodge)...*

*...por contribuir a mi empeño.*

*"A mi tutor,*

*...por su guía y tiempo que no se paga con nada.*

*"Al Dr. Armando Martínez*

*...quien indirectamente, me hacia redoblar esfuerzos para esta tesis.*

*"Al Dr. Kenneth Waldrup,*

*...For their unconditional support to the project.*

*"Y a todos los Venados y Fauna Silvestre de la sierra que me producen insomnio y fascinación".*

**RECONOCIMIENTOS**

**Por su apoyo financiero:**

**-Fundación Produce Aguascalientes A.C. Proyecto Sanidad de Rumiantes y Guajolotes Silvestres de Sierra Fría Aguascalientes, México (No. 19 01-2008-1343).**

**-Unión Ganadera General Hidrocálida de Aguascalientes.**

**-Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuario de Aguascalientes S.C.**

**Por su apoyo técnico:**

**-Delegación Federal de la SEMARNAT Aguascalientes, en especial, al Departamento de Recursos Naturales y Vida Silvestre.**

**-Centro de Diagnóstico Integrado y de Investigaciones en Salud Animal del Estado de Chihuahua.**

**-ANGADI Delegación Aguascalientes.**

**-Harp's Hunting Lodge, Minnesota, USA.**

**-Kunnari Country Meats, Eveleth, Minnesota.**

**-Texas Department of State Health Services, Zoonosis Control, El Paso, Texas.**

**Por su colaboración técnica especialmente al cuerpo tutorial:**

**Dr. Arturo Valdivia Flores (Tutor)**

**Dr. Efrén Díaz Aparicio**

**Dr. Carlos R. Cruz Vázquez**

**Dr. Raúl Ortiz Martínez**

**Dr. Efraín Islas Ojeda**

VOTOS APROBATORIOS



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES  
CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

OF. NO. CCA-D-111500-165-11

LIC. FRANCISCO JAVIER AVELAR GONZÁLEZ  
SECRETARIO GENERAL DE LA U.A.A.  
P R E S E N T E .

AT'N: C.P. MARIA ESTHER RANGEL JIMÉNEZ  
JEFA DEL DEPTO. DE CONTROL ESCOLAR

Por medio de la presente me permito informarle a Usted, que el C. LUIS FERNANDO CISNEROS GUZMÁN, alumno del Programa del Posgrado en Ciencia y Tecnología Agrícolas, Pecuarias y de los Alimentos en nivel doctorado, ha cumplido de manera satisfactoria los requisitos académicos del programa y ha recibido la aprobación explícita de su tesis titulada "PREVALENCIA DE Mycobacterium bovis EN BOVINOS Y RUMIANTES SILVESTRES EN SIERRA FRIA, AGUASCALIENTES, MÉXICO"

Lo anterior es a fin de que el M.C. Luis Fernando Cisneros Guzmán pueda proseguir en los trámites correspondientes pertinentes a la obtención del grado académico respectivo.

Agradeciendo de antemano su atención al presente, me despido de usted, enviándole un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Jesús María, Ags., 1 de Junio de 2011.

"SE LUMEN PROFERRE"

M, en C. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

c.c.p. Secretario de Investigación y Posgrado  
c.c.p. Archivo  
GEP/aba





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**MC. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN**  
**Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias de la**  
**Universidad Autónoma de Aguascalientes**

**Estimado maestro Pallás:**

Con base en el capítulo XVI del Reglamento General de Docencia de la UAA, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta el MC Luis Fernando Cisneros Guzmán, intitulado "PREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS Y RUMIANTES SILVESTRES EN SIERRA FRIA, AGUASCALIENTES, MÉXICO", como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y DE LOS ALIMENTOS, a partir de lo cual considero que el trabajo cumple con los requisitos para ser presentado y discutido en el examen de grado correspondiente.

Por lo anteriormente expuesto, le otorgo mi VOTO APROBATORIO para dicha tesis, con el objetivo de que el maestro Cisneros pueda continuar con los trámites correspondientes

Se extiende el presente para los trámites administrativos necesarios para el interesado.

"SE LUMEN PROFERRE"

Jesús María, Aguascalientes a 26 de mayo de 2011

  
**DR. ARTURO VALDIVIA FLORES**  
**PROFESOR INVESTIGADOR**  
**Tutor del alumno**

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

**MC. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN**  
**Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias de la**  
**Universidad Autónoma de Aguascalientes**

**Estimado maestro Pallás:**

Con base en el capítulo XVI del Reglamento General de Docencia de la UAA, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta el MC Luis Fernando Cisneros Guzmán, intitulado "PREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS Y RUMIANTES SILVESTRES EN SIERRA FRIA, AGUASCALIENTES, MÉXICO", como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y DE LOS ALIMENTOS, a partir de lo cual considero que el trabajo cumple con los requisitos para ser presentado y discutido en el examen de grado correspondiente.

Por lo anteriormente expuesto, le otorgo mi VOTO APROBATORIO para dicha tesis, con el objetivo de que el maestro Cisneros pueda continuar con los trámites correspondientes

Se extiende el presente para los trámites administrativos necesarios para el interesado.

*"SE LUMEN PROFERRE"*

Jesús María, Aguascalientes a 26 de mayo de 2011

**DR. RAÚL ORTIZ MARTINEZ**  
**PROFESOR INVESTIGADOR**

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**MC. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN**  
**Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias de la**  
**Universidad Autónoma de Aguascalientes**

**Estimado maestro Pallás:**

Con base en el capítulo XVI del Reglamento General de Docencia de la UAA, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta el MC Luis Fernando Cisneros Guzmán, intitulado "PREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS Y RUMIANTES SILVESTRES EN SIERRA FRIA, AGUASCALIENTES, MÉXICO", como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y DE LOS ALIMENTOS, a partir de lo cual considero que el trabajo cumple con los requisitos para ser presentado y discutido en el examen de grado correspondiente.

Por lo anteriormente expuesto, le otorgo mi VOTO APROBATORIO para dicha tesis, con el objetivo de que el maestro Cisneros pueda continuar con los trámites correspondientes

Se extiende el presente para los trámites administrativos necesarios para el interesado.

"SE LUMEN PROFERRE"

Jesús María, Aguascalientes a 26 de mayo de 2011

**DR. EFRAÍN ISLAS OJEDA**  
**PROFESOR INVESTIGADOR**

c.c.p. Archivo

**MC. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN**  
**Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias de la**  
**Universidad Autónoma de Aguascalientes**

**Estimado maestro Pallás:**

Con base en el capítulo XVI del Reglamento General de Docencia de la UAA, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta el MC Luis Fernando Cisneros Guzmán, intitulado "PREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS Y RUMIANTES SILVESTRES EN SIERRA FRIA, AGUASCALIENTES, MÉXICO", como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y DE LOS ALIMENTOS, a partir de lo cual considero que el trabajo cumple con los requisitos para ser presentado y discutido en el examen de grado correspondiente.

Por lo anteriormente expuesto, le otorgo mi VOTO APROBATORIO para dicha tesis, con el objetivo de que el maestro Cisneros pueda continuar con los trámites correspondientes

Se extiende el presente para los trámites administrativos necesarios para el interesado.

*"SE LUMEN PROFERRE"*

Jesús María, Aguascalientes a 26 de mayo de 2011

  
**EFREN DÍAZ APARICIO**  
**INVESTIGADOR**  
**Comité tutorial del alumno**

c.c.p. Archivo

El Llano, Ags., a 26 de mayo de 2011

**MC. GABRIEL ERNESTO PALLÁS GUZMÁN**  
**Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias de la**  
**Universidad Autónoma de Aguascalientes**

**Presente**

Con base en el capítulo XVI del Reglamento General de Docencia de la UAA, le comunico que he revisado el trabajo de tesis que presenta el MC Luis Fernando Cisneros Guzmán, intitulado "PREVALENCIA DE *Mycobacterium bovis* EN BOVINOS Y RUMIANTES SILVESTRES EN SIERRA FRIA, AGUASCALIENTES, MÉXICO", como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y DE LOS ALIMENTOS, a partir de lo cual considero que el trabajo cumple con los requisitos para ser presentado y discutido en el examen de grado correspondiente.

Por lo anteriormente expuesto, le otorgo mi VOTO APROBATORIO para dicha tesis, con el objetivo de que el Maestro Cisneros pueda continuar con los trámites correspondientes

**Atentamente**



**Dr. Carlos Ricardo Cruz Vázquez**  
**Miembro de Comité Tutorial**

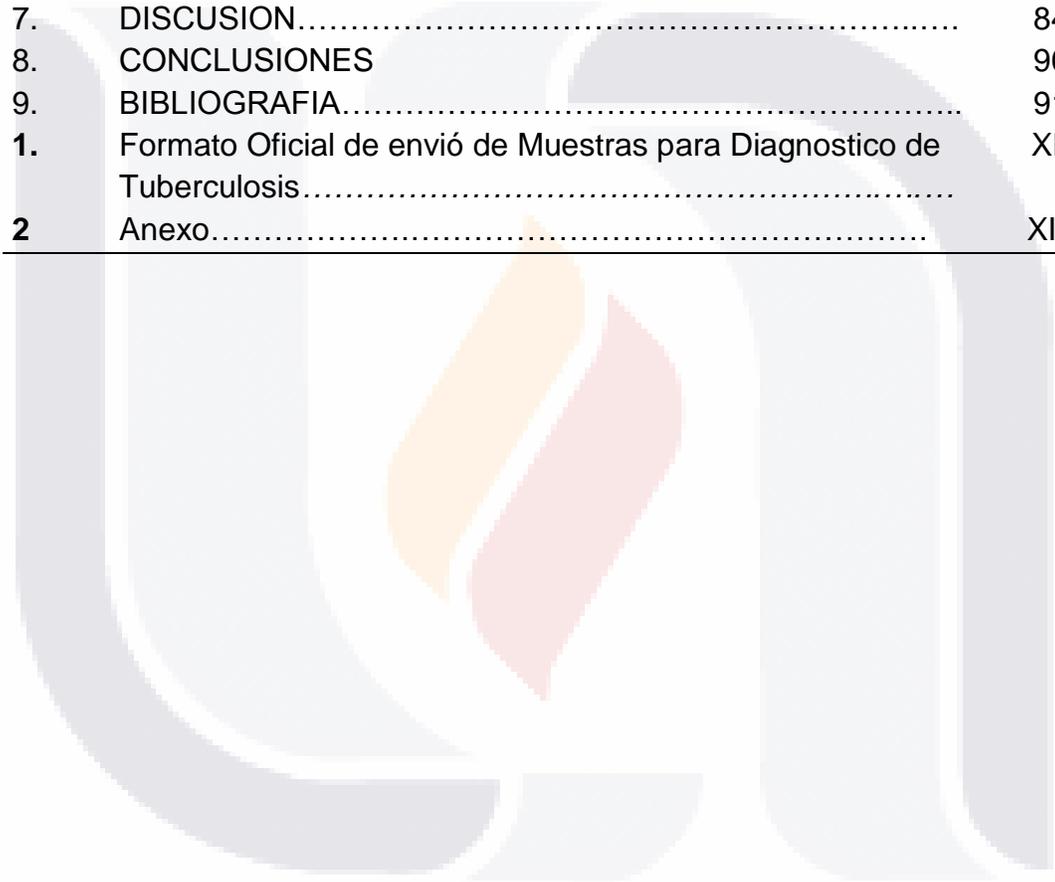
c.c.p. Archivo

**ÍNDICE GENERAL**

No.	CONTENIDO	Página
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
2.1.	LA TUBERCULOSIS BOVINA.....	3
2.1.1	ETIOLOGIA.....	3
2.1.2	FUENTES DE INFECCION Y MODO DE TRANSMISION....	3
2.1.3	ESPECIES SUCEPTIBLES A LA INFECCION CON <i>Mycobacterum bovis</i> .....	4
2.1.4	PATOGENIA.....	6
2.1.5	SIGNOS CLINICOS.....	19
2.1.6	RESPUESTA INMUNOLOGICA.....	19
2.1.7	EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.2.	LA GANADERIA BOVINA.....	26
2.2.1	IMPORTANCIA ECONOMICA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA.....	30
2.2.2	SITUACIÓN EPIZOOTIOLÓGICA DE TUBERCULOSIS EN EL ÁREA DE ESTUDIO .....	32
2.3.	LOS RUMIANTES SILVESTRES EN AGUASCALIENTES...	35
2.3.1	CARACTERISTICAS DEL GANADO COLA BLANCA.....	39
2.3.2	OTRAS SUBESPECIES MEXICANAS DE VENADO COLA BLANCA.....	40
2.3.3	ETOLOGIA DE LOS RUMANTES SILVESTRES Y RELACION CON LA EPIDEMIOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS.....	45
2.3.4	IMPLICACIONES DE LA TUBERCULOSIS EN RUMIANTES SILVESTRES.....	49
3.	OBJETIVOS.....	56
4.	HIPOTESIS.....	57
5.	MATERIALES Y METODOS.....	58
5.1.	AREA DE ESTUDIO.....	58
5.2.	POBLACIONES EN ESTUDIO.....	60
5.2.1	BOVINOS.....	60
5.2.2	PRUEBAS DE CAMPO.....	60
5.2.3	TOMA DE MUESTRAS POST- MORTEM DE GANADO Y SU FORMA DE ENVIO.....	61
5.2.4	PROCESO DE HISTOPATOLOGIA, BACTERIOLOGIA Y PCR .....	62
5.2.5	RUMIANTES SILVESTRES.....	64

5.2.6	DETERMINACIÓN DE LA EDAD EN LOS RUMIANTES SILVESTRES.....	65
5.2.7	CONDICIÓN CORPORAL.....	67
5.2.8	PROCEDIMIENTO DE NECROPSIAS EN RUMIANTES SILVESTRES.....	67
5.2.9	TEJIDOS SELECCIONADOS.....	70
5.2.10	CONTROL DE CALIDAD DE LAS MUESTRAS COLECTADAS.....	72
5.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
6	RESULTADOS.....	75
7.	DISCUSION.....	84
8.	CONCLUSIONES	90
9.	BIBLIOGRAFIA.....	91
1.	Formato Oficial de envío de Muestras para Diagnostico de Tuberculosis.....	XII
2	Anexo.....	XIII

---



**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>No.</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
1.	<i>Tipos de fauna silvestre detectadas con Mycobacterium bovis.....</i>	6
2.	<i>Plantas de sacrificio de ganado bovino en el Estado de Aguascalientes.....</i>	35
3.	<i>Subespecies de venado cola blanca y situación actual en México.....</i>	43
4.	<i>Permisos de caza mayor otorgados en el estado de Ags. Para las temporadas 2006-07 y 2007-08.....</i>	65
5.	<i>Criterios para calcular la edad en el venado cola blanca.....</i>	65
6.	<i>Descripción de las características de condición corporal por observación de zonas corporales claves.....</i>	67
7.	<i>Bovinos y rumiantes silvestres evaluados para detectar Mycobacterium Bovis.....</i>	75
8.	<i>Bovinos probados (Prueba de pliegue caudal) para detectar Tb por municipio en zona A del estado de Aguascalientes, barrido 2006-2007. ....</i>	76
9.	<i>Resultados de las pruebas de campo para detectar Mycobacterium spp. En el ganado bovino del ANPSF.....</i>	76
10.	<i>Características principales de las UMA's monitoreadas para evaluar la interacción de las especies (Datos recopilados de las acuestas).....</i>	78
11	<i>Clasificación de las muestras por tipo de nódulo linfático afectado tanto de rumiantes silvestres como de ganado.....</i>	79
12	<i>Especie, sexo y edad de el ganado y rumiantes silvestres diagnosticados por histopatología de muestras de nódulo linfático.....</i>	80
13	<i>Hallazgos histopatológicos en ganado y rumiantes silvestres diagnosticados para tuberculosis provenientes de ANPSF...</i>	81

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>No.</b>	<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
1.	<i>Puntos de verificación zoonosanitaria interestatales (Dividen zona A y B) y estatales de Aguascalientes operados por el CEFOPPA.....</i>	34
2.	<i>Número de cabezas por municipio del estado de Aguascalientes zona A división epidemiológica del CEFOPPA.(INEGI, 2009).....</i>	35
3.	<i>Localización geográfica del área natural protegida “Sierra Fría” Aguascalientes.....</i>	37
4.	<i>Relación entre el crecimiento de las astas, volumen testicular y testosterona sérica del macho y estado reproductivo de la hembra del venado cola blanca.....</i>	48
5.	<i>Area Natural Protegida de la Sierra Fría y Zona “A” (Baja prevalencia de TB) de Aguascalientes,Mexico.....</i>	58
6.	<i>Esquema de procedimiento de necropsia en ungulados silvestres. Fuente(OIE,1996).....</i>	70
7.	<i>Mapa del área Natural Protegida de Sierra Fría Aguascalientes, que muestra la zona “A” (baja prevalencia), zona “B” (alta prevalencia), los sitios de muestreo de rumiantes silvestres (cuadros) en las Unidades Medio-ambientales y los sitios con ganado infectado detectado (+) en 2006/2007.....</i>	77
8.	<i>Ejemplo de instalación utilizada para la alimentación de rumiantes silvestres en el área Natural Protegida de Sierra Fría Aguascalientes, en los sitios interfase de rumiantes silvestres-ganado para evitar el contacto y posible contagio por medio del alimento.....</i>	79
9.	<i>Ejemplo de lesiones macroscópicas tanto en bovinos (B, muestra rastro FREASA) y rumiantes silvestres (A, Venado Cola Blanca, del ANPSF) que necesitaron diagnostico histopatológico y cultivo.....</i>	81
10.	<i>Diagnostico diferencial de TB. Panel A: Actinomicosis, neutrofilos, macrófagos y células epitelioides (Actinobacillus lignieresii). Panel B: Piogranuloma, neutrofilos y macrófagos. Panel C y D: Diagnóstico compatible con Tuberculosis bovina por tinción de Zhiehl Neelsen.....</i>	82

**LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS**

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>		
ADN	Acido Desoxirribonucleico	OIE	Organización mundial de Salud Animal
ANGADI	Asociación Nacional de Ganaderos Diversificados Criadores de Fauna	PA	Prevalencia Aparente
ANPSF	Área Natural Protegida Sierra Fría	PCC	Prueba Cervical Comparativa
ASERCA	Apoyos y Servicios a la comercialización Agropecuaria.	PPC	Prueba de Pliegue Caudal
CEFOPPA	Comité Estatal para el fomento y protección pecuaria del Estado de Aguascalientes.	PPD	Derivado Proteico Purificado
cm	Centímetro	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
DGSA	Dirección de campañas zoonositarias	PMNs	Polimorfonucleares
DGVS	Dirección General de Vida Silvestre	PR	Prevalencia real
EEB	Encefalopatía Espongiforme Bovina	SAG	Secretaría de Agricultura y Ganadería
Ep	Especificidad	SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación.
g	Gramo	SARH	Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos
°C	Grados centígrados	Se	Sensibilidad
HE	Hematoxilina-eosina	SEMA	Secretaría del Medio Ambiente Recursos, Naturales y Pesca
HMC	Histopatología y cultivo de Micobacterias	RNAP	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
HTR	Hipersensibilidad de tipo Retardado.	SEMA	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
IA	Inseminación artificial	RNAT	Naturales
IgG	Inmunoglobulinas	SENAS	Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y calidad Agroalimentaria.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.	ICA	Universidad Autónoma de Aguascalientes
IV	Intravenosa	UAA	Unidad para el Manejo y Conservación de la Vida Silvestre
kg	Kilogramo	UMA	Ziehl-Neelsen
km	Kilómetro		
L	Litro		
Long	Longitud		
mg/kg	Miligramos por Kilogramo		
µm	Micra o micrómetro		
NL	Linfonodulos		
No.	Número		

## RESUMEN

El agente causal de la tuberculosis bovina, *Mycobacterium bovis*, se encuentra ampliamente distribuido en el ganado doméstico en México y puede extenderse a las poblaciones silvestres. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de la infección por *M. bovis* en bovinos y rumiantes silvestres en el Área Natural Protegida de Sierra Fría (ANPSF) del estado de Aguascalientes, México. Durante 2006 y 2007, 24,400 bovinos que comprende 793 hatos fueron monitoreados con la prueba de pliegue caudal (PPC) y la prueba cervical comparativa (PCC). La inspección post mortem de las lesiones macroscópicas, histopatología y cultivo de micobacterias (HMC) se realizaron en 17,351 cabezas de ganado sacrificadas y 92 rumiantes silvestres recolectados por los cazadores con licencia. Los rumiantes silvestres muestreados fueron 60 venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*), 20 de ciervos rojo (*Cervus elaphus*) y 12 Elk (*Cervus elaphus canadensis*). En el ganado doméstico, 191 fueron positivos a PPC, diez fueron positivas a PCC y 23 fueron positivos HMC en muestras tomadas en rastros. Cultivos de por lo menos cada hato con bovinos HMC positivos fueron confirmados, presumiblemente de *M. bovis* en el Laboratorio de Nacional de Servicios Veterinarios en Ames, Iowa, U.S.A. En los rumiantes silvestres, no HMC o lesiones compatibles se encontraron. La prevalencia real de *M. bovis* en ganado doméstico se calculó en 0.50% (95% intervalo de confianza: 0.00 - 0.79) y 0.00% para los rumiantes silvestres. Estos hallazgos sugieren que los rumiantes silvestres no son un reservorio de la infección por tuberculosis bovina en el ganado doméstico en Aguascalientes, México, aunque las actividades de vigilancia deben continuar y consolidarse.

**Palabras clave:** *Mycobacterium bovis*, *Odocoileus virginianus*, Histopatología, Epizootiología, Sierra Fria.

## ABSTRACT

The casual agent of bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, is widely distributed in domestic cattle in Mexico and may spread to wildlife populations. The objective of this study was to determine the prevalence of *M. bovis* infection in cattle and wild ruminants in the Sierra Fria Protected Natural Area (SFPNA) in the state of Aguascalientes, Mexico. During 2006 and 2007, 24,400 cattle comprising 793 herds were tested with the intradermal tuberculin caudal fold test (CFT) and the comparative cervical test (CCT). Postmortem inspection for gross lesions, histopathology and micobacterial culture (HMC) were performed on 17,351 commercially slaughtered cattle and 92 wild ruminants harvested by licensed hunters. The harvested animals comprised 60 white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), 20 red deer (*Cervus elaphus*) and 12 North American elk (*Cervus elaphus canadensis*). In domestic cattle, 191 were CFT positive, 10 were CCT positive and 23 were HMC positive samples from slaughter plants. Cultures from 7 HMC positive cattle herds were presumably confirmed positive for *M. bovis* at the National veterinary Services Laboratory in Ames, Iowa USA. In wild ruminants, no HMC or lesions compatible were found. The real prevalence of *M. bovis* in domestic cattle was calculated at 0.58% (95% confidence interval: 0.00 - 0.79) and 0.00% for wild ruminants. These findings suggest that wild ruminants are not a reservoir for bTB infection in domestic cattle in Aguascalientes, Mexico, though surveillance activities must be continued.

**Key words:** *Mycobacterium bovis*, *Odocoileus virginianus*, Histopatologia, Epizootologia, Sierra Fria.

## 1. INTRODUCCION

---

La tuberculosis en los seres humanos puede ser causada por *Mycobacterium tuberculosis*, todavía existe el riesgo de contraer la enfermedad del agente etiológico que causa la tuberculosis en el ganado bovino, *M. Bovis* (Cosivi *et al.*, 1998). Muchas poblaciones de vida silvestre de todo el mundo han sido infectadas con este agente patógeno (Schmitt *et al.*, 1997). Sin embargo, la presión para supervisar y gestionar la tuberculosis en fauna silvestre está aumentando como resultado de la preocupación por la salud de las poblaciones de animales silvestres infectados y porque los riesgos de estas poblaciones suponen para los animales domésticos y para los seres humanos. La vida silvestre como corzos (*Capreolus capreolus*) fueron identificados como posibles reservorios de la tuberculosis bovina en Alemania en 1938 y Suiza en 1961 y 1964, donde se cree que han aumentado la infección de animales y, posiblemente, tejones (*Meles meles*) con la enfermedad (Bouvier, 1963), (Bishofburger & Nabhdly, 1964). La tuberculosis bovina se estableció en venados cola blanca silvestres (*Odocoileus virginianus*) en el noreste de Michigan, y se han implicado continuamente para infectar a los rebaños de ganado. La tuberculosis bovina se transmite entre los animales a través de aerosoles, saliva y secreciones nasales (Clifton-Hadley & Wilesmith, 1991). La alimentación artificial de los lugares en el noreste de Michigan (Palmer *et al.*, 2004) puede agravar la situación por concentrar venados, con el consiguiente aumento potencial de animales infectados para interactuar con otros y contaminar los sitios de alimentación.

Se ha conocido durante casi 20 años que lesiones tuberculosas en bovinos infectados no siempre son visibles y la infección sólo puede ser confirmada con pruebas bacteriológicas de muestra de tejido (Mcilroy *et al.*, 1986). Lo mismo es cierto en el caso de los ciervos y otros animales salvajes. En Francia, la tuberculosis bovina ha sido diagnosticada a partir de jabalís y de ciervos rojos silvestres; muy pocos animales de vida silvestre infectados mostraron signos visibles de la infección incluso en los ganglios linfáticos, fue sólo por el aislamiento que se confirmó la infección.

El agente causal de la tuberculosis bovina se encuentra ampliamente distribuido en México. En este momento la Dirección de Campanas Zoosanitarias (DGSA) del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y calidad Agroalimentaria (SENASICA) considera a la zona "A" del estado de Aguascalientes en fase de erradicación, el estado se ha dividido en dos zonas dependiendo la prevalencia de la tuberculosis en el ganado bovino, uno de baja prevalencia (zona "A") y de una alta prevalencia (zona "B"). En zona de baja prevalencia, encontramos "Sierra Fría" de Aguascalientes donde una importante población de especies silvestres y ciervos en cautividad viven. Villalobos 1998, indica que la estructura de la población de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus couesi*) está formada en la zona de interfase vida silvestre/ganadería denominada "Sierra Fría" por 2,690 venados cola blanca, de los cuales tal vez 896 venados son machos y 1,794 son hembras; con una estimación de 350 cervatos nacidos al año con una supervivencia media del 45%. Reconociendo el potencial riesgo del desconocimiento de la situación epizootológica de la fauna para el ganado y las personas que cohabitan la zona (Toward *et al.*, 1965), la campaña de erradicación de Tuberculosis bovina encabezada operativamente por el "Comité Estatal para el Fomento y Protección pecuaria de Aguascalientes, S.C." (CEFOPPA) y con el apoyo de la Fundación Produce Aguascalientes A.C. se inició una amplia cooperación de vigilancia y muestreo en la zona de interfase vida silvestre/ganadería donde se lleva a cabo caza legal en las "Unidades para la Conservación de Vida Silvestre" (UMA's). Una zona de interfase vida silvestre/ganadería es un lugar donde los animales domésticos y otros animales silvestres coexisten y acceden de manera común a los recursos naturales (Bengis *et al.*, 2002).

En este estudio se propone calcular la prevalencia real de la Tuberculosis en el ganado del área de estudio, así como identificar el agente causal en muestras sugestivas obtenidas en el examen post mortem en plantas de sacrificio y UMA's del estado de Aguascalientes mediante pruebas de histopatología y bacteriología, además de comparar los hallazgos tanto macroscópicos y microscópicos de las muestras obtenidas de los dos grupos de estudio.

## 2. ANTECEDENTES

---

### 2.1. LA TUBERCULOSIS BOVINA

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por bacterias patógenas de género *Mycobacterium*. Está caracterizada por la formación de granulomas llamados tubérculos, y por lo general es una enfermedad crónica debilitante y en rara ocasión toma un curso agudo.

Es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, bacilos aeróbicos, intracelulares y, excepcionalmente, por *M. bovis* y otras micobacterias atípicas.

Se caracteriza fundamentalmente por la formación de granulomas en los tejidos.

Aunque se trata principalmente de una enfermedad pulmonar, afecta también a otros órganos y tejidos. Puede ser mortal si el paciente no recibe el tratamiento adecuado (Fujiwara P.I., 2001).

#### 2.1.1. Etiología

*Mycobacterium bovis* es el agente causal específico de la tuberculosis del ganado vacuno. Son microorganismos ácido alcohol resistentes, aeróbicos, no forman esporas y no son móviles. Ellos son derechos o ligeramente curvados, midiendo de 0.3 a 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho y 1 a 4.  $\mu\text{m}$  de largo. El crecimiento en medios de cultivos es lento y requiere de 2 a 8 semanas para desarrollar colonias visibles. La tuberculosis bovina tienen como protagonista al *Mycobacterium bovis* parásito intracelular obligado, principal agente causal de la enfermedad en los mamíferos (Cosivi *et al.*, 1998)

#### 2.1.2. Fuentes de infección y modo de transmisión

El reservorio principal de *M. bovis* es el bovino, que puede transmitir la infección a muchas especies de mamíferos, incluyendo al hombre. El humano adquiere la infección en primer término, por vía digestiva (leche y productos lácteos crudos) y en segundo término por vía aerógena.

La tuberculosis entre los bovinos se transmite principalmente por vía aerógena: antes del destete es importante también la vía enterógena. La tuberculosis de los porcinos, caprinos y ovinos tiene como fuente principal de infección a los bovinos y aves, y a veces al hombre. Los cerdos se infectan por vía digestiva y se considera que rara vez pueden retransmitir la infección entre sus congéneres o a otras especies animales, incluyendo al hombre. Las cabras pueden ser fuente de infección para el bovino y para el hombre.

Entre los animales silvestres en cautividad, los monos son de especial interés por su susceptibilidad al *M. tuberculosis* y al *M. bovis*. Contraen la infección del hombre por vía aerógena y constituyen un riesgo para la salud humana.

### **2.1.3. Especies susceptibles a la infección con *Mycobacterium bovis***

**2.1.3.1. Patología de la tuberculosis en cérvidos (venados y renos).** La tuberculosis bovina en otros rumiantes incluyendo el venado y el reno produce lesiones que a simple vista recuerdan a las del ganado bovino, pero extensamente se observan lesiones granulomatosas que involucran el lóbulo diafragmático del pulmón pueden aparecer abscesos purulentos, en los nódulos linfáticos mesentéricos (son detectados fácilmente).

Se ha aislado *Mycobacterium bovis* de cérvidos en granjas y en vida libre. La enfermedad puede ser subaguda o crónica, con una velocidad de progresión variable. Unos cuantos animales pueden afectarse gravemente en pocos meses, mientras que otros pueden tardar años en mostrar signos clínicos relacionados con las lesiones. Las lesiones que se producen pueden parecerse a las del ganado bovino (granuloma proliferativo, caseificación, granulación y calcificación con la edad) y pueden tomar forma de abscesos en paredes finas con escasa calcificación y que contienen material purulento. En los cérvidos, cuando se observan lesiones con abscesos de etiología desconocida se debe considerar la posibilidad de tuberculosis. Los nódulos linfáticos afectados son, por lo general, los de la cabeza y el pecho. Pueden estar afectados los ganglios linfáticos mesentéricos y encontrarse abscesos en este lugar. La distribución de las lesiones

depende de la dosis infectiva, de la ruta de infección y del periodo de incubación antes del examen.

*Mycobacterium bovis* puede originar graves pérdidas económicas por sus efectos sobre el ganado domestico y las infecciones zoonoticas. Además, la presencia de la infección en las poblaciones salvajes supone un reto para la supervivencia de especies salvajes en peligro (Schmitt *et al.*, 1997).

**2.1.3.2. Ganado bovino.** Son susceptibles a los tres tipos de tuberculosis. Son huéspedes reservorios del *M. bovis.*, generalmente causa un cuadro crónico y progresivo. La infección por *M. avium* es rara pero puede ocurrir (la mayoría son individuos inmunodeprimidos). Son más resistentes a *M. tuberculosis* y comúnmente no desarrollan lesiones por esta micobacteria pero el ganado puede volverse sensible a él por un período de tiempo.

**2.1.3.3. Animales de zoológico y vida libre.** Los zoológicos tienen una larga historia de infecciones tuberculosas, mucha literatura reporta de los tres tipos de tuberculosis en camélidos, bisontes, rumiantes exóticos, elefantes, monos, jirafas, grandes felinos y otras especies de zoológico. La zarigüeya de cola de cepillo (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda y los tejones (*Meles*) en el suroeste de Inglaterra sirven como reservorio de infección de *M. bovis* al ganado. En vida libre se describió por primera vez en 1929 en Sudáfrica en el kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) y en el duiker (*Sylvicapra grimmii*). Durante los 1940s se encontró que el kudu en la misma región estaba infectado endémicamente. En Uganda se detecto en 1982 una prevalencia del 10% en el búfalo africano y del 9% en el cerdo verrugoso (*Phacochoerus aethiopicus*). En Zambia se ha descrito infección por *M. bovis* del kafue lechue (*Kobus leche kafuensis*) y del eland (*Traurotragus oryx*). En Kenia se ha descrito un brote de tuberculosis en los babuinos verdosos salvajes (*Papion cycocephalus anubis*). También se ha diagnosticado una infección por *M. bovis* en búfalos africanos del Parque Kruger de Sudáfrica y más recientemente en león (*Panthera leo*) y el guepardo (*Acynonyx jubatus*) (Bengis *et al.*, 1996) .

*Tabla 1. Tipos de fauna silvestre detectadas con Mycobacterium bovis.*

Pais.	Especies	Cita bibliografica.
Francia	<i>Cervus elaphus</i> , <i>Capreolus capreolus</i> y <i>Meles meles</i> .	(Zanella et al., 2008)
U.S.A.	<i>Odocoileus virginianus</i> y <i>Canis latrans</i> .	(VerCauteren et al., 2008)
España	<i>Sus scrofa</i> , <i>Dama dama</i> y <i>Cervus elaphus</i> .	(Gortazar et al., 2008)
Gran Bretaña	<i>Dama dama</i> y <i>Cervus elaphus</i> .	(Johnson et al., 2008)
Alemania	<i>Sus scrofa vittatus</i> , <i>Cervus elaphus</i> , <i>Bison bonasus</i> y <i>Lynx lynx</i> .	(Schmidbauer et al., 2007)
Suecia	<i>Dama dama</i> .	(Bolske et al., 1995)

#### 2.1.4. Patogenia

Esta se divide en dos: la formación de un complejo primario y posteriormente una diseminación posprimaria. El complejo primario consiste en la lesión que se produce en el ganglio linfático regional dependiendo de la entrada. Si es por vía respiratoria será en los nódulos pulmonares y cuando es en tracto digestivo (en tonsilas o intestino) se afectarán los ganglios faríngeos o mesentéricos.

La lesión pulmonar primaria se localiza en la zona mejor ventilada, frecuentemente en la zona subescapular de los lóbulos diafragmáticos. El proceso comienza con una bronquiolitis con expansión hacia los alveolos (Dungworth, 1993). La primera lesión formada únicamente por fagocitos derivados de los monocitos sanguíneos, que tiende a la formación de una necrosis central que puede llegar incluso a calcificarse. Esta lesión evoluciona hasta el tubérculo, basado en la formación de un granuloma organizado en espiral o de forma concéntrica. En este granuloma se compone de células dispuestas en capas celulares al rededor de la zona de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

necrosis, con células derivadas del sistema fagocítico mononuclear: macrófagos, células epitelioides y células gigantes de Langhans, corona linfocitaria y de células plasmáticas y capa de fibroblastos rodeando todo el conjunto. (Palmer *et al.*, 1999).

La diseminación posprimaria puede consistir en una tuberculosis miliar donde se afectan varios órganos. Por re-infecciones intrínsecas o extrínsecas se formarán nuevos nódulos en los diferentes órganos, la forma intrínseca se puede desarrollar por aspectos alérgicos a la micoproteínas (Nieberle & Cohrs, 1966).

Análisis histopatológico de los tejidos. Los bacilos tuberculosos se incluyen dentro del grupo de parásitos intracelulares facultativos caracterizados por provocar procesos inflamatorios de tipo granulomatoso que se distinguen por predominio de reacciones celulares. A diferencia de las reacciones vasculo-sanguíneas en las que predominan los procesos exudativos y son propias de las inflamaciones granulomatosas, y después de una breve fase de reacción vasculo sanguínea, predomina la llegada de células mononucleares y el desarrollo de formaciones celulares que pueden ser de dos tipos:

Granulomas: formas circunscritas y delimitadas.

Infiltrados inflamatorios: formas difusas y mal delimitadas.

Un granuloma es una estructura celular neoformada, bien delimitada y constituida por diferentes tipos celulares inflamatorios que pueden o no disponerse de una forma determinada, y que cuando lo hacen de una forma ordenada tienen cierta especificidad. En la tuberculosis, la formación del granuloma está estrechamente relacionada con el desarrollo de reacciones inmunes y el asentamiento de linfocitos sensibilizados frente al bacilo tuberculoso, en las zonas periféricas del granuloma. Entre estas células, puede haber algunas células plasmáticas e internamente a ellos se encuentra una población de macrófagos que pueden presentar ya sea la morfología de:

Monocitos- macrófagos no activados o de células epitelioides. Estas últimas derivan de una activación y transformación epitelioides de los monocitos-macrófagos a través de las linfocinas segregadas por linfocitos T sensibilizados, presentes en la periferia y asociados a la inmunidad mediada por células que se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

producen en la tuberculosis; la activación de los macrófagos es necesaria para vencer la resistencia de los bacilos a su digestión fagocítica.

Células gigantes tipo Langerhans, células multinucleadas con los núcleos dispuestos circularmente o en forma de herradura en la zona periférica, y procedentes de la asociación de células epitelioides con el fin de vencer más fácilmente a la micobacteria.

Posteriormente, se produce una necrosis central por caseificación, causada por la liberación de sustancias citotóxicas por las micobacterias y por la secreción de citotoxinas por linfocitos T activados, asociados a la Hipersensibilidad de Tipo Retardado (HTR) que se produce en la tuberculosis.

Los infiltrados inflamatorios suelen ser de tipo exudativo y se desarrollan normalmente de una forma aguda. Este exudado suele ser voluminoso y consiste de fibrina y neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), así como, de agrupaciones de células mononucleares. Generalmente, este exudado se coagula y se caseifica.

Cuando los bacilos tuberculosos penetran en el organismo, son fagocitados por macrófagos; sin embargo, estos no son destruidos y se multiplican, por lo que al cabo de 24-48 h de su penetración provocan necrosis de la célula y de los tejidos vecinos, constituyendo un foco inicial de necrosis y el desarrollo de una reacción inflamatoria leve consistente en congestión y exudación, con acumulo inicial y escaso de PMNs y acumulo rápido e importante de macrófagos que rodean el foco de necrosis, unido esto a una multiplicación de los bacilos tuberculosos.

La multiplicación más o menos rápida y abundante de los bacilos, puede derivar hacia dos evoluciones de la enfermedad: una multiplicación rápida y masiva de bacilos tuberculosos hace que predominen las reacciones vasculares y exudativas, con la presencia de abundante exudado sero-fibroso, así como de numerosos macrófagos. En estos casos la respuesta inmune es mínima. Se trataría de una tuberculosis exudativa y una multiplicación más lenta de los bacilos motiva que las reacciones vasculares se atenúen y se forme, con una respuesta inmune aceptable, el típico granuloma. Se trataría de una tuberculosis proliferativa (Nieberle & Cohrs, 1966).

**2.1.4.1. Lesiones tuberculosas granulomatosas circunscritas.** Los granulomas tuberculosos o tubérculos son la lesión característica de la tuberculosis y podríamos hacer distintas descripciones atendiendo a su tamaño y aspecto macroscópico motivados por su evolución.

Tubérculo gris.

Constituye la forma inicial del granuloma, son del tamaño de la cabeza de un alfiler translúcidos o grisáceos, y están rodeados por un halo rojizo.

Se suelen encontrar en gran número y aislados unos de otros.

Son propios de una generalización fulminante. Puede ser el inicio de una lesión tanto proliferativa como de una lesión exudativa. Microscópicamente se observa un acumulo de células epitelioides rodeado por linfocitos y macrófagos, mas extremadamente un halo hiperémico.

Tubérculo miliar. Del tamaño de un grano de mijo, mide unos 2 mm de diámetro, es de color grisáceo y el centro de color amarillo debido al caseum. Se trata de una lesión proliferativa en una fase más avanzada que la del tubérculo gris.

Microscópicamente, se observa un foco de necrosis caseosa o *caseum*, rodeado por una capa de células epitelioides y gigantes, además una capa de linfocitos y macrófagos.

Tubérculo caseoso. Del tamaño de un chícharo al de una avellana se encuentra constituido de su mayor parte por *caseum* que, al corte suele fluir. Estos granulomas tienen tendencia a confluir y entrar a coalescencia. Microscópicamente, es similar al anterior; sin embargo, el centro caseoso es más voluminoso y las capas periféricas más delgadas y rodeadas frecuentemente por una delgada cápsula conectiva.

Tubérculo caseo-calcificado. De un tamaño similar o superior al anterior, tienen una consistencia dura y un contenido seco y calcáreo que suena al corte. Microscópicamente, se observa un *caseum* impregnado de sales de calcio.

Tubérculo quístico. Es similar al anterior; aunque con una cápsula fibrosa más gruesa. Microscópicamente, se observa que la capa de tejido de granulación que rodea al *caseum* prácticamente ha desaparecido o es muy delgada.

Tubérculo fibroso. Se trata de un tubérculo gris o miliar constituido casi exclusivamente por fibras conectivas invadiendo el tubérculo (Dungworth *et al.*, 1993).

**2.1.4.2. Lesiones tuberculosas difusas.** Son lesiones extensas y mal delimitadas. Se trata de lesiones exudativas que se extienden por un órgano o parte de un órgano. Se distinguen dos procesos:

Infiltraciones tuberculosas, principalmente en pulmón. Derrames tuberculosos, o colecciones fluidas en una cavidad preformada (cavidades serosas, en meninges u otras).

Infiltraciones tuberculosas. Afectan inicialmente a un amplio territorio pulmonar. Pueden presentar un aspecto gelatiniforme o grisáceo, cuando el exudado es seroso o sero-fibrinoso con focos de células inflamatorias; o caseoso cuando sufre una brusca necrosis por caseificación.

Derrames tuberculosos. Son exudados poco específicos, sero-fibrinosos o sero-hemorrágicos, que contienen abundantes células inflamatorias y células mesoteliales descamadas, presentes en cavidades serosas y, más raramente en meninges y cavidades articulares, y en las que las serosas o meninges pueden mostrar signos de inflamación. En el bovino son mucho más frecuentes las lesiones tuberculosas proliferativas que las exudativas (Gutierrez, 1996).

**2.1.4.3. Evolución de la tuberculosis.** Las lesiones tuberculosas pueden permanecer estables, además pueden involucionar o evolucionar a procesos más pronunciados.

Extensión y coalescencia de las lesiones circunscritas. La extensión y unión de las lesiones circunscritas conducen a la formación de nódulos tuberculosos de varios centímetros a algunas decenas de diámetro, de forma redondeada a multinodular. Se forman mediante la coalescencia de varios nódulos que contienen focos de necrosis caseosa de extensión variable y que pueden estar más o menos calcificados, rodeados por un tejido de granulación asociado a zonas de fibrosis que delimita a los nódulos a los que penetra.

Microscópicamente se observan áreas de caseificación a veces calcificada, rodeadas por un tejido de granulación con abundantes células epitelioides, células gigantes tipo Langhans (Célula gigante multinucleada que se observa en los granulomas inmunitarios tipo tuberculoide. Los núcleos se disponen en herradura) y linfocitos, y áreas de fibrosis rodeando y/o infiltrando al tejido de granulación.

Asociación de lesiones proliferativas y exudativas. A veces, no es fácil distinguir entre los dos tipos de lesiones, ya que se pueden presentar dos casos: Los dos tipos de lesiones pueden coexistir en un mismo tejido como es el caso de los derrames tuberculosos asociados a lesiones circunscritas de la pared o de los órganos de la cavidad afectada, y el caso de infiltrados tuberculosos asociados a lesiones circunscritas localizadas en otras áreas del mismo órgano.

Los dos tipos de lesiones pueden sucederse en el tiempo por ejemplo lesiones exudativas de pleura o peritoneo sufren más o menos rápidamente una organización conectiva y posterior desarrollo de lesiones proliferativas nodulares de tamaño variable que pueden unirse y amontonarse. La forma más característica es la tuberculosis perlada de serosas.

La necrosis por caseificación y sus consecuencias. La necrosis por caseificación es frecuente, precoz y abundante en los bovinos, tiene una consistencia pastosa, un color amarillento, varía su consistencia y color dependiendo del grado de calcificación que presente.

Caseificación rápida y extensiva de las lesiones exudativas. Las lesiones exudativas son agudas y extensivas, y el exudado voluminoso. Se presentan cuando la multiplicación de los bacilos tuberculosos es rápida y masiva, y la forma de frenar esa multiplicación y sus consecuencias es su caseificación lo más rápido posible. Aunque no son frecuentes, se han descrito en diversos órganos como pulmón (neumonía caseosa), glándula mamaria (mastitis caseosa), útero (metritis caseosa) y riñón (nefritis caseosa); sin embargo, la más característica y frecuente es la observada en linfonódulos (NL), especialmente los mediastínicos (Adenitis caseosa). En esta última, los NL están muy aumentados de tamaño y con grandes áreas caseosas. Existe una forma especial de adenitis caseosa en la que el LN está muy aumentado de tamaño, y todo caseificado, permaneciendo solamente los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tubérculos, lo que le otorga un aspecto radiado y el nombre de adenitis tuberculosa con caseificación radiada (Marcato, 1981).

Evolución de las lesiones caseosas. Con el tiempo, las lesiones caseosas pueden seguir distintos caminos: La estabilización. La lesión permanece en su estado sin modificación aparente durante un largo tiempo. Esto sucede con las lesiones enquistadas.

La calcificación. Es el resultado de la precipitación de sales cálcicas sobre el *caseum*, consecuencia de la afinidad natural que estas sales tienen por los tejidos necrosados. Desde el punto de vista evolutivo, la calcificación supone una estabilización de la lesión aunque, como en el caso anterior, pueden persistir bacilos en latencia.

El reblandecimiento. El reblandecimiento del *caseum* y subsiguiente licuefacción de los focos caseosos se debe a la presencia de una gran cantidad de antígenos procedentes de bacilos tuberculosos y que son altamente tóxicos para los tejidos, a la acción de la reacción de HTR; y de enzimas proteolíticas que hacen que el *caseum* se vuelva fluido.

Desde el punto de vista evolutivo, el reblandecimiento y licuefacción del *caseum* se considera una agudización de la lesión tuberculosa. Este proceso de licuefacción favorece la multiplicación extracelular de los bacilos tuberculosos, y la aparición de fenómenos congestivos, exudativos y necróticos que determinan un recrudecimiento de las lesiones. Consecuencia de ello son también la generalización del proceso y la salida al exterior a través de conductos ya existentes de ese material necrótico y la formación de cavernas tuberculosas. Este material, en su salida puede provocar la formación de nódulos tuberculosos en la mucosa de dichos conductos. Esta comunicación con el exterior de las lesiones tuberculosas hace que se le denomine tuberculosis abierta, y se considera muy importante en la diseminación de la enfermedad (Gutierrez, 1996).

La fibrosis de las lesiones tuberculosas. Es un proceso bastante constante en la tuberculosis bovina y supone, en el plano evolutivo, un proceso de estabilización. La fibrosis puede suponer el encapsulamiento de la lesión, o cicatrización de la lesión, lo que suele suceder en lesiones de pequeño tamaño con penetración y

fibrosis total, o puede ser de carácter difuso alternando con zonas de tejido de granulación tuberculoso o con focos de caseificación.

**2.1.4.4. Lesiones de la tuberculosis bovina.** La identificación de los tubérculos bovina durante la inspección, se basa principalmente en la dirección de lesiones localizadas en LN que corresponde a la extensión de la lesión inicial o foco primaria hacia LN que drena la zona. Así, el foco primario o lesión del órgano y la lesión tuberculosa de LN regional reciben el nombre complejo primario. Cuando estas dos lesiones están presentes se habla de complejo primario completo y cuando falta uno de ellos, generalmente la lesión del tejido pulmonar o intestinal, se le llama complejo primario incompleto.

Localización de los complejos primarios (Gutierrez, 1996). La localización de los complejos depende de la vía de ingreso de la germen: siendo la principal vía para el *Mycobacterium bovis* a la vía respiratoria, lo que ocurre generalmente con la llegada de bacilos contenidos en aerosoles, a los alvéolos. La segunda vía de entrada es la digestiva, más frecuente en animales lactantes. Una tercera vía importante de entrada del bacilo tuberculoso en el bovino sería al oronasal, la que comprometería fundamentalmente a LN de la orofaringe en la cabeza. Se piensa que corresponda a partículas contenidas bacilos tubérculos que debido a su tamaño, no alcanzan a alvéolos, por lo que serían expulsados de las vías respiratorias hacia la cavidad oronasal donde podrían multiplicarse en algún sitio de esta área y pasar posteriormente al LN. Las otras vías descritas son la congénita, la genital, la ocular y la cutánea que son mucho menos frecuentes.

Importancia de las vías de ingreso

En una inspección correcta de la canal de un animal sospechoso de estar tuberculoso, se debe observar a todos los LN y los órganos que pueden presentar lesiones tuberculosas, especialmente aquellos relacionados con las posibles vías de entrada, donde se encuentran los complejos primarios.

Localización de los complejos primarios.

Complejo primario respiratorio (Pulmón +LN mediastínicos y traqueobronquiales)

Complejo primario digestivo (Intestino + LN mesentéricos)

Complejo primario oronasal (Tonsila + LN retrofaríngeos medios y laterales)

Otros complejos primarios

Complejo primario respiratorio

Con la aplicación de programas de erradicación de la tuberculosis, ha aumentado la importancia de las vías respiratorias y oronasal en detrimento de todas las demás. Cuando la vía de entrada es respiratoria, el foco primario se localiza en los pulmones, generalmente en el borde dorsal de los lóbulos. Desde este foco primario, los bacilos tuberculosos llegan a los LN mediastínicos o bronquiales correspondientes donde producen una lesión similar. Generalmente existe un complejo primario completo; sin embargo, en los casos en los que el animal tiene una resistencia natural fuerte contra el bacilo tuberculoso, la lesión pulmonar puede fibrocalcificarse y ser difícil de encontrar. Esta forma de presentación pulmonar es la más importante del bovino y se encuentra en un 90% de los casos (Dungworth *et al.*, 1993).

Complejo primario digestivo. La vía digestiva va perdiendo protagonismo conforme disminuye la incidencia de vacas con mastitis tuberculosa ya que afecta preferente a animales jóvenes alimentados con leche contaminada. El foco primario se localiza en yeyuno o en íleon adquiriendo la forma de una enteritis proliferativa focal con la formación de nódulos tubérculos que sufren caseificación afectando con lesiones características de tuberculosis. La lesión intestinal puede faltar o no ser observada. En el complejo primario digestivo se presenta aproximadamente en un 10% de los animales inspeccionados (Dungworth *et al.*, 1993).

Complejo primario oronasal. Si la vía de entrada es la oronasal, el foco primario podría no existir o estar localizado en tonsilas. Se han descrito lesiones macroscópicas y microscópicas en tonsilas; sin embargo, su incidencia es muy pequeña, cuando la vía de entrada es la oronasal, el foco primario se encuentra en los LN de la cabeza, especialmente en los retrofaríngeos medios que son los más próximos a las tonsilas y zona nasofaríngea; sea esta lesión, se puede producir una generalización de la infección. Este complejo primario se presenta en el 1-2% de los animales inspeccionados, sin embargo, en aéreas de erradicación de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tuberculosis, en el 29.4% de los casos los animales presentan una sola lesión, esta se localiza en los LN de la cabeza (Jubb *et al.*, 1985).

Tuberculosis en el pulmón. El órgano más frecuentemente afectado de tuberculosis es el pulmón. El foco primario produce generalmente una lesión granulomatosa que suele continuarse con una bronconeumonía por extensión intracanalicular de los bacilos tuberculosos. Esta extensión intracanalicular afecta a los grupos de alvéolos con formación de tubérculos caseosos que adquieren formas de racimos y que por afectar a las unidades histológicas del pulmón o acinus, recibe el nombre tuberculosis acinosa. Al fusionarse algunos de estos tubérculos caseosos dan lugar a nódulos más grandes o a la tuberculosis acinonodular. El restablecimiento del *caseum* contenido en alguno de estos nódulos tuberculosos favorece la formación de cavernas con salida del *caseum* al exterior a través de los conductos (bronquiolos y bronquios), lo que se conoce como tuberculosis abierta (Corner *et al.*, 1990).

Generalización. Durante el proceso de crecimiento de las lesiones tuberculosas, especialmente si se produce restablecimiento, puede hacer ruptura de vasos linfáticos o sanguíneos y generalización del proceso. En la primoinfección se puede producir una Generalización precoz y aguda, la que se representa cuando la resistencia es baja, la dimensión del bacilo se hace simultáneamente a diversos órganos dando lugar a lesiones uniformes (con el mismo estado evolutivo). Son las típicas las lesiones de tuberculosis miliar aguda constituida por pequeños tubérculos, grises o amarillos similares a los granos de mijo. Se presenta en diversos órganos, especialmente en el pulmón e hígado, aunque también puede haber lesiones exudativas (neumonía, meningitis), con desenlace fatal. Esta forma es más común en carnívoros, porcinos y aves.

También en esta fase hay una generalización precoz y lenta que se manifiesta cuando hay resistencia parcial (Bernabe *et al.*, 1990), la dimensión es de pocos bacilos, y se realiza en forma de sucesivas oleadas, dando origen a tubérculos de diverso tamaño y configuración en los órganos: miliares, caseoso, caseocalificados, fibrocalificados (Gutierrez, 1996).

#### **2.1.4.5. Diagnóstico diferencial.** Clasificación de las lesiones granulomatosas.

Aunque las lesiones microscópicas y macroscópicas de la tuberculosis son bastante específicas, existen una serie de procesos que, en determinados casos, pueden inducir a confusión. Se debe destacar que la tuberculosis estará dentro de las enfermedades en las que predominan las reacciones celulares. Estas inflamaciones se caracterizan por tener, después de una breve fase de reacciones vasculares, unas reacciones celulares en las que predominan los infiltrados mononucleares, ya sean circunscritos o delimitados, que se conocen como granulomas o por el predominio de infiltrados difuso, mal delimitados que dan origen a infiltrados inflamatorios y a reacciones granulomatosas difusas. Las causas que dan origen a los granulomas son generalmente factores de inflamación moderados, pero persistentes como: cuerpos extraños, algunos tipos de bacterias, parásitos migratorios, hongos y desordenes inmuno-alérgicos.

Además de diferenciar a la tuberculosis de los distintos procesos granulomatosos mencionados, se debe realizar una diferenciación con procesos purulentos. De las lesiones granulomatosas se diferencia por la ausencia normalmente de necrosis, proceso muy característico de los granulomas tuberculosos, y por la falta de implicación de los LN regionales.

Lesiones piogranulomatosas, Actinobacilosis y actinomicosis. Entre estas se encuentran principalmente en la actinobacilosis (*Actinobacillus lignieresii*) y en la actinomicosis (*Actinomyces bovis*), enfermedades frecuentes en el ganado vacuno y que suelen afectar a los tejidos blandos la primera (lengua) y a tejidos duros la segunda (hueso de la mandíbula o maxilar). En estos dos granulomas hay PMNs, además de otras células, y se debe destacar que en el centro del granuloma existe una estructura formada por bacterias Gram. negativas en el primer caso y por hifas Gram. Positivas en el segundo caso, y ambas rodeadas por estructuras a modo de clavos dispuestas en empalizada muy acidofilas compuestas por productos derivados de inmunoglobulinas procedentes de las células inflamatorias del hospedador. Tanto la actinomicosis como la actinobacilosis presentan pequeños gránulos amarillos muy característicos llamados “granos de azufre”.

Otras lesiones piogranulomatosas.

Existen otras bacterias, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Arcanobacterium spp.*, que también pueden producir gránulos peculiares, útiles para el diagnóstico, especialmente el diferencial, que están rodeados por PMNs, formados por agregados de bacterias, detritus celulares, proteínas plasmáticas y que suelen estar situadas en las zonas periféricas del piogranuloma.

Nocardiosis. La nocardiosis (*Nocardia asteroides*) se presenta en el ganado vacuno afectando a la ubre, encontrándose aumentada de tamaño y consistencia, mientras que la superficie de corte es ligeramente granular. A la presión estos pequeños gránulos despiden exudado de aspecto de finos “fideos blanco-grisáceos”. La lesión corresponde a un piogranuloma con un centro necrótico constituido por abundantes colonias de *Nocardia asteroides*, detritus celular y piocitos rodeados por un tejido de granulación y más externamente por una capsula fibrosa. Las nocardias pueden ponerse en evidencia con la tinción de Gram positivas y con la técnica de Ziehl-Neelsen modificada, observándose abundantes colonias de bacterias filamentosas ramificadas.

Granulomas micóticos. Los granulomas micóticos se encuentran generalmente en pulmón y afectan principalmente animales inmunodeprimidos o sometidos a una terapia antibiótica prolongada. Macroscópicamente pueden presentarse como nódulos de pequeño tamaño que poseen un foco necrótico y un halo hiperémico al principio, y más tarde una cápsula fibrosa similar a la de un absceso.

Microscópicamente, son fácilmente diferenciales, de la tuberculosis ya que en el centro necrótico de la lesión se encuentran las hifas del hongo. Macroscópicamente la diferenciación se basa fundamentalmente en la localización de la lesión en pulmón y en que los LN no están implicados.

Granulomas parasitarios. Los granulomas parasitarios se localizan principalmente en el pulmón, LN mesentéricos y serosas del intestino. En pulmón, macroscópicamente se deben buscar los parásitos en los conductos aéreos; sin embargo, a veces la imagen microscópica del granuloma es difícilmente diferenciable de una lesión tuberculosa.

En los LN mesentéricos generalmente se encuentran granulomas de color verdoso debido al infiltrado de eosinófilos. En la pared del intestino también es común

encontrar granulomas de *Oesophagostomun radiatum*, que corresponden a pequeños granulomas de 0,5-1 cm. visibles desde la serosa y que contienen material necrotico que puede encontrarse calcificado.

Microscópicamente, los granulomas parasitarios son más fáciles de diferenciar ya que se puede observar el parásito, grupos de macrófagos, eosinofilos, y algunos neutrófilos, a veces células gigantes de cuerpos extraños, linfocitos y, en granulomas antiguos, fibroblastos rodeando el granuloma. Si el parásito está muerto, suele haber necrosis y calcificación.

Granulomatosas no piógenas. Las lesiones granulomatosas no piógenas se presentan en la brucelosis y en la paratuberculosis.

Brucelosis. La brucelosis bovina afecta fundamentalmente a los órganos genitales, glándula mamaria, LN, hígado, riñones, articulaciones y vainas tendinosas. Las reacciones de los tejidos frente a la *brucella abortus* pueden ser de dos tipos: exudativas y proliferativas. Las primeras son agudas y fibrinopurulentas, con acumulación de exudado en la cavidad vaginal testicular y lesiones necróticas en los testículos y epidídimo. Suelen ser unilaterales y afectar a todo el testículo. En la placenta también se produce inflamaciones edematosas necróticas con focos de infiltrados de macrófagos, células plasmáticas, linfocitos y PMNs. En el curso de la brucelosis crónica es frecuente la formación de granulomas constituidos por macrófagos, células epitelioides, linfocitos, células plasmáticas y más raramente, células gigantes de tipo Langhans. Macroscópicamente, los granulomas tienen el aspecto de nodulillos de color gris blanquecinos y se localizan fundamentalmente en la ubre y LN y mas raramente en el hígado y riñones.

Paratuberculosis. Las lesiones de paratuberculosis causada por *Mycobacterium paratuberculosis*, se encuentran en intestino y LN, no constituyen un verdadero granuloma, pues se trata de a cúmulos de células epitelioides cargadas de bacilos Ziehl-Neelsen positivos y linfocitos, no existe normalmente necrosis, y las células gigantes tipo Langhans son escasas. La mucosa del intestino se encuentra engrosada, con gruesos pliegues debido a los infiltrados de dichas células epitelioides y los LN están uniformemente aumentados de tamaño y generalmente edematosos por el mismo motivo.

En el hígado se pueden observar pequeños granulomas constituidos en el ganado vacuno, por células epitelioides y linfocitos que a veces pueden contener células gigantes tipo Langhans y bacilos Ziehl-Neelsen positivos (Bernabe *et al.*, 1990 y Gutierrez, 1996).

### **2.1.5. Signos clínicos**

Los signos clínicos de la tuberculosis varían con el órgano involucrado, la tuberculosis precoz es generalmente asintomática. Debilidad progresiva, acompañada de emaciación, caracterizan los últimos estadios de la enfermedad. Tos irregular y débil, sugiere tuberculosis pulmonar y puede ir acompañada de hinchazones indoloras de los ganglios linfáticos externos.

La tuberculosis es con frecuencia enfermedad insidiosa y sus signos clínicos suelen ser poco notables. Sin embargo, muchos animales pierden peso poco a poco y continuamente no obstante la utilización de suficiente cantidad de alimento. El animal padece tos profunda y persistente, que a veces es dolorosa. En algunos casos sobreviene la neumonía tuberculosa. El curso de la enfermedad se prolonga por muchos meses y aun por años. Si hay diseminación hematogena, el curso acorta y termina con la muerte.

### **2.1.6. Respuesta inmunológica**

La infección primaria ocurre habitualmente por inhalación del microorganismo en aerosoles. Las micobacterias son opsonizadas con moléculas de complemento (C3b), inmunoglobulinas (IgG), proteína de unión a manosas (MBP), y el factor surfactante A. Esto permite a la bacteria ingresar al macrófago de manera eficiente. La replicación ocurre inicialmente en vías aéreas terminales dentro de células fagocíticas (bronquiolos pequeños, alveolos - lesión primaria o tubérculo).

Los macrófagos los distribuyen a otras áreas pulmonares y a ganglios linfáticos regionales. En los pulmones, las células T activadas producen citocinas, tales como el IFN-g y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). El IFN-g es esencial para la activación de los macrófagos, que producen entonces óxido nítrico (NO), que contribuye fundamentalmente en el control de la infección. Una vez que se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

monta una respuesta inmune celular, las bacterias disminuyen y se desarrollan granulomas.

La caseificación consiste en la licuefacción de un tubérculo maduro, con la formación de una cavidad en la que los bacilos se multiplican. Varios componentes de la pared celular de las micobacterias tienen actividad inmunomoduladora, entre ellos un glicolípido fenólico, manósidos de fosfatidilinositol, la lipo-arabinomanana y lipoproteínas. Estas moléculas son reconocidas por los receptores Toll-like (TLRs) y otros receptores innatos en macrófagos y células dendríticas, que activan tanto la respuesta inmune protectora como la respuesta patogénica (Algood *et al.*, 2003).

Estos mediadores reclutan células inflamatorias (células T, NK y neutrófilos) al área de infección y coordinan la respuesta inmune adaptativa. Luego de que *M. tuberculosis* es fagocitado por los macrófagos alveolares, se desarrolla una respuesta inflamatoria local no específica. La mayoría de los mediadores en este punto (IL-1b, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-15, IL-18, entre otros) son producidos por macrófagos o CD, pero el IFN- $\gamma$  es secretado por células NK, células T gd, y células T restringidas a CD1. Más aún, publicaciones recientes han demostrado que esta citoquina Th1, el IFN- $\gamma$ , podría también ser producida por monocitos, macrófagos y CPA. De hecho, ha sido demostrado que las CD de individuos sanos producen IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con BCG por un mecanismo dependiente de TLR2 (Fricke *et al.*, 2006). En resumen, esta respuesta inicial determina el crecimiento local de *M. tuberculosis* o la contención de la infección. Las células fagocíticas poseen un rol clave en el inicio de la respuesta local inflamatoria y en el comienzo de la inmunidad mediada por células.

### **2.1.7. Epidemiología**

La epidemiología tiene por objeto el estudio de la distribución y los determinantes de las enfermedades en la población. Si bien en sus inicios modernos, en las primeras décadas del siglo XX, se hallaba orientada al estudio de las epidemias, en la actualidad sus principios y métodos se aplican a todo tipo de enfermedades y condiciones de salud. En las enfermedades infecciosas, consideradas como

fenómeno global que afecta a grandes masas de población, la epidemiología se utiliza para estudiar la evolución de la morbilidad y mortalidad que componen, los grupos afectados, los cambios geográficos, ciclos y tendencias, y permite diseñar estrategias para su control, eliminación y erradicación

El gran conocimiento actual de la epidemiología de la TB ha permitido determinar la importancia de los reservorios de vida libre (De Lisle *et al.*, 2002). Las especies detectadas como portadoras de *M. bovis* son numerosas y la lista de nuevas especies afectadas aumenta progresivamente año tras año. Sin embargo la mayoría de ellas no tiene ninguna consecuencia sobre el mantenimiento y dispersión de la enfermedad, o lo que es lo mismo, muy pocas son reservorios verdaderos (Delahay *et al.*, 2001). Para que una especie pueda ser considerada reservorio, debe producirse un mantenimiento temporal de la enfermedad en una determinada localización geográfica (Fulford *et al.*, 2002). En esta localización habitada por el reservorio, la enfermedad persiste independientemente de otras especies hospedadoras o susceptibles que puedan ser fuentes de infección. La dispersión de la enfermedad dentro de la especie hospedadora se realiza tanto de forma horizontal como vertical. Los ejemplos más documentados de hospedadores son el ciervo (*Cervus elaphus*) (Dodd, 1984), tlacuache (*Trichsurus vulpecula*) (Lugton *et al.*, 1997), tejón (*Meles meles*) (Gallagher & Clifton-Hadley, 2000), visón (*Bison bison*) (Thoen *et al.*, 1992) y el búfalo africano (*Syncerus caffer*) (Rodwell *et al.*, 2001). El número de reservorios reconocidos y documentados es escaso si se compara con el elevado número de las especies consideradas susceptibles. Algunas especies son susceptibles de padecer la infección tuberculosa pero la aparición de la enfermedad es esporádica y únicamente ocurre si existe en el ecosistema un hospedador verdadero o de desbordamiento. Otro término parecido son los reservorios por desbordamiento. Los reservorios por desbordamiento, se ven afectados en situaciones de elevadas prevalencias entre hospedadores verdaderos con los que conviven en la misma área geográfica. El reservorio por desbordamiento puede transmitirla pero su prevalencia tiende a disminuir cuando disminuye la del reservorio verdadero. Una combinación de factores como la susceptibilidad genética, la prevalencia y abundancia de la especie en cuestión,

así como sus características etológicas, determinan qué tipo de hospedador es cada especie susceptible a la TB. Por tanto un conocimiento preciso del papel que juega cada especie en el mantenimiento y diseminación de la enfermedad, resulta indispensable para el desarrollo de medidas de control de la TB (De Lisle *et al.*, 2002).

Uno de los principales factores que afectan a la epidemiología de la TB es la forma de transmisión. Ésta se considera generalmente indicada por las lesiones encontradas en la especie en cuestión. Por ejemplo un predominio de lesiones en tórax y pulmones evidencia una transmisión mediante aerosoles o aerógena, mientras que lesiones mesentéricas son probablemente resultado de una infección oral. Las lesiones circunscritas a ganglios linfáticos retrofaríngeos pueden ser debidas tanto a transmisiones orales como aerógenas dado que estos ganglios linfáticos reciben linfa de la cavidad oral y de la nasal. En algunas especies como el tlacuache y el león, aparecen lesiones en ganglios linfáticos cutáneos superficiales como el prescapular, estas lesiones se asocian a contaminaciones cutáneas debidas a mordeduras (Gavier-Widen *et al.*, 2001).

Si bien la forma de transmisión queda bastante definida por las lesiones en los animales enfermos, la información sobre las rutas de transmisión sigue siendo limitada. La principal forma de contagio es la horizontal mediante contacto directo con animales infectados o bien mediante el consumo de animales infectados por carnívoros u omnívoros. Otra posible forma de contagio es la indirecta mediante contacto con contaminación ambiental procedente de animales infectados. A este respecto, se han realizado un limitado número de trabajos sobre la supervivencia de *M. bovis* en diversas condiciones ambientales. Si bien estos estudios no coinciden respecto al tiempo de vida del bacilo bovino ante la exposición directa al sol, todos ellos están de acuerdo en que las posibilidades de supervivencia aumentan en medios húmedos, sombreados y con condiciones de pH cercanos a la neutralidad. En estas condiciones se han detectado bacilos viables durante seis semanas (Duffield, 1985).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para que la infección micobacteriana se establezca en un individuo, se deben dar una serie de factores epidemiológicos, los dependientes de la bacteria y los dependientes del organismo hospedador.

Los factores bacterianos son aquellos que le permiten a la micobacteria instalarse en su hospedador. La dosis necesaria para infectar a un hospedador depende de éste y de la especie micobacteriana. Los hospedadores más susceptibles requerirán menos dosis infectante; Los factores de virulencia son un complejo sistema que facilita el asentamiento y supervivencia de la bacteria dentro del hospedador. Este sistema multifactorial tiene una serie de componentes básicos y los polimorfismos encontrados en ellos se asocian a la patogenicidad de la bacteria (Collins, 2001).

Respecto a *M. bovis* se han documentado diversos grados de resistencia en bovinos y ciervos (Mackintosh & Griffin, 1995), por lo que se ha recomendado la selección genética como ayuda al control de la TB bovina.

Otro importante condicionante es el estado del sistema inmune del hospedador. Ciertas enfermedades infecciosas como las Retrovirosis, Pestes, Herpesvirosis y las parasitarias producen una deficiencia de linfocitos T, abriendo la puerta a la TB. La edad es otro factor que afecta al sistema inmune, con un detrimento de las subpoblaciones Th-1 encargadas de la respuesta efectora a la TB (Hobbs *et al.*, 1993). Las carencias nutritivas de aminoácidos esenciales y vitaminas producen inmunodepresiones, que pueden facilitar la infección (Penn *et al.*, 1991).

En condiciones naturales el venado es una especie con escasas enfermedades infecciosas (Mackintosh, 1998), pero el contacto con las especies domésticas enfermas por TB permite que la infección fluya con facilidad al venado y acabe siendo enzootica para esta especie. Al contrario que el tejón o el tlacuache, el problema de la TB en venado, aparece en diversos países, ecosistemas, y tanto en venados mantenidos en cautividad como en animales libres. Por tanto, en cada situación, la epidemiología es diferente (Griffin & Mackintosh, 2000).

La aparición de la TB en ciervo se ha constatado en España (Tato, 1999), Nueva Zelanda (De Lisle *et al.*, 2001), Inglaterra e Irlanda (O'Reilly, 1995) así como los Estado Unidos (Mackintosh & Griffin, 1995). Las cifras mundiales de prevalencia

se estiman inferiores a un 5% (Clifton-Hadley *et al.*, 1995), pero éstas se basan en pequeños estudios de lesiones realizados en cada país afectado, por lo que no son de mucha utilidad. El único estudio que realmente ha analizado un número significativo de animales cerca de 10,000 durante un período de 6 años y centrándose en un área mediterránea (Tato, 1999), muestra una incidencia creciente con una prevalencia máxima del 1,6%. El estudio se realizó en un área de bosque mediterráneo modificado, donde son cazados y por lo tanto se realiza sobre ellos cierta gestión productiva con la finalidad de aumentar la calidad y cantidad de los animales. Por esta razón son alimentados en épocas de escasez de alimento y mantenidos en densidades altas, lo que posibilita los contactos y por lo tanto, los contagios (Tato, 1999).

En Estados Unidos la TB bovina no es muy frecuente, sin embargo en 1994 se comunicó el primer caso de TB en un venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) de Michigan (Schmitt *et al.*, 1997). Tras este brote se inició un programa regional de control de TB, el cual detectó la enfermedad en diversas especies, como coyotes (*Canis latrans*) y osos negros (*Ursus americanus*) (Bruning-Fann *et al.*, 2001); Se consideró que la suplementación de alimentos en épocas de escasez y el exceso de densidad (19 a 23 animales/km<sup>2</sup>) fueron los factores de riesgo más importantes para la difusión y mantenimiento de la enfermedad (Schmitt *et al.*, 1997). La prevalencia encontrada en núcleo de la zona llegó hasta el 60% induciendo una mortalidad del 20%, aunque la prevalencia total en la península fue del 1,7% (Palmer *et al.*, 1999).

En general, la patología descrita en el venado es similar a la del bovino (Cassidy *et al.*, 1999) por tanto es una enfermedad crónica con un tiempo de incubación que puede llegar hasta los dos años aunque la media está en torno a los 4 meses. La lesión más característica es el granuloma proliferativo, con un desarrollo progresivo de caseificación, granulación y calcificación (Rhyhan & Saari, 1995). Sin embargo existen características propias, como poseer una escasa encapsulación del granuloma, con mayor número de organismos viables y una escasa calcificación, elementos que lo describen como un animal muy susceptible a la TB (Audige *et al.*, 2001). La localización más típica, es la afección del ganglio

retrofaríngeo medial, resultado del drenaje desde las tonsilas. Esta lesión aparece en el 50% de los venados tuberculosos en España (Tato, 1999). También se han descrito, aunque menos frecuentemente, lesiones en ganglios mediastínicos, mesentéricos y pulmón (Clifton-Hadley & Wilesmith, 1991). Cuando el tracto respiratorio está afectado se observa además afección de todos los ganglios bronquiales (Tato, 1999).

Estas lesiones indican una ruta de transmisión fundamentalmente respiratoria aunque en algunos casos también puede producirse por vía digestiva (Clifton-Hadley & Wilesmith, 1991). Las fuentes de infección para el venado pueden ser tanto su propia especie como otras especies, las cuales dependen del ecosistema en el que nos encontremos. Aplicando técnicas moleculares se ha detectado en Estado Unidos, que una sola cepa puede ser compartida tanto por el ciervo como por el ganado y esta a su vez puede pasar a distintos animales, entre ellos carnívoros (Bruning-Fann *et al.*, 2001). En el caso de Inglaterra, se ha detectado el problema con la asociación bovino-ciervo-tejón, afectándose de forma secundaria el zorro, por su carácter carroñero y por compartir madrigueras con los tejones (Clifton-Hadley *et al.*, 1995). En Nueva Zelanda un estudio experimental demostró irrefutablemente la transmisión entre tlacuache y ciervo (Lugton *et al.*, 1997). Un grupo de seis ciervas sanas se introdujeron en un área de 0,8 Ha donde previamente se habían detectado tlacuaches tuberculosos. Los animales se mantuvieron durante 9 meses en la cerca, pero al quinto mes, cinco de las seis hembras introducidas enfermaron por TB. En los dos últimos meses, se introdujo un segundo grupo en un cercado colindante, que tras eliminar las ciervas del primer grupo, se pasó a la primera cerca. En el segundo grupo aparecieron cuatro hembras tuberculosas a los dos meses de ser introducidas en la cerca original. Durante el estudio se comprobó que el primer grupo había entrado en contacto con al menos seis tlacuaches enfermos. Mediante métodos moleculares se encontraron dos tipos genéticos comunes en las hembras enfermas y los tlacuaches tuberculosos detectados. Como complemento de este estudio se realizaron observaciones sobre el comportamiento de las ciervas. Se observó la existencia de dos hembras dominantes que fueron las primeras en enfermar.

Estas además, mostraron un comportamiento agresivo con los tlacuaches enfermos con los que entraron en contacto, llegando a morderles y patearles (Lugton *et al.*, 1997). El comportamiento dominante es por tanto un factor de riesgo bien caracterizado, y determinaría que los individuos dominantes de un grupo sean los primeros en infectarse e iniciar la cadena de transmisión (Sauter & Morris, 1995).

Previamente a este estudio, se consideraba que el ciervo era el responsable de la transmisión de la enfermedad al tlacuache debido a sus características lesiones (Livingstone, 1988) y a su vez, se considera a éstos últimos como los responsables de la mayoría de las infecciones en ciervo (Morris *et al.*, 1994). La biología molecular ha demostrado sobradamente que la enfermedad fluye sin obstáculos entre el ganado bovino, el ciervo y el tlacuache (Collins *et al.*, 1988).

## **2.2. LA GANADERIA BOVINA**

Un proceso esencial en la historia de las sociedades fue el paso de una economía de recolección a una economía de producción voluntaria de ciertas plantas y de ciertos animales. En un número restringido de lugares del mundo, ciertas sociedades, sometidas a tensiones particulares, inventaron el dominio de la reproducción de especies vegetales y animales. Para asegurar sus necesidades de alimento, cuero, huesos, y otros productos, las primitivas sociedades cazadoras-recolectoras debían seguir las migraciones de los grandes rebaños de bóvidos, cérvidos y otros animales. Hace unos 10.000 años los seres humanos del neolítico descubrieron que capturar animales, domesticarlos y mantenerlos vivos para utilizarlos cuando fuera preciso, les permitía reducir la incertidumbre que, en relación con las posibilidades de alimentación, les suponía el hecho de tener que depender de la caza. El proceso debió constar de un período de pre-domesticación en el que, en un primer momento, los seres humanos habituaron a sus presas a su presencia mientras las seguían en sus búsquedas de alimento para, posteriormente, irlas reteniendo; esto supuso que ellos mismos tenían que encargarse de suministrar alimento a los animales.

Así, consiguieron domesticar varias especies, encargándose de mover los rebaños de unas zonas de pasto a otras, emulando los movimientos naturales de los mismos, pero ahora bajo su control. Este sedentarismo estuvo unido al nacimiento de las prácticas agrícolas, que ligaban al hombre a la tierra y que, además, permitían el cultivo de forraje para los animales. De ese modo, cuando el hombre inició la domesticación de animales herbívoros como vacas, ovejas, cabras y abandonó la caza y la recolección de frutos, nació la ganadería, durante el neolítico y, muy probablemente, al mismo tiempo que la agricultura. Estos animales como el ganado vacuno sirvieron, además de proporcionar carne, como animales de carga de mercancías, tiro del arado, suministro de pieles y más tarde, de leche y derivados.

El estiércol acumulado en los establos, estabulados y cuadras, debe haber servido de abono para los primeros cultivos. La domesticación de animales permitió también utilizarlos para realizar trabajos agrícolas o transportar cargas. Además, los restos de las cosechas que no eran utilizables en la alimentación humana podían aprovecharse como alimento para el ganado (Castro-Martínez *et al.*, 2002). La producción cárnica se comenzó a desarrollar a finales del siglo XV, como una producción precaria, de escasos recursos, escasa comercialización y escaso consumo. Luego fue desarrollándose a gran escala, generando alta ganancia, y producción. En la actualidad, el área de extensión de la ganadería es superior que la de la agricultura, ya que el ganado puede ser criado en áreas donde el duro clima imposibilita el crecimiento de los cultivos, como en las altas montañas o las zonas con una aridez extrema. La estabulación del ganado y el desarrollo de nuevas técnicas de alimentación han contribuido para disminuir la dependencia de las condiciones del medio (Degerbol & Fredskild, 1970).

El país que cuenta con mayor número de cabezas vacunas es la India, donde predomina el Cebú animal considerado de calidad inferior en algunos países. En segundo lugar se encuentra EUA seguida por la Unión Soviética, Brasil, Argentina, China y México.

Desde los orígenes mismos de su ganadería, México ha dependido del exterior para mejorar la productividad de sus animales. Así, es referida la importación de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las primeras 50 cabezas de ganado bovino en 1521, por Gregorio Villalobos, durante la conquista de la Nueva España.

Desde ese momento y hasta finales del siglo XIX, este ganado de origen español prevaleció como única raza existente, reconocido como "criollo". Posteriormente, en 1896 se realizaron las primeras importaciones de ganado especializado en la producción de carne, principalmente Hertford y Pardo Suizo, para la región norte del país. En 1923 se efectuó la primera importación de ganado cebuino, en 1925 arribó a México el ganado Angus y, en 1929-1930 fueron importados los primeros Charoláis.

Desde ese entonces y hasta 1950, la ganadería bovina ha registrado varios descensos trascendentales en su productividad. Se citan la depresión ganadera de finales del siglo XVI, las sequías de finales del siglo XVIII, la Guerra de Independencia, el movimiento armado de la Revolución Mexicana y, recientemente, la fiebre aftosa y el reparto agrario.

Actualmente, la industria productora de carne de res no sólo continúa importando semen y pie de cría, sino que además se ha recurrido al exterior para abastecer la demanda de carne (Marin, 1995). La mayor parte del ganado existe en México es el llamado criollo descende del que introdujeron los españoles en la época colonial. Las entidades que destacan por poseer más cabezas de ganado en México son: Veracruz, Chihuahua, Jalisco, Sonora y Zacatecas. Las principales razas de México son la Holstein, Suiza, Jersey, Aberdeen, Angus y Hertford.

La ganadería bovina productora de carne para 1998 alcanzo 1.4 millones de toneladas de carne de bovino, siendo el Estado de Jalisco el mayor productor con el 15% del total nacional, en segundo lugar se situó al estado de Veracruz con el 13%, Chiapas con el 6% y Sonora, Chihuahua y Tamaulipas con el 5% cada uno.

En 1997 la aportación de carne de bovino por región ecológico-ganadera fue de 35% los trópicos, en zonas áridas y semiáridas del 33% y en zona templada del 32% (ASERCA, 1995a).

Zona Árida: Comprende los Estados de Chihuahua, Coahuila, Sonora, Baja California Sur, Baja California, Durango, Zacatecas, Nuevo León, Sinaloa y San Luis Potosí.

Región Semiárida: Comprende los Estados de Sonora, Tamaulipas, Zacatecas, San Luis Potosí, Nuevo León, Durango, Coahuila, Guanajuato, Jalisco, Hidalgo, Puebla, Querétaro, México, Oaxaca, Aguascalientes, Michoacán, Tlaxcala, Sinaloa y Veracruz.

Región Templada: Se localiza en los Estados de Chihuahua, Durango, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Chiapas, Puebla, Baja California y México principalmente.

Región de Trópico Seco: Yucatán, Guerrero, Sinaloa, Jalisco, Oaxaca, Tamaulipas, Michoacán, Chiapas, Nayarit, Veracruz, Campeche y Sonora.

Región del Trópico Húmedo: Se localiza en Veracruz, Campeche, Quintana Roo, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, Nayarit, Yucatán, Puebla, San Luis Potosí y Michoacán.

Región árida y semiárida: Predominan las razas europeas puras como la Hertford, Aberdeen, Angus y Charoláis, se caracteriza por ser un espacio donde se desarrolla tanto el sistema de producción vaca-becerro, como el de engorda en corral.

Región templada: En esta región predomina el ganado cruzado con razas europeas, gran parte de las explotaciones son extensivas, y sustentadas en el pastoreo durante la época de lluvias y completándose el resto del año con dietas de esquilmos agrícolas.

El sistema que predomina es de vaca-becerro para consumo local, o se envían para su finalización a corrales de engorda. La mayoría de las explotaciones son del tipo minifundista, pero existe una tendencia a su ampliación; aquí se realiza la cría, desarrollo y engorda con sistemas de tipo extensivo. En la engorda en corral, se ha ido estableciendo explotaciones con buena tecnificación, sin embargo, aún predominan las explotaciones de baja escala, inclusive de tipo familiar que utilizan sistemas de alimentación en los que se emplean productos de baja calidad nutrimental.

Región tropical: La alimentación del ganado depende totalmente de los agostadero, pastizales inducidos y praderas, con excepción del área del trópico

seco, donde es normal el uso de residuos de cosechas y otros recursos para la suplementación alimenticia en la época de sequía o para la engorda.

La diferencia en productividad de las regiones se debe a una menor eficiencia reproductiva del ganado en ambientes tropicales y a una mayor concentración de la actividad de engorda intensiva en las zonas áridas, semiáridas y templadas, donde hay las condiciones climáticas y disponibilidad de insumos para hacer posible la actividad. Es común que las áreas tropicales sean abastecedoras de ganado joven para engorda en las otras zonas.

Sistemas Básicos de Explotación de Bovino para Carne: Producción de novillos para abasto en pastoreo intensivo o corral de engorda, cría de becerros para exportación, producción de pie de cría y sistema de doble propósito.

La producción de carne se desarrolla en todos los estados del país, se aclara que los tipos de explotación dependen en gran medida de la zona geográfica y de la estacionalidad. En este sentido los factores climáticos influyen directamente en el incremento de la producción, llegando a su nivel más alto en los meses de Noviembre y Diciembre (ASERCA, 1995b).

### **2.2.1. Importancia económica de la tuberculosis bovina**

La Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, tiene como objeto cuidar la producción pecuaria y consecuentemente hacer la prevención, control y erradicación de las plagas y enfermedades que como la Tuberculosis afectan a la ganadería nacional tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos, y que además es una de las zoonosis más importantes.

Para elevar la producción y mejorar la calidad sanitaria de los productos de origen animal, es necesario establecer un control estricto sobre la tuberculosis bovina que permita a la ganadería nacional desarrollarse en mejores condiciones sanitarias, así como mantener e incrementar la exportación de ganado bovino en pie hacia otros países, entre los que se encuentran los Estados Unidos de América. Actualmente México exporta a los Estados Unidos de América en promedio 1,200,000 cabezas de ganado bovino castrado en pie anualmente, representando divisas estimadas de 480 millones de dólares; La exportación de

ganado bovino en pie a los Estados Unidos de América, puede verse afectada por la presencia de esta enfermedad, representando una pérdida de divisas de 480 millones de dólares anuales; Los requisitos sanitarios para la citada exportación son más exigentes de los que se imponían anteriormente, lo que ha impactado en la movilización internacional y la comercialización nacional, por lo que se deben modificar algunos requisitos zoonosanitarios con la finalidad de establecer equivalencias con los países que se tiene intercambio comercial y proteger la viabilidad de los diferentes eslabones de la cadena de valor de la ganadería bovina; la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina ha tenido grandes avances en el control y erradicación de esta enfermedad, en concordancia con los conceptos de regionalización y compartimentación reconocidos internacionalmente por la Organización Mundial de Comercio (OMC) y la Organización Mundial de Salud Animal (OIE);

En nuestro país la extracción anual promedio de bovinos es de 6.7 millones de cabezas, de las cuales 1.2 millones se exportan, 2.3 millones se engordan de manera intensiva en corrales y el resto comprende al ganado que se engorda de manera extensiva y el sacrificio de ganado adulto; lo que representan una derrama económica mayor a los \$19,300 millones de pesos; más de \$1,754 millones de dólares.

Al controlar y erradicar la tuberculosis bovina, se eliminará una fuente potencial de infección para el humano, situación que ha sido demostrada en varios países a través de campañas de prevención, control y erradicación de la tuberculosis.

Se tiene demostrado que en los animales afectados, la producción de leche disminuye hasta en un 17% además los 9.5 mil millones de litros de leche que se producen en el territorio nacional equivalente a 3,516 millones de dólares, el 72% de la producción se pasteuriza o industrializa y el 28% se consume cruda o se transforma en derivados lácteos sin proceso térmico, lo que implica un riesgo zoonosanitario y de salud pública, además de considerar otra forma de transmisión por aerosoles debida a la convivencia directa con ganado infectado de Tuberculosis Bovina que pueda estar eliminando los bacilos.

Para conseguir los propósitos enunciados, de indudable interés público y social, es necesario establecer una campaña nacional, obligatoria y permanente, para prevenir, controlar y erradicar la Tuberculosis bovina, por lo que el 8 de marzo de 1996, se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), debido a los avances de la campaña antes señalada y a la dinámica de comercialización, se hace necesario actualizar y modificar diversos puntos de la Norma con el fin de que la misma sea aplicada correctamente, por lo que el 27 de agosto de 1997 se publicó el Proyecto de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), para opinión pública durante 90 días, publicándose las respuestas a los comentarios recibidos en relación a dicho proyecto el 8 de julio de 1998. Adicionalmente se publica en el Diario Oficial de la Federación el día 3 de diciembre del 2007 el Proyecto de modificación a la norma oficial mexicana NOM-031-ZOO-1995 Campaña nacional contra la tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) y en el Diario Oficial del viernes 9 de abril de 2010 se estima la fecha de terminación a diciembre del 2010 (SAGARPA, 1998).

### **2.2.2. Situación epizootiológica de tuberculosis en el área de estudio**

El 14 de Noviembre de 1989, se creó el Comité Estatal para el Fomento y Protección Pecuaria de Aguascalientes., S.C., con la participación conjunta del gobierno federal, gobierno estatal y productores, y para el año de 1997, se intensifica su actividad en materia de sanidad, gracias al programa de alianza para el campo, llevando a cabo las campañas contra: La Tuberculosis bovina, brucelosis, garrapata (*Boophilus spp.*), fiebre porcina clásica y enfermedad de Aujeszky, enfermedad de Newcastle, salmonella aviar, además del control de la movilización del ganado que entra al estado, y la vigilancia de encefalopatía esponjiforme bovina (EEB).

El objetivo del CEFOPPA se estableció para prevenir la entrada de enfermedades y plagas, que afectan a los animales, así como controlar y erradicar las existentes en el territorio de la entidad, lograr el reconocimiento de la condición sanitaria por

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

las autoridades nacionales y de otros países mediante la identificación de campañas zoonosanitarias que permitan incrementar la productividad de la ganadería para mejorar la salud pública y facilitar la comercialización de bovinos, porcinos, aves, equinos, ovinos, caprinos y abejas, así como sus productos y subproductos.

Las acciones de CEFOPPA tienen un soporte jurídico en la Ley Federal de Sanidad Animal, las Normas Oficiales Mexicanas, la Ley de Ganadería para el Estado de Aguascalientes y los reglamentos que dan sustento a los Consejos Estatal Agropecuario y Estatal Zoonosanitario.

Para el combate de la tuberculosis bovina, el estado de Aguascalientes se divide para ésta Campaña en dos Zonas, delimitadas de manera natural por la zona cerril, en la cual se concentra el ganado bovino productor de carne a esta se le denomina Zona "A" y a la parte llana conocida como el Valle de Aguascalientes, se le denomina zona "B" ya que es una importante cuenca lechera a nivel nacional (figura 1).

Actualmente la Zona "A" del estado se encuentra en FASE de ERRADICACIÓN.

A partir del 10 de Diciembre del 2004, se contaba con la Categoría III, como Acreditado Preparatorio con Waiver, ante el Comité Binacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis en los Animales, lo que nos permitía hasta finales del 2006 la exportación de ganado en pie a los Estados Unidos de América.

La Zona "B" del estado se encuentra en Fase de CONTROL.

El comité realiza actividades de muestreo contra ésta enfermedad en diversas comunidades del estado, proporcionando de forma gratuita, los insumos y la ejecución mediante personal del propio comité.

Se está trabajando en la zona "A" para que sea reconocida nuevamente en la clasificación de categoría III, por el Comité Binacional.

Para evitar la entrada de animales de la zona "B" a la zona "A", se cuenta con cuatro puntos de inspección zoonosanitarios en los diferentes accesos a la zona cerril del estado, amparados por un Decreto publicado en el Periódico Oficial del Gobierno del Estado.



Figura 1. Puntos de verificación zoonosanitaria interestatales (Dividen zona A y B) y estatales de Aguascalientes operados por el CEFOPPA.

A partir del 17 de Noviembre del 2003, se limita el paso de animales de una zona a otra como protección de la zona de baja prevalencia donde se encuentra el área natural protegida (figura 1). Además se realiza anualmente un muestreo de la Zona Buffer, que es el área que delimita las dos zonas del estado, con la finalidad de evitar una contaminación de la zona “A” con animales reactivos a tuberculosis bovina.

Otra acción que se realiza en ésta campaña es la toma de muestras de nódulos linfáticos en canales bovinos que presentan lesiones sugestivas a Tuberculosis en las diferentes plantas de sacrificio del estado de Aguascalientes, así como el seguimiento de esos casos por los epizootiólogos del CEFOPPA (Tabla 2).

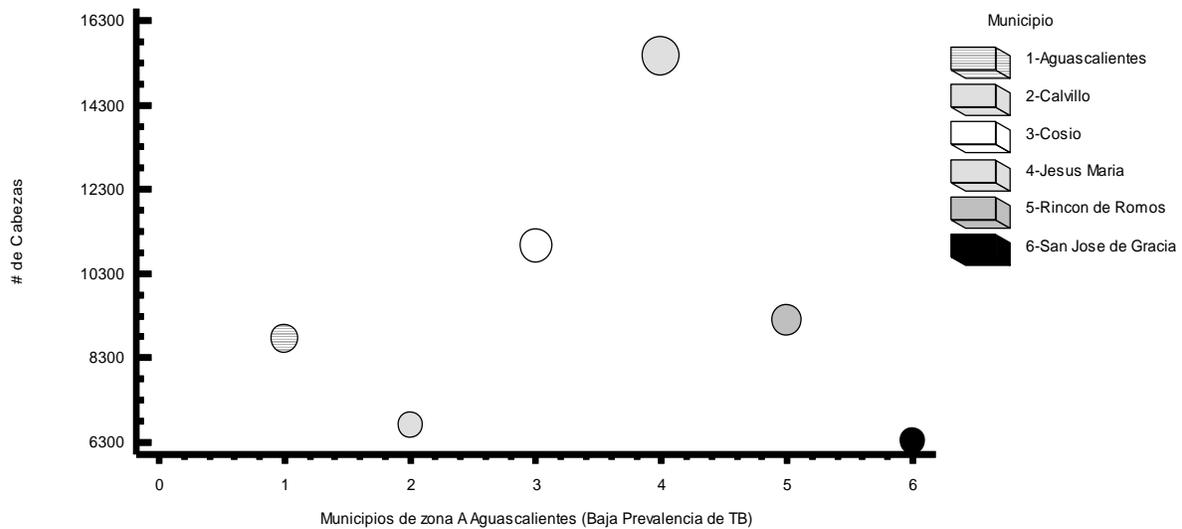


Figura 2. Número de cabezas por municipio del estado de Aguascalientes zona A división epidemiológica del CEFOPPA. (INEGI, 2009)

Tabla 2. Plantas de sacrificio de ganado bovino en el Estado de Aguascalientes

Planta de sacrificio	Bovinos sacrificados (Promedio mensual)
RASTRO DE RINCON DE ROMOS	71
RASTRO DE CALVILLO	237
FREASA	4,696
UGASA TIF 45	1,582
RASTRO MUNICIPAL AGS.	1,996
PLANTA JESSY	2,409
TOTAL	10,991

Fuente CEFOPPA (2009)<sup>1</sup>.

### 2.3. LOS RUMIANTES SILVESTRES EN AGUASCALIENTES

México es un país dotado de una gran riqueza biótica; su ubicación en el área de confluencia de las regiones Neártica y Neotropical, aunado a su accidentada orografía, ha permitido la presencia de múltiples ecosistemas en los cuales se han desarrollado innumerables especies vegetales y animales.

El estado de Aguascalientes tiene una superficie pequeña (5,589 km<sup>2</sup>), sin embargo, posee una biodiversidad importante gracias a su ubicación geográfica, ya que permite la existencia de varios ecosistemas naturales y encontramos

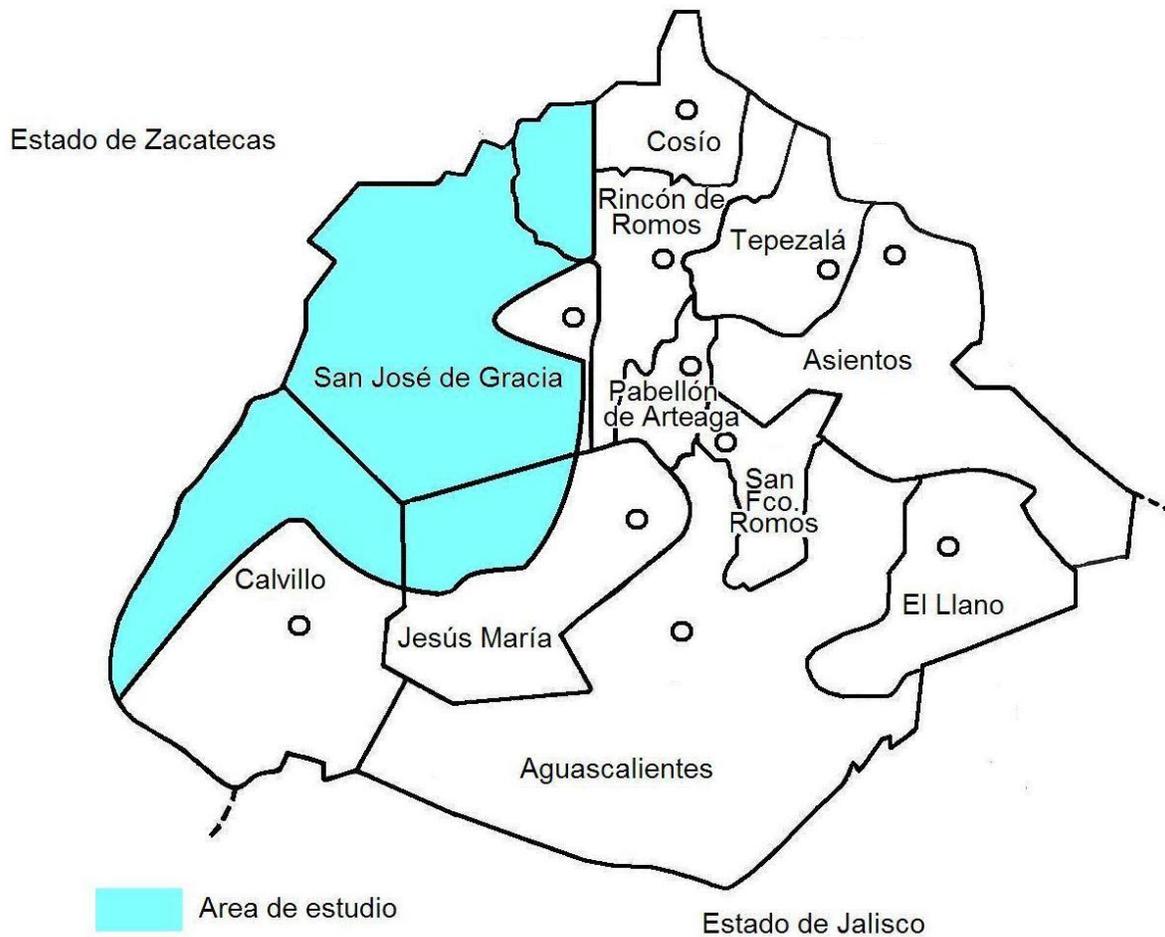
<sup>1</sup> Comunicación personal. Registros de movilización de ganado bovino al sacrificio.

especies de fauna silvestre muy apreciadas por el hombre debido a los distintos usos que se les han encontrado; una de ellas es el venado cola blanca. Este mamífero se ha considerado desde épocas prehispánicas, como una de las piezas de cacería más cotizadas en nuestro continente. Además del venado, existen otras especies en el estado cuyo valor cinegético es importante, como el guajolote silvestre (*Melleagris gallopavo*), el puma (*Puma concolor*), el jabalí (*Dicotyles tajacu*) y la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*) (Villalobos, 1998).

El área protegida de la Sierra Fría, comparte características de la Sierra Madre Occidental de la que forma parte. En ella se encuentran el 90 % de los bosques templados de Aguascalientes. La Sierra Fría ha funcionado como un reservorio natural de especies silvestres, cuyas poblaciones han disminuido considerablemente en otras regiones del país.

El área natural protegida tiene registradas 87 especies de mamíferos, 109 de aves y 32 de anfibios y reptiles, siendo algunas de ellas; el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), puma (*Puma concolor*), jabalí de collar (*Dicotyles tajacu*), gato montés (*Lynx rufus*), cacomixtle (*Bassariscus astutus*), zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), murciélago rojizo (*Lasiurus borealis*), águila real (*Aquila chrysaetos*), halcón peregrino (*Falco peregrinus*), buho moteado (*Strix occidentalis*), halcón mexicano (*Falco spp.*), codorniz moctezuma (*Cyrtonyx montezumae*), cardenal común (*Cardinalis cardinalis*), cardenal negro (*Painopepla nitens*), carpintero (*Melanerpes spp.*), coa (*Trogon elegans*), calandria (*Icterus spp.*), víbora de cascabel (*Crotalus spp.*), lagarto cornudo (*Phrynosoma orbiculare*), tortuga (*Kinosternon integrum*), sapo (*Bufo spp.*) y lagartija (*Sceloporus spp.*).

En cuanto a vegetación se tienen registradas 591 especies siendo las principales: pino (*Pinus spp.*), encino (*Quercus spp.*), cedro (*Juniperus spp.*), manzanita (*Arctostaphylos spp.*), gatuño (*Acacia gregii*), palma (*Yucca spp.*), nopal (*Opuntia spp.*), engorda cabra (*Jalea tuberculata*) (SEDESOL, 1994). No obstante la consideración de la fauna silvestre como un recurso natural renovable tiene sus límites, y al sobrepasarlos corre el riesgo de extinguirse.



*Figura 3. Localización geográfica del área natural protegida “Sierra Fría” Aguascalientes.*

El programa de protección de los recursos naturales del gobierno del estado de Aguascalientes tiene su origen desde 1975. Esto nació como un programa federal a cargo de la Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG), fue continuado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) y después por la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE) hasta 1991. En 1992, el programa fue adoptado por el gobierno del estado (Villalobos, 1998).

Entre 1940 y 1970, en Aguascalientes y en otros estados se incrementó la cacería debido al aumento de armas de fuego, entre ellas el rifle calibre .22, lo que trajo como consecuencia la paulatina desaparición de especies de fauna silvestre como el lobo mexicano y el oso negro en estados del norte de país.

A raíz de la inquietud de un grupo de personas de Aguascalientes para proteger y conservar estos recursos naturales, se creó en 1975 el programa de conservación

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y aprovechamiento cinegético del venado cola blanca en el área de la Sierra Fría, con el objetivo de combatir la cacería furtiva y promover la investigación de las poblaciones de fauna silvestre. En ese mismo año se realizó la primera estimación poblacional de venado cola blanca con el apoyo de la Dirección General de Fauna Silvestre de la Secretaría de Agricultura y Ganadería, y se estimó una población de 0.67 venados/Km<sup>2</sup> en los terrenos de la Sierra de San Blas de Pabellón, cifra que nos podría indicar que el venado cola blanca estuvo a punto de ser erradicado del estado. Este programa tuvo buenos resultados frenando la cacería furtiva en todo el estado, principalmente en la región de Sierra Fría, contando con un total de 14 inspectores de ecología los cuales realizaban operativos de vigilancia móvil en vehículo automotor y a caballo, deteniendo a los cazadores que no poseían sus permisos de cacería; las armas se les recogían precautoriamente y se les infraccionaba aplicándoles una multa que variaba dependiendo de la gravedad de la falta o del delito en materia de caza (Villalobos, 1998).

Hace aproximadamente 30 años, el venado cola blanca estuvo prácticamente en los límites de su extinción debido a diversos factores, como la caza furtiva e indiscriminada, la consideración de algunos ganaderos, en el sentido de que los venados competían por alimento con su ganado y eran transmisores de algunas enfermedades considerándolos como indeseables, aunque se ha demostrado en áreas libres de tuberculosis bovina los venados pueden fungir como reservorios (Palmer *et al*, 2004), la destrucción del hábitat natural al adoptar modelos de producción importados basados en desmontes masivos y la introducción de pastos exóticos a la región, la falta de un valor económico de la especie, desde el punto de vista cinegético, la inexistencia de un marco jurídico adecuado en materia de aprovechamiento comercial de fauna silvestre, la incidencia de parásitos como el gusano barrenador (*Cochliomyi hominivorax*) que todavía está presente en el sur del país y la falta de tecnología en manejo, genética, sanidad y reproducción enfocados a las especies silvestres (Villareal, 1988).

Los actuales programas de gobierno consideran la conformación de Unidades de Producción de Fauna Silvestre en cualquiera de sus dos modalidades: intensiva (criadero intensivo) o extensiva (rancho cinegético), como una estrategia nacional

para el desarrollo social y ecológico sustentable, otorgando todas las facilidades necesarias para el productor, sin considerar las implicaciones sanitarias especialmente en la modalidad de intensiva.

### 2.3.1. Características del venado cola blanca

Desde un punto de vista geográfico y fenotípico, los cérvidos son un grupo extraordinario y diverso de ungulados con aproximadamente 43 especies y 206 subespecies. Estos artiodáctilos se caracterizan por la presencia de astas, las cuales pierden una vez al año. Las astas son exclusivas de los machos, excepto el caribú, los ancestros de los cérvidos pueden rastrearse hasta el oligoceno temprano para Asia, el oligoceno tardío para Europa, mioceno temprano para América del norte y pleistoceno para América del sur. En el pleistoceno habitó el cérvido gigante *Megaloceros*, esqueletos completos se han encontrado en turberas en Irlanda, algunos individuos tenían astas de medidas sobre tres metros y medio de medida de punta a punta (Gould, 1974).

Clasificación taxonómica del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus couesi*) de Sierra Fría, Aguascalientes (Wilson & Reeder, 1993).

Reino: Animalia  
Subreino: Metazoa  
Phylum: Chordata  
Subphylum: Vertebrata  
Clase: Mammalia  
Orden: Artiodactyla  
Suborden: Ruminantia  
Familia: Cervidae  
Género: *Odocoileus*  
Especie: *O. virginianus*  
Subespecie: *O. v. couesi*

La subespecie en Aguascalientes de venado cola blanca (*O. v. couesi*) tiene su época de apareamiento generalmente de la segunda quincena de diciembre a mediados de febrero, presentando variaciones de acuerdo a la época de frío. El periodo de gestación promedio es de  $210 \pm 5$  días. La época de nacimiento de los cervatos comienza en la primera quincena de julio y terminan a mediados de

septiembre. El crecimiento de las astas comienza a finales de mayo hasta la segunda quincena de octubre. La caída de las astas ocurre de mediados de marzo a la primera quincena de mayo, ocasionado por una repentina baja en las concentraciones de la hormona testosterona en el torrente sanguíneo (Hall & Kelson, 1959).

La coloración externa de abril a octubre es café rojizo claro, comúnmente llamado “alazán”, mientras que de octubre a marzo cambia a un café grisáceo claro u oscuro (Hall & Kelson, 1959). El venado cola blanca mide de 1,000 a 1,300 mm de altura a la cruz, su cola mide de 180 a 270 mm. El peso de los animales vivos varía en los machos de 36 a 57 kg y en las hembras de 27 a 45 kg. Las astas consisten en una rama central doblada hacia adelante con puntas individuales sin ramificar; la glándula metatarsal mide aproximadamente 25 mm y se localiza en la superficie externa de la parte baja de la pata trasera; la glándula preorbital es pequeña, y se encuentra en una penetración superficial en el cráneo. Poseen una cola larga con la punta del lado dorsal color oscuro y toda la parte ventral de color blanco; cuando el venado está en alerta o asustado la levanta y eriza los pelos de la cola, dejando ver su color blanco (Leopold, 1959).

### **2.3.2. Otras subespecies mexicanas de venado cola blanca**

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es una especie de fauna silvestre que pertenece a la familia Cervidae, la cual incluye entre otras especies del norte de América, al alce (*Alces alces*), elk o wapití (*Cervus elaphus*), caribú (*Rangifer tarandus*), venado bura (*Odocoileus hemionus*) y temazate (*Mazama americana* y *M. gouazoubira*).

Taxonómicamente, el venado cola blanca está incluido en orden de los artiodáctilos (ungulados), que se caracterizan por poseer una pata con casco o pezuña y con dedos pares. Se incluye además dentro del suborden de los ruminantes, carecen de incisivos superiores y cuentan con un estómago de cuatro cavidades: Rumen o panza, retículo o bonete, omaso o librillo y abomaso o cuajar (Villareal, 1988).

En México existen cuatro especies de cérvidos: venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), venado bura (*O. hemionus*) y temazate (*Mazama americana* y *M. gouazoubira*); el venado cola blanca es la única de estas tres especies de cérvidos, que ha tenido la capacidad de distribuirse sobre la mayor parte del territorio mexicano, con la excepción de la península de Baja California. La superficie del territorio mexicano es de 1'958,201 km<sup>2</sup>, y la superficie original de distribución del venado cola blanca en México 1'814,805 km<sup>2</sup>, lo cual representa el 92.7 % del territorio nacional.

En el continente americano se reconocen principalmente 38 subespecies de venado cola blanca: 30 subespecies para la parte norte y centro del continente y 8 subespecies para la parte sur del continente (Hall, 1981).

La adaptabilidad del venado cola blanca es una de las más importantes características ecológicas de esta especie y se puede corroborar por su amplia distribución sobre la mayor parte del Continente Americano, desde Canadá (48° de latitud norte) hasta el Ecuador. Esto le permite desarrollarse con éxito en una gran diversidad de ecosistemas, cuyo clima, suelo, topografía y vegetación natural presentan contrastes tan marcados, que muy pocas especies animales sin posibilidades de migración tienen en cuanto a capacidad de adaptación y sobrevivencia con éxito se refiere. La importancia ecológica del venado cola blanca como especie, no sólo queda demostrada por su adaptabilidad a climas, suelos, topografías y biomasa tan contrastantes como se ha señalado; sino que también lo es el hecho de que haya podido adaptarse y sobrevivir con éxito en zonas con enfermedades y parásitos (internos y externos), que sin lugar a dudas presentan contrastes muy marcados y una barrera natural para muchas especies de la fauna silvestre del continente.

Pero si bien, es cierto que su flexibilidad de adaptación es quizás una de las características más importantes desde el punto de vista ecológico, su alto índice de reproducción (un cervato por hembra al año en el primer parto y comúnmente dos cervatos por hembra al año en el segundo y posteriores partos) es otro de los factores que hacen que esta especie sea una de las más importantes desde el punto de vista ecológico; ya que le permite restituir sus poblaciones a corto plazo

si se le proporcionan las condiciones de protección y hábitat requeridas: alimento, cobertura vegetal, agua y espacio físico. Complementan este valor ecológico, el hecho insoslayable de que no obstante que ha sido una de las especies de fauna silvestre más codiciadas (por su carne, piel y astas), perseguidas y cazadas (durante siglos); ha sido capaz de sobrevivir a esta fuerte "presión de persecución" a la que ha sido sometida, gracias a sus desarrollados sentidos de la vista, oído y olfato, que la hacen ser una de las especies más difíciles de cazar y la más codiciada de América desde el punto de vista de la caza deportiva (Villareal, 1988).

Se ha estimado (Leopold, 1959) para México que 14 de las 30 subespecies de venado cola blanca reportadas para el norte y centro del continente americano representan el 47 % de las subespecies que existen desde Canadá hasta Panamá, y Villareal realizó una descripción de las subespecies de venado cola blanca y la superficie que ocupan en el territorio mexicano (tabla 3).

Es muy importante destacar, que las subespecies son grupos de individuos de una misma especie que por condiciones particulares de localización geográfica, clima, alimentación y otros factores bióticos y abióticos de su hábitat natural, adquieren características morfológicas particulares: corporales, pelaje y astas entre otras. Después de cientos o miles de años de adaptación a un medio natural en particular, los individuos de una subespecie adquieren incluso algunas características genéticas particulares, que les permiten vivir en medios ambientes donde otros individuos de la misma especie fracasarían por no estar adaptados y como resultado del ataque de parásitos, enfermedades, depredadores u otros factores adversos.

Tabla 3. Subespecies de venado cola blanca y situación actual en México

Subespecie	Situación actual	Posibilidades de éxito	Localidades prioritarias	Superficie (porcentaje que representa la sub-especie en México)
<i>Odocoileus virginianus texanus</i>	Muy buena	Excelentes	Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas y Chihuahua.	68,358 km <sup>2</sup> (3.8)
<i>O.v. couesi</i>	Buena	Buenas	Sonora, Chihuahua, Durango y Aguascalientes.	515,052 km <sup>2</sup> (28.3)
<i>O.v. carminis</i>	Buena	Buenas	Coahuila.	187,028 Km <sup>2</sup> (10.3)
<i>O.v. miquihuanensis</i>	Buena	Buenas	Coahuila.	174,142 km <sup>2</sup> (9.6)
<i>O.v. acapulcensis</i>	Regular	Medianas	Sur de Michoacán y Guerrero.	59,537 km <sup>2</sup> (3.2)
<i>O.v. veraecrucis</i>	Regular	Medianas	Sur de Tamaulipas.	134,206 km <sup>2</sup> (7.3)
<i>O.v. truei</i>	Regular	Medianas	Sur de Quintana Roo.	41,106 km <sup>2</sup> (2.2)
<i>O.v. oaxacensis</i>	Regular	Medianas	Región de la Sierra de Oaxaca.	30,000 km <sup>2</sup> (1.7)
<i>O.v. thomasi</i>	Regular	Medianas	Campeche.	105,247 km <sup>2</sup> (5.8)
<i>O.v. sinaloae</i>	Mala	Bajas	Sinaloa y Jalisco.	167,709 km <sup>2</sup> (9.2)
<i>O.v. nelsoni</i>	Mala	Bajas	Chiapas.	37,107 km <sup>2</sup> (2.0)
<i>O.v. mexicanus</i>	Muy mala	Muy bajas	Michoacán, Puebla, Querétaro, Guerrero.	174,404 km <sup>2</sup> (10.0)
<i>O.v. yucatanensis</i>	Muy mala	Muy bajas	Campeche y Quintana Roo.	80,445 km <sup>2</sup> (4.4)
<i>O.v. toltecus</i>	Muy mala	Muy bajas	Oaxaca.	40,464 km <sup>2</sup> (2.2)

(Modificado de Villareal, 1998).

En el sureste de los Estados Unidos y Noreste de México, el venado cola blanca habita zonas con vegetación predominante de pino y encino, el venado bura o mula habita zonas más abiertas y áridas aunque en algunos zonas de interfase

vida silvestre/ganadería existe la posibilidad de que las dos especies se encuentren gracias a la migración constante del venado cola blanca hacia el oeste, lo que incrementa la posibilidad de transmisión de algunas enfermedades parasitarias, para las cuales el venado cola blanca tiene una resistencia natural y en cambio el bura es altamente susceptible. En zonas donde se han observado encuentros entre las dos especies, existe una dominancia del venado cola blanca (Hall, 1981).

Las subespecies constituyen un patrimonio biológico muy importante de la biodiversidad de un país; y por lo mismo, deben de conservarse y ser tratadas incluso como especies endémicas y no ser transferidas o introducidas a otras regiones geográficas-ecológicas en donde serían “exóticas”, ya que perderían su potencial genético original (Villareal, 1988).

Cazadores con gran experiencia afirman que en Aguascalientes la variedad *couesi* tiene una gran demanda en comparación con otras subespecies del país, después del texano (Medina, 1988).

Primero al no existir una demanda real por parte de los cazadores deportistas sobre las 11 subespecies restantes de venado cola blanca mexicanas, tampoco existe la posibilidad de obtener un beneficio económico importante derivado de su aprovechamiento cinegético, por lo tanto, no existe el mismo interés por parte de ganaderos, organizadores cinegéticos y tenedores de la tierra (manejadores del hábitat natural) por proteger y fomentar estas subespecies, y segundo, los ganaderos, inversionistas y tenedores de la tierra están intentando establecer criaderos de las subespecies texano y *couesi*, en regiones del país que no corresponden a las áreas de distribución ecológica y hábitat original de estas subespecies. A futuro, existan o no criaderos con cerco de contención (cerco perimetral con malla tipo “venadera”), existe el riesgo potencial de la mezcla de subespecies; y por lo tanto, de la pérdida de las nativas, lo cual va en detrimento de la conservación de la importante biodiversidad de fauna mexicana (Benavides, 1994).

En los últimos años en nuestro país, la caza sobre las especies cinegéticas mayores, se ha convertido en una actividad con orientación empresarial, considerándose como una inversión rentable la realizada en este tipo de cotos. Sin embargo, la ordenación cinegética en ranchos de caza mayor solamente ha sido posible con el cercado, mediante el alambrado de todo su perímetro exterior, lo que ha dado lugar a un importante problema: un alarmante aumento de la consanguinidad, pérdida de variabilidad genética y un contacto estrecho entre las poblaciones nativas y domesticas aumentando el riesgo epidemiológico, con la subsecuente pérdida de la calidad de los trofeos a consecuencia de la profunda alteración de los movimientos de los animales, hecho particularmente grave en la época de brama o celo.

### **2.3.3. Etología de los rumiantes silvestres y relación con la epidemiología de la tuberculosis**

**2.3.3.1. Conducta alimentaria.** Los venados invierten más tiempo en alimentarse que cualquier otra actividad, cuando viajan a las áreas de alimentación normalmente se mueven en una sola línea con paso continuo en caminos ya bien preestablecidos y ocasionalmente se detienen por momentos cortos a alimentarse, cuando llegan a el área de alimentación se distribuyen en la misma y normalmente esta acción no dura lo suficiente como para consumir todo el recurso disponible (Michael, 1970). Esto demuestra que la conducta alimentaria natural evita el contacto con alimento que se pueda encontrar contaminado.

**2.3.3.2. Conducta social.** En la mayoría de las áreas, los venados son animales del bosque y sus zonas de interfase vida silvestre/ganadería, donde se encuentran en pequeños grupos, aunque en algunas zonas del oeste de los Estados Unidos se han observado en áreas abiertas de predominancia agrícola, donde los grupos son mayores. Normalmente los grupos sociales se conforman de dos tipos, primero hembras adultas y sus cervatos, segundo machos adultos y quizá algunos jóvenes. Los dos grupos no se reúnen hasta el otoño-invierno en grupos mayores

para la temporada de reproducción, donde quizá la interacción alimentaria se dé entre grupos.

El primer grupo social normalmente se encuentran unidos exceptuando la temporada de nacimientos donde las hembras se separan para tener sus crías. El segundo grupo social de los machos igualmente se mantiene unido y se han observado pausas entre actividades principalmente en machos jóvenes donde se acicalan; otro factor importante es la expulsión de los jóvenes de los grupos sociales donde por un tiempo pueden ser aceptados parcialmente por cualquiera de los dos (Hirth, 1973). Reportes indican que el comportamiento de dominancia es un factor de riesgo comprobado pero inevitable, se ha visto que las hembras dominantes son las primeras en contagiarse mientras que las dominadas y tímidas no suelen hacerlo (Lugton *et al.*, 1997).

**2.3.3.3. Conducta reproductiva.** La época de celo ó brama consiste en una activación del comportamiento sexual del macho que dura entre tres o cuatro meses, empieza con la presencia de luchas para determinar su dominancia entre ellos y termina después de la época del apareamiento.

En gran parte de Canadá y Estados Unidos de América, la brama empieza en septiembre y termina en enero, y el fotoperiodo probablemente es el factor responsable de disparar la aparición de la misma. En las regiones más norteadas de los Estados Unidos de Norteamérica, las variaciones de la presentación de la brama parecen ser mínimas (White, 1973), a diferencia de las zonas del sur, donde las variaciones son muy significativas y ocurren de un estado a otro. Se ha demostrado que en distancias de 161 km, la variación puede ser de hasta dos meses. Los registros con una variación más pequeña se han reportado en los venados cola blanca del sur de Florida y de Venezuela, donde la brama ocurre todo el año (Brox, 1972). Por lo anterior, en el estado de Aguascalientes, la época de brama también se ve influenciada por el fotoperiodo, ya que la muda comienza de mediados de marzo hasta mayo y por lo tanto, la brama comienza desde la segunda quincena de diciembre a mediados de febrero (Hall & Kelson, 1959).

El macho dominante probablemente se apareará con la mayoría de las hembras en su zona de influencia. Machos con buena condición corporal retienen sus astas por mayor tiempo que aquellos que presentan una pobre condición (Ozoga & Verme, 1982).

El periodo de tiempo de brama es extenuante para los machos, el debilitamiento físico que ocurre en este tiempo puede afectar el desarrollo de las astas, su resistencia a las enfermedades y el rango social, particularmente en aquellos territorios con mayor densidad de machos en edad de competir (Ozoga & Verme, 1982). Esta situación se complica al descuidar su alimentación y puede ser peor gracias a la ayuda del manejo cinegético. El aumento de la densidad y la suplementación de alimentos en sitios concretos impulsan a un número mayor de interacciones entre los machos (Schmitt *et al.*, 1997). A pesar de este resultado se considera que la transmisión horizontal asociada al cortejo y la lucha entre machos es fundamental para la dispersión de la enfermedad (Morris & Pfeiffer, 1995) y que por tanto los machos podrían tener unas prevalencias mayores.

Dentro del grupo de los machos, tendríamos los machos sub-adultos, particularmente estresados y encargados de diseminar horizontalmente la enfermedad a grandes distancias (Morris & Pfeiffer, 1995). Este grupo parece efectivamente estar más predispuesto, produciéndose en ellos una enfermedad de curso más agudo que en los adultos. (O'Reilly, 1995). Apoyando esta teoría, se han detectado diferencias significativas en la edad de los sexos afectados. La media de edad en los machos es de tan sólo 2,5 años, frente a la de las hembras con 3,5 años (Schmitt *et al.*, 1997), detectándose animales infectados al año (Nugent & Lugton, 1995). Según algunos autores los animales jóvenes contraerían la enfermedad de los adultos mediante transmisión horizontal. La teoría de la transmisión desde machos adultos a jóvenes requeriría factores ambientales externos que facilitaran las interacciones entre dichos grupos que de forma natural no contactarían, siendo fundamentalmente las densidades artificiales el mayor factor de riesgo (Schmitt *et al.*, 1997) La transmisión horizontal de madre a cría, no parece ser importante ya que en áreas de elevada prevalencia en hembras

(cerca de un 50%) no se detectan elevados niveles en los cervatillos (Lugton *et al.*, 1997).

En Canadá, Estados Unidos de América y México, la pérdida del terciopelo es el indicador del inicio de la brama, lo cual coincide con un aumento de los niveles de andrógenos (Mirarchi *et al.*, 1977). La pérdida del terciopelo ocurre primero en machos viejos y gradualmente en los más jóvenes.

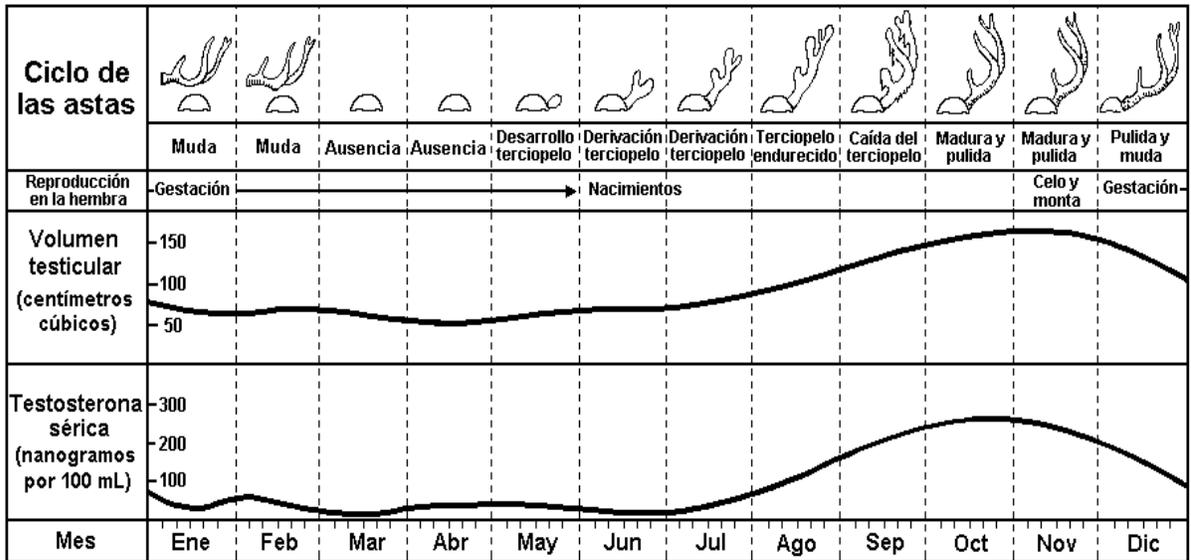


Figura 4. Relación entre el crecimiento de las astas, volumen testicular y testosterona sérica del macho y estado reproductivo de la hembra del venado cola blanca, (adaptado de (Mcmillin *et al.*, 1974)

**2.3.3.4. Conducta maternal de los venados.** La interacción entre cervato y madre durante el primer mes de vida se enfoca a la supervivencia del cervato, durante este periodo el área se reduce y las hembras activamente reaccionan agresivamente contra otros individuos para alejarlos del territorio, también se ha observado que las hembras dominantes retornan al mismo sitio cada periodo para criar sus cervatos además las hembras jóvenes tienden a ubicar sus áreas de crianza cerca del territorio materno (Ozoga & Verme, 1982).

**2.3.3.5. Conducta interespecifica con otros ungulados.** Principalmente los encuentros con otros ungulados como el venado bura (*Odocoileus hemionus*) se dan en áreas donde sus territorios se sobreponen y se ha observado por ejemplo

en Arizona que los venados cola blanca y buras se ignoran mutuamente en un 50% de la veces ha distancia de 50 metros, aunque los buras normalmente por su tamaño dominan (Anthony & Smith, 1997). Los venados reaccionan normalmente a la interacción con el ganado presentando total indiferencia o poca precaución, solo se reporta competencia por zonas de sombra para echaderos, además los comederos del ganado pueden ser utilizados por los venados en épocas secas (Michael, 1970). El ganado compite por el alimento con los venados estacionalmente por algunos tipos de alimento, cuando el ganado utiliza zonas de bosque para pastar esto puede ocasionar el abandono del área por los venados. Aunque pasturas de alta calidad pueda atraer a los venados, la competencia en estas áreas entre las especies es mínima normalmente. En algunas áreas de los Estados Unidos criadores de ganado temen la trasmisión de parásitos y enfermedades provenientes de los venados, aunque se ha demostrado que está relacionado directamente con la densidad. El venado cola blanca en el norte de los Estados Unidos está demostrado ser el reservorio de tuberculosis y parásitos como la fasciola gigante (*Fascioloides magna*), que afecta a los bovinos y los ovinos y el gusano de las meninges (*Pneumostrongylus tenuis*), el cual afecta a los ovinos y no a los bovinos (Davidson *et al.*, 1981).

La suplementación de alimento ocurre normalmente en invierno por la escasez y esto coincide con la época de apareamiento, este fenómeno produce que los machos afectados por su dedicación a la reproducción aumenten el grado de interacciones entre ellos. Se ha demostrado que al comparar una misma zona sin suplementar y suplementándola, el numero de interacciones pasa de 3.8 a 8.7 (Carranza *et al.*, 1995) por lo tanto las posibilidades de contagio se duplican.

#### **2.3.4. Implicaciones de la tuberculosis en ruminantes silvestres**

La tuberculosis bovina causada por el *Mycobacterium bovis* es endémica en animales silvestres en poblaciones identificadas en 26 zonas definidas en Nueva Zelanda, en estas áreas los animales silvestres han actuado como vectores afectando al ganado y los venados de granja, conociéndolos como vectores de alto riesgo. Mientras es posible erradicar la infección del ganado y los venados de

granja con pruebas de campo, sacrificio y manejo de hato, los hatos se re infectan a menos que los vectores de alto riesgo sean controlados ó mantenidos en niveles bajos. Se ha comprobado que junto a la expansión de las granjas de ciervos en Nueva Zelanda apareció el problema de la tuberculosis.

Los tlacuaches, los hurones y los venados silvestres son aceptados como los vectores más importantes de TB para el ganado y venados de granja (Lugton *et al.*, 1997), y son los animales que permiten que la enfermedad mantenga un ciclo tanto directo como indirecto en el ambiente.

La tuberculosis en poblaciones silvestres y de venados de granja ha demostrado gran dificultad en la implementación de los métodos establecidos de detección como la prueba de pliegue caudal, la prueba cervical simple y la doble comparativa por lo cual la única manera efectiva de identificación del padecimiento es la utilización de nódulos linfáticos post-mortem (Buddle *et al.*, 2006).

(Lugton *et al.*, 1997), informa sobre las características de la información que se debe de obtener al realizar muestreos de tuberculosis en cadáveres de ciervo; fecha, área de origen, sexo, edad, tipo de muestra, presencia de lesiones, presencia de gusanos pulmonares y diagnostico presuntivo.

La prevalencia de tuberculosis en Nueva Zelanda en ciervos silvestres es de 30 a 33% en Gran Bretaña de 0.2% y en áreas donde conviven los ciervos con tejones se incrementa hasta un 5%, en los Estados Unidos casos en Michigan demuestra como en áreas donde TB ha sido erradicada del ganado los venados son capaces de mantenerla en su población sin necesidad de un hospedador (Robinson *et al.*, 1989).

Se ha explicado (Mackintosh & Griffin, 1995) que en Suiza y Hawaii se presenta una baja prevalencia de TB en venados silvestres mientras el ganado estaba afectado; pero se sabe que es difícil que los venados sean libres de TB solo porque esta se ha eliminado del ganado.

La cría privada de cérvidos detrás de vallas altas ha crecido en Michigan, U.S.A., y en toda América del Norte durante los últimos 30 años y se ha convertido en un importante problema de conservación. La Tuberculosis bovina (TB) y la caquexia crónica (CWD) en el medio silvestre y la cría de cérvidos tienen una implicación

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

importante sobre los organismos que rigen estatal y federal así como a nivel propiedad privada de la gestión de fauna silvestre. La tuberculosis bovina y CWD tienen el potencial de afectar gravemente la cría cervidos silvestres y la tuberculosis bovina es una amenaza para el ganado y la industria (O'Brien *et al.*, 2006). Durante el siglo pasado, un esfuerzo concertado se ha hecho para erradicar la tuberculosis bovina en el ganado bovino de los Estados Unidos, y la frecuencia de los brotes ha disminuido. La tuberculosis de especie bovina se ha establecido en el medio silvestre y el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) del noreste de Michigan, y se han visto implicado continuamente para infectar a los rebaños de ganado bovino. La tuberculosis es transmitida entre los animales a través de aerosoles, saliva, y las secreciones nasales (Morris *et al.*, 1994), (Sauter & Morris, 1995), (Palmer *et al.*, 1999) y (Clifton-Hadley & Wilesmith, 1991). La alimentación artificial de los lugares más bajos en el noreste de Michigan (Palmer *et al.*, 2004b) puede agravar la situación mediante la concentración de ciervos, por lo tanto, cada vez más posibilidades de infectarse al interactuar con otros y contaminar los alimentos (Palmer *et al.*, 1999) y (Palmer *et al.*, 2004). Zona de alta la prevalencia de tuberculosis bovina se concentran en torno a la alimentación artificial y cebos lo que demuestra el aumento de riesgo de propagación de la enfermedad (O'Brien *et al.*, 2006).

El USDA declaró que cría de venado cola blanca en esta región puede tener un mayor riesgo que otros animales domésticos de contraer la tuberculosis a través de los contactos sociales en las vallas con venados colas blancas silvestres.

Una encuesta de la propiedad privada abarcando granjas de cría ciervos en Michigan reveló que el perímetro de vallas en la mayoría de estas instalaciones (94,4%, 118/125) no podía impedir el contacto directo entre silvestres y la cría de cérvidos (O'Brien *et al.*, 2006). Más lejos, cerca de la línea de contacto entre los salvajes de ciervos mula (*Odocoileus hemionus*) y la cría de alce (*Cervus elaphus*) se ha implicado en un brote de tuberculosis bovina en Montana, U.S.A. (Rhyan *et al.*, 1995).

Doble vallado (es decir, 2 en paralelo de 2,4 m vallas o superior 2-3 m situado aparte), en las granjas de ciervos, como se requiere por parte de algunos de los

organismos reguladores y propuesto por otros, serviría para reducir las posibilidades de ambos directa indirecta y la transmisión de enfermedades. Como evitar la relativamente frecuente fuga de animales al medio silvestre. (O'Brien *et al.*, 2006), otro modo probable de transmisión de la enfermedad puede ser a través de la entrada y la salida de los ciervos de las granjas de ciervos. La enfermedad puede transmitirse a través de vallas en una variedad de formas como son el poco mantenimiento de las vallas y errores humanos en las puertas.

Las descripciones de la distribución anatómica de lesiones sugerentes de *Mycobacterium bovis* y lesiones macroscópicas de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) son insuficientes, en la literatura científica. Encontramos un informe que describe la distribución de las lesiones macroscópicas en los 58 venados cola blanca que resultaron con bacteriología positiva para *M. bovis* entre 19,500 presentados para las pruebas de tuberculosis en Michigan (U.S.A.) en 1999. Las lesiones craneales se observaron con mayor frecuencia en los nódulos retrofaríngeos y parótideos.

La prevalencia es el principal indicador utilizado actualmente por la Michigan Departamento de Recursos Naturales (MDNR) para estimar el presencia de la tuberculosis bovina (TB) en fauna silvestres y para vigilar los cambios de prevalencia con el tiempo. Para el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el principal reservorio en la vida silvestre de la tuberculosis en Michigan (EE.UU.) (O'Brien *et al.*, 2002), la prevalencia se calcula como el número de lesiones que tienen bacteriología con aislamiento para *Mycobacterium bovis*, dividido por el número total de ciervos que se somete a el estudio. Es útil como un índice y habitualmente es utilizado para medir las frecuencias de enfermedad es poblaciones de vida silvestre. (Palmer *et al.*, 2004) llevaron a cabo pruebas post-mortem en venados cautivos, la prevalencia de ellos fue mucho mayor en comparación con los silvestres.

Un brote de la infección por *Mycobacterium bovis* en Elks en cautividad (Wapiti) en Montana fue confirmada por examen histopatológico. En 28 de 143 alces respondió al derivado proteínico purificado (PPD) tuberculina inyectada de *M. bovis* intradérmica en la región cervical (SCT). Los resultados posteriores de la

prueba cervical comparativa realizadas dentro de 9 días puso de manifiesto una mayor respuesta a *M. bovis* que a PPD *M. avium*. Los resultados a la prueba fueron 23 de 28 alces. En la necropsia, sumamente visibles varias lesiones tuberculosas en el parénquima de los pulmones, ganglios linfáticos submandibulares. Examen microscópico de los tejidos reveló la presencia de lesiones granulomatosas con bacilos (Thoen *et al.*, 1992).

En los Estados Unidos de América todas las especies de cérvidos están incluidas en el uniforme de los métodos y normas para la erradicación de la tuberculosis bovina de USDA y, por lo tanto, están sujetos a reglamentos relativos intradermotuberculinizaciones. En renos (*Rangifer tarandus*), la infección con el *Mycobacterium bovis* es muy rara y la respuesta de renos a la infección con *M. bovis* en patológica e inmunológica es desconocido. Un estudio se informó sobre los cambios patológicos asociados con la infección por *M. bovis* en los renos y evaluó la eficacia de pruebas intradermotuberculinizaciones como medio de diagnóstico de la tuberculosis en renos. Trece renos fueron inoculados con *M. bovis*, y 4 renos sirvieron como controles negativos. La prueba cervical comparativa se hizo sobre todos los renos 90 y 240 días después de la primera inoculación. Trece meses después de la inoculación, todos los renos fueron sacrificados y examinado. Todos los renos inoculados experimentalmente desarrollaron lesiones en los ganglios linfáticos retrofaríngeos. Los renos son susceptibles a la infección con *M. bovis*; sin embargo, las lesiones son menos en número, menos graves en la naturaleza, y menos difundido que en los venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*). La prueba Cervical puede ser muy sensible, pero tiene una baja especificidad. La especificidad se puede mejorar por la modificación de los criterios para la interpretación de la prueba (Rhyan & Saari, 1995).

Un venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) cosechado por un cazador en 1994 en el noreste de Michigan (U.S.A.) tenía lesiones sugestivas de tuberculosis y fue positivo a la bacteriología con *Mycobacterium bovis*, el agente causal de la tuberculosis bovina. Posteriormente, un estudio de 354 venados cola blanca se llevó a cabo en este ámbito a partir del 15 de noviembre 1995 al 5 de enero de

1996, resulto 15 ciervos con lesiones de TB en la cabezas y pulmones. De estos ciervos se tomaron muestras de tejido y en 15 de los ciervos había bacilos en el examen histológico y en 12 casos se aisló micobacterias de los ganglios linfáticos y los pulmones; Identificados como *M. bovis*. Se observo que los machos presentaron más casos de tuberculosis (9) que las hembras (3). Se concluyo que una combinación de medio ambiente (alta densidad de ciervos y de mala calidad de hábitat) y la gestión de los factores relacionados con el suplemento invernal pueden ser responsables de esta epizootia (Schmitt *et al.*, 1997).

En nuestro proyecto participaron los productores socios de Asociacion Nacional de Ganaderos Diversificados Criadores de Fauna (ANGADI) y el Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Aguascalientes (CEFOPPA).

El CEFOPPA participara otorgando en especie todos los elementos tecnicos-fisicos para la realizacion de los muestreos que abarca la toma, manejo, conservación y envío a laboratorio de todas las diferentes muestras.

Las expectativas del proyecto son el observar de una manera cuantificable la calidad de la sanidad de los rumiantes silvestres en el area de trabajo y de esta manera tener información al día que sirva para tomar decisiones a las instituciones involucradas con la fauna y poder certificar a nivel regional la zona de trabajo para obtener reconocimiento a nivel nacional e internacional y avanzar en las campañas.

Al igual que las especies domesticas que cohabitan las mismas zonas la información generada servira para reforzar los avances logrados en especies domesticas gracias a que la fauna es más susceptible en este caso a la presentación de algunas de las enfermedades, sirviendo como indicadores indirectos de la salud el agroecosistema.

Se conoce que los avances observados en especies domesticas por ejemplo becerros para exportacion libres de tuberculosis bovina ha tenido avances altamente significativos y sólo está faltando un muestreo de rumiantes silvestres para rectificar estos resultados. Los productores con el análisis podran revalorar a nivel nacional e internacional los productos ofrecidos gracias a la certificación de origen; un ejemplo de esto es la repoblación o creación de nuevas UMA's con

exedentes de pie de cria de Aguascalientes los cuales tendrian un mejor valor gracias a la certificación sanitaria.

En nuestro conocimiento, el estado de Aguascalientes seria el primero a nivel nacional con un muestreo sistematico de la sanidad de su fauna silvestre cinegetica.



### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la prevalencia de *Mycobacterium bovis* en bovinos y rumiantes silvestres ubicados en la zona de interfase vida silvestre/ganadería denominada Área Natural Protegida Sierra Fría, Aguascalientes, México.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Estimar la prevalencia de la tuberculosis en el ganado bovino del área de estudio por medio de la prueba de pliegue caudal y la prueba cervical comparativa.

3.2.2 Identificar el agente causal en muestras sugestivas obtenidas en el examen post mortem en plantas de sacrificio de ganado bovino proveniente del área de estudio mediante pruebas de histopatología y bacteriología.

3.2.3 Identificar el agente causal en muestras obtenidas en el examen post mortem de los rumiantes silvestres cinegéticos aprovechados en las UMA's del área de estudio mediante histopatología y bacteriología.

3.2.4 Comparar los hallazgos tanto macroscópicos y microscópicos de las muestras obtenidas de los dos grupos de estudio.

3.2.5 Confirmar la presencia de *Mycobacterium bovis* en hatos bovinos y poblaciones silvestres de las UMAS mediante la caracterización molecular de muestras positivas a las técnicas bacteriológicas e histopatológicas.

#### 4. HIPÓTESIS

---

Dado que la infección por *Mycobacterium bovis* está ampliamente difundida en bovinos de México, incluso en el Área Natural Protegida Sierra Fría, Aguascalientes, se establece la hipótesis de que la tuberculosis bovina pudiera estar transfiriéndose hacia los rumiantes silvestres cinegéticos en esta zona de interfase vida silvestre/ganadería, lo cual de ser cierto, originaría problemas adicionales para su control y erradicación.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. ÁREA DE ESTUDIO

Este estudio fue desarrollado en el Área Natural Protegida Sierra Fría (ANPSF) que tiene el carácter de zona sujeta a conservación ecológica donde se encuentran las principales concentraciones de rumiantes silvestres y ganado de carne del estado, generando una zona de interfase rumiantes silvestres-ganado la cual es adyacente a la denominada epidemiológicamente como Zona A (Fig. 5).

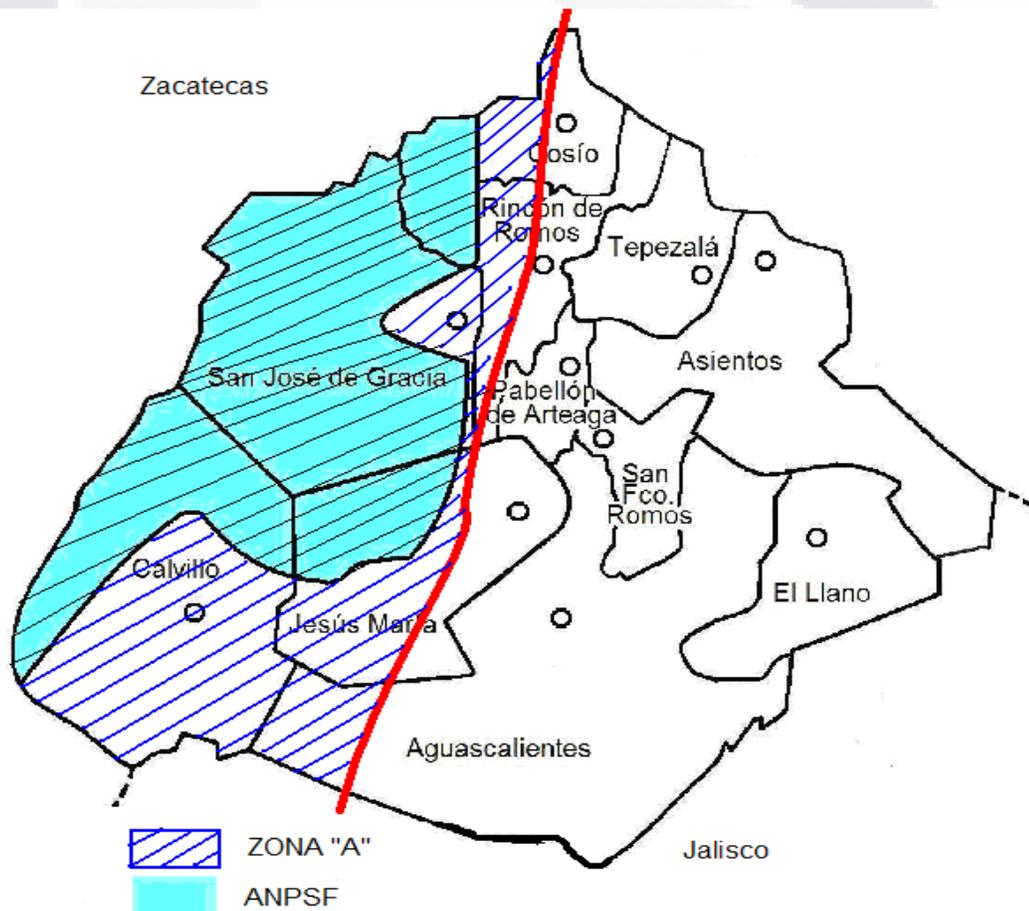


Fig. 5. Area Natural Protegida de la Sierra Fría y Zona "A" (Baja prevalencia de TB) de Aguascalientes Mexico.

La superficie de la ANPSF se extiende por más de 1,120 km<sup>2</sup>, ubicado en el noroeste del Estado de Aguascalientes, con un 20% de su superficie total del

Estado, conformada por los municipios de San José de Gracia, Calvillo, Jesús María, Rincón de Romos y Pabellón de Arteaga (Fig. 1). La ubicación geográfica de la ANPSF se encuentra dentro de las coordenadas 21 ° 52 '50 " y 22 ° 19'46 " de latitud Norte y 102 ° 22'50 " y 102 ° 51' 26 " de longitud Oeste (Gob. Edo. Ags, 1994).

ANPSF presenta una fisiografía escarpada, entre 1800 - 3050 msl, con cañones rocosos, barrancas, lomerios y mesetas. Su Litología se caracteriza por piedra arenisca, rocas ígneas extrusivas ácidas, aluvion, tobas, basalto y riolitas. Los climas que predominan en esta región son semiseco- semicalido, semiseco-templado y templado subhúmedo. La precipitación media anual es de 600 mm distribuida en mayor proporción de junio a octubre, la temperatura promedio es de 17 °C. La vegetación de encino cubre cerca del 72% de la cubierta forestal de la región (INEGI, 1981). Los suelos que caracterizan a esta región son: planosol, litosol, cambisol, luvixol, xerosol y fluvisol. La ANPSF está integrada a la zona de baja prevalencia de TB zona denominada "A".

Durante la década de los noventa en Sierra Fría gracias a la legislación vigente se permitió la formación de unidades de manejo y conservación de de fauna del tipo cinegético, esto fomentó la introducción y manejo intensivo varias especies de rumiantes silvestres generando en la zona interfases rumiantes silvestres-ganado; todos ellos igualmente susceptibles de contraer el *Mycobacterium bovis*. Estos rumiantes silvestres se distribuyeron por toda el área y son blanco de muestreo por su susceptibilidad, debido a que son grupos de animales alimentados artificialmente lo que fomenta su contacto y animales socialmente agrupados lo que maximiza la posibilidad de infecciones cruzadas al no tener miedo del contacto con especies domésticas (Ryan *et al.*, 2006).

## 5.2. POBLACIONES EN ESTUDIO

### 5.2.1. Bovinos

Se realizó un barrido específicamente el ANPSF que es la principal zona de interfase rumiantes silvestres-ganado del estado de Aguascalientes, utilizando las instalaciones de los baños garrapaticidas que se encuentran dispersos por el ANPSF, para optimizar el tiempo y facilitar las maniobras de los médicos aprobados en la campaña. Las pruebas utilizadas fueron prueba de pliegue caudal y dependiendo su resultado se realizó la prueba cervical comparativa posteriormente para diferenciar especies.

En el animal vivo, la tuberculosis se diagnosticó por los signos clínicos, la reacción a la tuberculina y la demostración de bacilos en las secreciones y excreciones. En los animales muertos, el diagnóstico se basó en la demostración de bacilos en lesiones típicas.

### 5.2.2. Pruebas de campo

*Prueba tuberculínica Ano-Caudal ó prueba de pliegue caudal(PPC).* Esta prueba se realizó en el pliegue ano-caudal interno a unos seis cm de la base de la cola y en el centro del pliegue. Esta zona es la menos sensible a la tuberculina que la piel del cuello. Se inyectaron 0.1 ml de PPD bovina de un miligramo por mililitro.

La lectura se realizó a las 72 horas (más o menos 6 horas).

Se diagnosticó como positivo si se observó inflamación de aproximadamente cinco mm o mayor.

*Prueba tuberculínica cervical comparativa (PCC).* La prueba cervical comparativa se utilizó para la realización de un diagnóstico diferencial entre animales infectados por *Mycobacterium bovis* y aquellos sensibilizados a la tuberculina por exposición a otras microbacterias. Este tipo de sensibilización puede ser atribuido a la gran reactividad antigénica cruzada existente entre las especies de microbacterias y otros géneros afines.

Esta prueba consistió en la inyección de tuberculina bovina y tuberculina aviar en diferentes puntos del cuello y en la subsiguiente evaluación de la respuesta transcurridos 3 días (SAGARPA, 1998) NOM-031-ZOO-1995. Para esta prueba comparativa la dosis de tuberculina no debió ser inferior a 2.000 UI de tuberculina bovina ni a 2.00 UI de tuberculina aviar. La distancia entre ambas inyecciones fue de aproximadamente 12 a 15 cm. Se considero como positivo con cuatro mm mayor que la tuberculina aviar, dudoso entre uno y cuatro mm mayor que la tuberculina aviar y negativo cuando no se encontró reacción o cuando la reacción fue igual o menor que la tuberculina aviar.

Todas las inyecciones se realizaron introduciendo la aguja oblicuamente en las capas profundas de la piel e inyectando la dosis de tuberculina. Después se comprobó que la inyección haya sido bien realizada detectándose al tacto una pequeña inflamación en el lugar de la misma.

### **5.2.3. Toma de muestras post-mortem de ganado y su forma de envío**

Para la toma de las muestras provenientes del ganado en rastros, se utilizo la infraestructura establecida en seis rastros existentes en el estado de Aguascalientes, que cumplen con los requisitos mínimos para garantizar la correcta trazabilidad interna de las partes y su conexión con los documentos de ingreso a las instalaciones, todo esto para garantizar el origen de las muestra como de la zona y área predeterminada (ANPSF).

Los rastro y casa de matanza que participaron fueron Casa de matanza de Rincón de Romos, Rastro de Calvillo, Planta FREASA, UGASA TIF45, Rastro Municipal Aguascalientes y Planta Jessy.

La toma de muestras para estudios histopatológico y bacteriológico se realizo de la siguiente forma:

Se seleccionaron y tomaron muestras de los siguientes órganos que presentaron lesiones compatibles con tuberculosis o secreciones sugestivas:

a) Nódulos Linfáticos. Tomando muestras preferentemente de los nódulos de la cabeza, preescapulares, mediastínicos anteriores y posteriores y bronquiales derecho e izquierdo. En el caso de tuberculosis miliar tomar muestras de nódulos mesentéricos.

b) Pulmones. La lesión tuberculosa pueden ser caseosa o calcificada o una cavidad franca. De este órgano se tomaron muestras de 2 cm por lado de las lesiones presentes.

c) Útero en caso de metritis tuberculosa. Se caracteriza por secreción continua de grandes cantidades de pus amarilla teniendo el aspecto de leche cuajada. Se tomaron las muestras del órgano y de este exudado.

d) Otros órganos. También se tomaron muestras de los siguientes órganos cuando presenten lesiones sugestivas de tuberculosis: bazo, hígado, riñón, médula ósea, ovarios, testículos y glándula mamaria.

Todas las muestras fueron perfectamente identificadas, anotando: Nombre del propietario, ubicación de la explotación de origen, de donde se obtuvo la muestra, tipo de órgano, descripción del animal (especie, raza, sexo y edad), además de identificación precisa del animal como arete, marca, u otro. También nombre, registro y domicilio del Médico Veterinario oficial ó aprobado que remite la muestra y destino del canal y vísceras, ya sea decomiso parcial o total.

#### **5.2.4. Proceso de Histopatología, Bacteriología y PCR**

Las muestras para histopatología fueron fijadas en un 10% de formaldehido en solución PBS y luego fueron incorporadas en parafina. En la histología fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE) y con Ziehl-Neelsen (ZN). Los cortes fueron examinados en busca de lesiones sugestivas de TB y la presencia de bacilos alcohol ácido-resistentes, con el fin de identificar lesiones compatibles según Payeur *et al.* (2002).

Las muestras fueron maceradas en forma independiente en morteros con 5 mL de PBS y con rojo fenol como indicador de PH. Fueron digeridas y descontaminadas con NaOH, 0,5 N, neutralizado con HCL 6 N y centrifugadas a 3500 g durante 20 min. El sedimento, de todas las muestras de tejidos que fueron procesados, fue cultivada a 37 ° C en medio de aislamiento primario: Stonebrink de complementarse con piruvato, Milddlebrooks 7H11, y Herrold con yema de huevo o Lowenstein Jensen. Después de eso, las colonias fueron cultivadas de nuevo en medio Proskauer-Beck con 5% de suero equino para realizar pruebas bioquímicas e identificar los géneros y especies. Los cultivos sin crecimiento después de tres meses fueron considerados negativos (Payeur *et al.*, 2002).

Prueba de PCR confirmatoria: Algunos de los cultivos bacteriológicos positivos se les extrajo ADN para confirmar y diferenciar, utilizando 2 µL de proteinasa K (concentración final 0,2 mg/mL), los tubos se incubaron toda la noche a 42°C. La actividad enzimática se detuvo con etanol refrigerado por 10 min. El tejido de residuo se eliminó por centrifugación a 3.000 g por 10 min. El ADN fue aislado del sobrenadante con fenol- cloroformo alcohol isoamil, seguido de una precipitación con etanol, el ADN fue suspendido en 50 µL de agua y una alícuota de 1 µL se utilizó para la prueba de PCR secuencia específica. Una vez obtenido el ADN se procedió a montar la PCR utilizando los iniciadores que detectan el complejo tuberculoso (complejo *M. tuberculosis*) conformado por las sondas IS6110 cuyas secuencia son: CTCGTCCAGCGCC GCCTTCGG y CCTGCGAGCGTAGGCGTTCGG. Los iniciadores utilizados para identificar la bacterias del complejo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*) amplifica un fragmento de 123-pb de la secuencia de inserción IS6110 (Liebana *et al.*, 1997). Las condiciones de amplificación de los iniciadores incluye una desnaturalización a 94°C por 10 min., 50 ciclos de 60 seg a 94°C, 15 seg a 65°C y 60 seg a 72°C, con una extensión final a 72°C. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis a razón de 15 µL de muestra en azarosa 1,5% marcada con bromuro de etidium. Todas las muestras que produjeron una banda del tamaño indicado fueron comparadas con el marcador de peso molecular para declararla positiva. Las muestras que revelaron bandas en

otra posición o la ausencia de bandas se consideraron negativas. Esta prueba fue realizada en el Animal Plant Health Inspection Service<sup>2</sup>.

#### **5.2.5. Rumiantes silvestres**

Las especies blanco para este estudio fueron por su potencial riesgo de contraer la enfermedad y participar como reservorios de alto riesgo: Ciervo rojo (*Cervus elaphus*), Elk (*Cervus canadensis*), y el venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) de la ANPSF. Se llevo a cabo una serie de acuerdos con los productores socios de ANGADI y Asociación Sierra Fría para los permisos correspondientes para la realización de los muestreos dentro de sus UMA's durante la temporada de caza.

Para cumplir con los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestre en el territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32; se solicito la licencia de colecta científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, la cual fue otorgada para el estudio en cuestión, obteniendo una licencia de colector científico (OFICIO NUM.SGPA/DGVS/03813/08).

Durante los dos primeros trimestres de cada año se impartió una serie de seminarios de capacitación para lograr un entendimiento y manejo por parte de los estudiantes de médico veterinario que participaron en los muestreos de todos los aspectos relacionados con el muestreo, manejo, conservación y envío de las diferentes muestras así como la interpretación de los resultados para que de esta manera se concientice a los productores sobre la importancia del monitoreo sanitario en fauna silvestre como herramienta productiva y de toma de decisiones. El CEFOPPA se comprometió a facilitar todos los medios físicos para la obtención, preservación y transporte de las muestras los cuales incluyen contenedores térmicos, tubos de vacutainer, agujas, adaptadores, congelantes en gel, bolsas auto sellables, vasos para toma de muestra con formol al 10% y estériles para congelación, equipo de toma de muestra biológica para tuberculosis conteniendo

---

<sup>2</sup> Approved Laboratories for Tuberculosis, National Veterinary Services Laboratories, Ames, Iowa

empaquete térmico y otro con borato de sodio; así como los formatos oficiales de toma de muestra por perfil.

La inclusión de los cérvidos en el estudio, fue condicionada a ser  $\geq 10$  meses de edad, ya que el curso de la infección es lento requiriendo un tiempo de incubación de tres a cinco meses (Gallagher & Clifton-Hadley, 2000), tal como se determinó por la técnica de erupción dentaria / desgaste (Severinghaus, 1949) igualmente su condición corporal fue determinada por medio del método de zonas corporales claves. Todos los animales en el estudio fueron cazados y sacrificados, como parte del proceso de gestión de cada UMA y el diagnóstico para la tuberculosis se realizó para cada individuo.

La SEMARNAT informo el numero de permisos que otorga anualmente para la caza de rumiantes silvestres en el area natural protegida (Tabla 4).

Tabla 4. Permisos de caza mayor otorgados en el estado de Ags. Para las temporadas 2006-07 y 2007-08

PERMISOS				2006	2007
Venados Cola Blanca	( <i>Odocoileus virginianus</i> )			75	67
Elk	( <i>Cervus canadensis</i> )			3	7
TOTAL				<b>78</b>	<b>74</b>

Fuente: SEMARNAT –Ags (2008)<sup>3</sup>.

Con esta información y el presupuesto asignado se considero una meta de 30 individuos muestra por periodo.

### 5.2.6. Determinación de la edad en los rumiantes silvestres

En cada una de las ramas del maxilar inferior del venado, se presentan cuatro incisivos, tres premolares que se denominados dientes 1, 2 y 3 y tres molares, los cuales se llaman 4, 5 y 6. Se estima que el venado cola blanca puede llegar a vivir de 15 a 20 años en condiciones controladas; sin embargo, en condiciones naturales la dentadura del venado después del séptimo u octavo año de edad se encuentra tan desgastada, que es posible que el animal muera por inanición. De

<sup>3</sup> Comunicación personal. Oficio 001600272608

acuerdo con (Severinghaus, 1949) para estimar la edad de los venados cazados utiliza el desgaste de sus molares (tabla 5).

*Tabla 5. Criterios para calcular la edad en el venado cola blanca*

<b>EDAD</b>	<b>Descripción</b>
AÑO Y MEDIO	Los tres primeros dientes mandibulares o premolares (1, 2 y 3) son de leche y serán reemplazados aproximadamente a los dos años de edad. Estos tres premolares (1, 2 y 3) se presentan desgastados uniformemente y prácticamente lisos, mientras que los tres molares (4, 5 y 6) se presentan muy afilados. El tercer premolar (3) se presenta compuesto por tres partes y el tercer molar (6), que también se compone de tres partes, es común que no haya aflorado en su totalidad.
DOS AÑOS Y MEDIO	Los tres premolares (1, 2 y 3) han sido reemplazados por los dientes permanentes y ahora el tercer premolar (3) estará compuesto sólo de dos partes y el tercer molar (6) compuesto de tres partes, ahora se presentará totalmente aflorado. En los tres molares (4, 5 y 6) la dentina (color café) no se puede observar, o bien, no es tan ancha como el esmalte (color blanco) que lo rodea (dentina color café, menor que el esmalte color blanco). Además, estos tres molares (4, 5 y 6) se presentarán todavía muy afilados.
TRES AÑOS Y MEDIO	La dentina (color café) del primer molar (4) se presentará tan ancha o más que el esmalte (color blanco) que la rodea (dentina color café, mayor o igual que el esmalte color blanco), lo cual no sucederá con el segundo y tercer molar (5 y 6). Es común que las crestas del lado de la lengua (crestas linguales) del segundo y tercer molar (5 y 6) se presenten muy afiladas en comparación con la del primer molar (4), la cual presentará algo de desgaste.
CUATRO AÑOS Y MEDIO	La dentina (color café) del primer y segundo molar (4 y 5) se presentará en ancha o más que el esmalte (color blanco) que las rodea (dentina color café, mayor o igual que el esmalte color blanco), lo cual no sucederá con el tercer molar (6). Es común que las crestas del lado de la lengua del primero y el segundo molar (4 y 5) presenten algo de desgaste, mientras que el tercer molar (6) se presentará todavía muy afilado.
CINCO AÑOS Y MEDIO.	La dentina (color café) de los tres molares (4, 5 y 6) se presentarán tan ancha o más que el esmalte (color blanco) que las rodea (dentina color café, mayor o igual que el esmalte color blanco). Es común que las crestas del lado de la lengua de los tres molares presenten desgaste.
SEIS AÑOS Y MEDIO.	El primer molar (4) se presentará con un desgaste uniforme que los hará verse lisos, lo cual no sucederá con el segundo y tercer molar.
SIETE AÑOS Y MEDIO	El primero y segundo molar (4 y 5) se presentarán con un desgaste uniforme que los hará verse lisos, lo cual no sucederá con el tercer molar.
OCHO AÑOS Y MEDIO	Los tres molares (4, 5 y 6) presentarán un desgaste uniforme que los hará verse lisos.
MAYOR DE OCHO AÑOS Y MEDIO	Después de los ocho años y medio no es posible establecer con este método la edad de los venados. De hecho las claves señaladas para una edad de 8.5 años pueden corresponder a venados de esa edad y mayores.

*Adaptado de Severinghaus (1949) y Villareal (1986)*

### 5.2.7. Condición Corporal

La evaluación de la condición corporal es un método que nos permite relacionar el peso del animal con su tamaño y constitución así como el estado de salud del animal, combina la valoración visual con la comprobación externa de un número de zonas corporales claves. La condición corporal se divide en cinco niveles (tabla 6).

*Tabla 6. Descripción de las características de condición corporal por observación de zonas corporales claves.*

Zonas corporales	Nivel 1 (Muy delgado)	Nivel 2 (Bajo de peso)	Nivel 3 (Ideal)	Nivel 4 (Sobrepeso)	Nivel 5 (Obeso)
<b>Costillas</b>	Fácilmente palpable, sin capa de grasa.	Fácilmente palpables con una delgada capa de grasa	Fácilmente palpables con una ligera capa de grasa.	Difícilmente palpables con una moderada capa de grasa.	Difícilmente palpables bajo una gruesa capa de grasa.
<b>Base de la cola</b>	Huesos elevados, sin tejido entre piel y huesos.	Huesos elevados con algo de tejido entre piel y huesos.	Contorno liso, pero los huesos se palpan bajo una delgada capa de grasa.	Cierto engrosamiento, pero los huesos se palpan bajo una moderada capa de grasa.	Engrosada y difícil de palpar bajo una prominente capa de grasa.
<b>Vista lateral</b>	Entrada abdominal muy marcada.	Entrada abdominal marcada.	Entrada abdominal poco marcada.	No existe entrada abdominal o cintura.	La grasa cuelga del abdomen y no existe cintura.
<b>Vista aérea</b>	Forma exagerada de reloj de arena.	Forma marcada de reloj de arena.	Cintura lumbar bien proporcionada.	Dorso ligeramente más ancho.	Dorso marcadamente más ancho.

*Adaptado de SID, 1990*

### 5.2.8. Procedimiento de necropsia en rumiantes silvestres

Material: Kit de necropsia, Vestimenta protectora: Guantes, botas de goma o similar, delantal plástico, overol y máscara (que cubra nariz y boca), lentes protectores, cámara de fotos y libreta de campo.

Equipo de necropsia: cuchillo afilado y chaira, tijeras pequeñas y grandes, pinzas de distintos tamaños, hilo, hacha pequeña, sierra para huesos, martillo y formón, sistema de poleas y sogas; bisturí y hojas de bisturí y regla plástica o cinta métrica.

Envases para conservación de muestras y equipo de toma de muestras

Envases de plástico duro con tapas a rosca herméticas.

Bolsas plásticas con cierre hermético (zip-lock).

Cinta para etiquetar o etiquetas, marcadores indelebles, lápices.

Kit de toma de muestra biológica con frasco con formol al 10% y borato de sodio.

Materiales para el transporte: Hieleras con refrigerante de campo.

Envases herméticos, a prueba de roturas. Material para envolver absorbente.

Cinta de empaquetar. Materiales de desinfección, Cubeta y cepillo. Bórax.

Hipoclorito de sodio. Alcohol etílico al 70%.

Precauciones de seguridad personal. Debido a que numerosas enfermedades de los animales silvestres pueden causar enfermedades graves y mortales en el ser humano, todos los cadáveres fueron tratados como si contuvieran una enfermedad potencialmente peligrosa y se tomaron medidas de protección personal.

Manejo del cadáver y los desechos. Los animales silvestres enfermos fueron manejados reduciendo al mínimo el contacto con otros animales silvestres o domésticos debiendo ser enterrados y preferentemente cubiertos con algún desinfectante y al menos a 2 metros de profundidad para evitar su consumo por carnívoros silvestres.

Algunos de los cadáveres presentaron algún grado de autólisis, pero si los tejidos se manejan en forma apropiada, los exámenes diagnósticos pueden realizarse sin problemas. Se recomendó un especial cuidado en la manipulación de los tejidos para histopatología, buscando colocar los tejidos rápidamente en formol y no se congelarán.

La autólisis puede causar gran cantidad de artefactos o cambios en los tejidos que pueden ser confundidos con procesos infecciosos. De todas maneras, siempre en estos casos se realizó la toma de muestra de un área de apariencia anormal, antes que asumir que su aspecto se debe a la autólisis. El análisis histopatológico

permitió distinguir entre lesiones verdaderas y los artefactos producto de cambios post-mortem.

Procedimiento de colecta de muestras de histología. Las muestras se tomaron de todos los órganos principales y cualquier área o tejido anormal. Todas las muestras se colocaron individualmente en un envase separado con formol bufferado al 10%, sumergiendo los tejidos en un volumen de fijador igual a 10 partes de formol por una parte de tejido.

Las muestras presentaron un grosor menor a 1.0 cm para fijarse correctamente, siendo largas y anchas para representar las diferentes áreas del tejido así como cualquier anomalía. Las mejores muestras fueron las que incluyeron una parte anormal y una normal del mismo tejido.

Procedimiento de colecta de muestras de microbiología. Las muestras colectadas para microbiología fueron procesadas para el cultivo de bacterias. Para tomar las muestras sin contaminarlas, las mismas deben ser colectadas antes de que se toquen los tejidos y el instrumental debe ser esterilizado. Estas muestras deben ser colocadas en envases estériles.

Cuando no se evidenciaron áreas anormales, se tomaron muestras estándar de pulmón, hígado, riñón, bazo, amígdala, nódulos linfáticos e intestinos.

Procedimiento para la disección. El cadáver se examinó en busca de heridas y se distinguió el estado general del pelo. El cadáver se colocó sobre su lado izquierdo (*Fig. 6*). La piel se cortó a lo largo de la línea media ventral desde el mentón hasta la cola (1). Sobre el lado derecho del animal, la piel se quitó hacia la columna vertebral (2). Se cortaron los miembros derechos, cortando los músculos y las articulaciones de la cadera y hombro. Las cavidades corporales fueron abiertas; el lado derecho de la cavidad torácica fue expuesto cortando las costillas a lo largo del esternón y la columna vertebral. Se identificaron los ganglios o nódulos sospechosos, de acuerdo a la Office of International Epizootics, (1996).

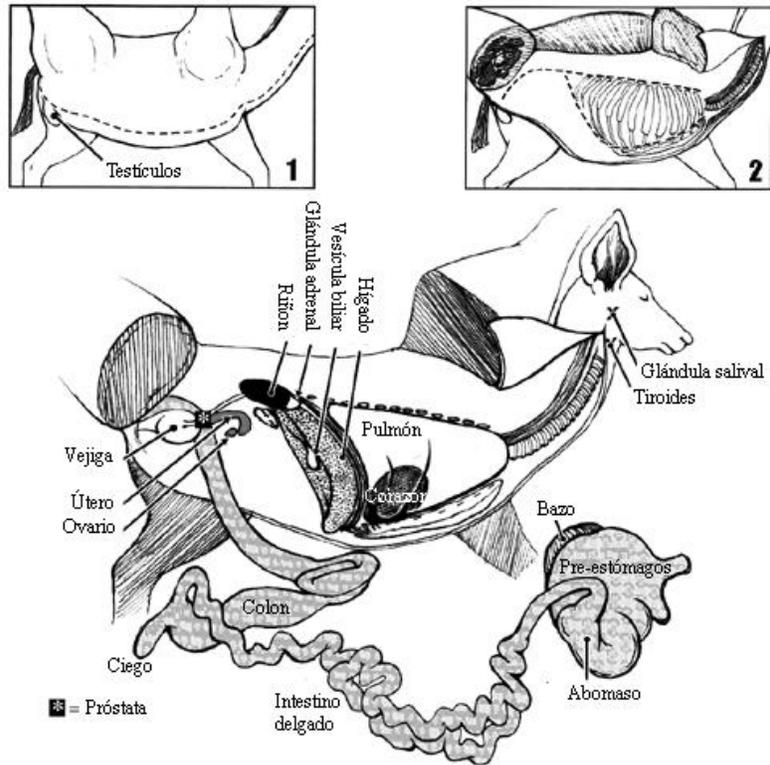


Fig. 6. Esquema de procedimiento de necropsia en ungulados silvestres. Fuente: OIE, 1996.

### 5.2.9. Tejidos seleccionados

Todos los individuos de estudio inspeccionados post-mortem, fueron sometidos a los requerimientos mínimos necesarios de la inspección post-mortem que consistió en la búsqueda de lesiones; la inspección post-mortem se dividió en tres pasos, cabeza, vísceras y canal.

Dependiendo del uso que designo el dueño del animal se debió de inspeccionar los linfocentros mandibular, parotideo, retrofaríngeo, cervical superficial, cervical profundo, axilar, torácico ventral, mediastinal, bronquial, iliosacral, inguinofemoral, isquiático, iliofemoral, poplíteo, celiaco, mesentérico craneal y mesentérico caudal. Todos estos linfocentros pudieron o no presentar lesiones de tipo bacilo tuberculoso, neutrófilo, macrófago, neutrófilos muertos, células epitelioides, célula gigante, cápsula de tejido conjuntivo fibroso, corona linfocitaria y área de necrosis no obstante, se tomaron las muestras representativas independientemente si las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

lesiones se encontraron o no (Corner, 1994). Una vez identificada la lesión macroscópica sugestiva, se llevaron a cabo la obtención de muestras, la cual consistió en remover el exceso de grasa para prevenir cualquier contaminación y facilitar su manipulación en el laboratorio; se realizó una división de la lesión, incluido el tejido normal, en dos secciones de aproximadamente 1.5 cm de grueso, debidamente laminado; se depositaron la mitad del tejido en formalina amortiguada al 10% para histopatología y el resto del tejido sin laminar en una solución saturada de borato de sodio para el examen bacteriológico. Esta solución es saturada por lo que es normal que presentara cristales en el fondo del frasco, la cantidad máxima de tejido en relación al líquido utilizado como conservador fue formalina 1:10 y borato de sodio 1:1, se procedió a sellar la tapadera de los frascos con cinta adhesiva para evitar derrames y se anotaron en las etiquetas de los frascos los datos básicos del órgano que se envía. Las muestras de TB fueron enviadas inicialmente al laboratorio del Salto Jalisco para su análisis por medio de paquetería, especialmente se contemplo un especial cuidado en las siguientes actividades.

Nódulos linfáticos de la cabeza: Se incidieron los nódulos linfáticos parotídeos, izquierdo y derecho; mandibulares izquierdo y derecho; así como retrofaríngeos, medios y laterales.

Órganos y nódulos linfáticos de la cavidad torácica: Cuidadosamente se palparon los lóbulos pulmonares en búsqueda de engrosamientos, hinchazones, hemorragias, etc., especialmente en los diafragmáticos traqueobronquiales izquierdo y derecho, así como los mediastínicos craneal, medio y caudal.

Órganos y nódulos linfáticos de la cavidad abdominal: Se palpó la superficie del hígado y se incidieron los nódulos linfáticos hepáticos además de examinar los nódulos mesentéricos para apreciar aumento de tamaño, especialmente en la cadena mesentérica, incidir algunos de los más representativos como los nódulos iliacos izquierdo y derecho.

También se revisaron los nódulos linfáticos de masas musculares como los cervicales superficiales derecho e izquierdo, subiliacos derecho e izquierdo y poplíteo, izquierdo y derecho.

Cada muestra fue acompañada del “Formato Oficial de envío de Muestras para Diagnostico de Tuberculosis”, el cual contiene información epizootológica clave que el Médico encargado de la recolección de las muestras puede recabar, como datos de la explotación, tipo de relación del animal con la tuberculosis, así como datos específicos de los tejidos a recolectar (anexo #1).

También se trabajo paralelamente en el llenado de la encuesta epizootológica denominada “SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO A CASOS SUGESTIVOS Y/O POSITIVOS A TUBERCULOSIS POR INSPECCIÓN POS-MORTEM DE RUMIANTES SILVESTRES”; la cual se dividió en seis apartados:

- 1) Información de la explotación.  
La cual se subdivide en 1.1 Datos del propietario, 1.2 Datos de la explotación, 1.3 Inventario pecuario de la explotación Bovinos y 1.4 Inventario pecuario de la explotación Especies Cinegética
- 2) Información del caso índice.  
Información varía sobre los casos positivos.
- 3) Historia de la explotación.  
Historia sobre pruebas de tuberculosis realizadas en la explotación así como estradas y salidas, contactos y manejo de residuos.
- 4) Incorporación de animales a la explotación.  
Motivos de ingreso de animales.
- 5) Salida de animales de la explotación.  
Motivo y destino de los animales.
- 6) Explotaciones en el área.  
Plano a escala así como datos referenciados geográficamente.

#### **5.2.10 Control de calidad de las muestras colectadas**

Para garantizar desde el principio del muestreo la calidad de las mismas se aplico conjuntamente con el laboratorio receptor de las muestras el formato de control de calidad de la muestra, mismo que el laboratorio y los médicos de campo tuvieron

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en cuenta para garantizar la máxima calidad de las muestras. El formato funciono bajo los siguientes criterios:

- 1- Enviar dentro de las 2 semanas posteriores al sacrificio del animal (que no excediera de 7 días) valor 1 punto.
- 2.- Que cumpla la proporción de formol al 10% /tejido 1:10 valor 2 puntos.
- 3.- Que no se encuentre la muestra con exceso de tejido adiposo cubriendo el mismo valor 0.5 puntos.
- 4.- Ausencia de gases en el borato por autolisis o putrefacción valor 0.5 pts.
- 5.- Que la muestra no presente exceso de sangre por manchado de los órganos, ni otros elementos como pelo, excretas, etc. Valor 0.5 pts.
- 6.- Que el órgano no se encuentre laminado para bacteriología. Para Histopatología que el órgano se encontrara laminado. Valor 0.5 pts.
- 7.- Que se cumpla la proporción borato/tejido 1:1 Valor 2 pts.
- 8.- Los frascos se rotulen con los datos de identificación de las muestras y el número de caso del rastro Valor 0.5 pts.
- 9.- Muestras con la lesión dividida para los dos diagnósticos (correlación histopatología/bacteriología) Valor 2 pts.
- 10.- Datos completos de la historia clínica Valor 0.5 pts.

La calificación total de la muestra ideal debe sumar 10 puntos.

Muestras que calificaran debajo de 8 puntos no participaron en el estudio.

Los procedimientos de histopatología y bacteriología fueron los mismos utilizados en las muestras de bovinos en el apartado 5.2.4.

### 5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la comparación de las lesiones dependiendo de la especie y diferentes características se emplearon las pruebas de independencia ( $\chi^2$ ).

El ganado se designó como infectado si fue positivo por cultivo, la PCR o ambas cosas. La sensibilidad (Se) se calculó como la probabilidad condicional de un resultado positivo, puesto que el animal estaba infectado realmente con TB. La especificidad (Ep) se calculó como la probabilidad condicional de un resultado negativo, ya que el animal no estaba infectado realmente con TB. La prevalencia aparente (PA) se calculó como la proporción de animales sometidos a pruebas que fueron resultado positivo y la prevalencia real (PR) se estimó con AP ajustado por Se y Ep (Gardner y Greiner, 2000), utilizando la fórmula  $PR = [(AP - SP-1) / (Se+Sp-1)]$ , donde Se y Ep son la sensibilidad combinada y especificidad de la PPC, PCC y los resultados brutos de las inspecciones. AP, de Se y Ep son reportados como estimaciones puntuales con un intervalo de confianza del 95% para las proporciones binomiales. Sexo, edad, y las diferencias de tipo de lesión en PR se determinaron mediante el uso de pruebas  $\chi^2$  con  $P \leq 0,05$  como el valor necesario para rechazar la hipótesis nula de ninguna diferencia significativa entre los grupos evaluados. Software Statistical Analysis System (SAS, 1999) disponible comercialmente para todos los análisis estadísticos.

## 6 RESULTADOS

Durante el bienio 2006-2007 dentro de las temporadas de caza regular, todos los rumiantes silvestres cazados legalmente fueron examinados post mortem, las canales del 64.8% (92/142) se mostraron con lesiones de algún tipo que requerían análisis diferencial para descartar tuberculosis bovina. Todas las muestras de nódulos linfáticos recolectados fueron identificados como TB negativas a histopatología y sin cultivo positivo a *Mycobacterium spp.* (Tabla 7). Por otra parte, un total de 0.65% bovinos sacrificados (113/17, 351) se identificaron con lesiones sugestivas TB (Tabla 7), pero sólo 29.2% (33/113) de ellos mostraron lesiones granulomatosas compatibles con TB. A partir de este último grupo, el 93.9% (31/33) fueron identificados como infectados por tuberculosis bovina a través de aislamiento de *Mycobacterium spp.*

Tabla 7. Bovinos y rumiantes silvestres evaluados para detectar *Mycobacterium bovis*.

ESPECIES	Rumiantes		Bovinos	
	Silvestres (Año)		(Año)	
	2006	2007	2006	2007
Sacrificados / Cazados	75	67	8,060	9,291
Lesiones sugestivas	39	53	59	54
TB Negativos histopatología	39	53	39	41
Lesiones Granulomatosas	0	0	19	14
<i>Mycobacterium spp.</i> (Cultivo)	0	0	18	13

Durante el mismo período se llevó a cabo vigilancia en la zona de baja prevalencia de tuberculosis bovina, mediante las pruebas de campo, prueba de pliegue cauda

(PPC) y prueba cervical comparativa (PCC), para la detección de la tuberculosis de todos los bovinos del ANPSF del Estado de Aguascalientes. Esta vigilancia abarcó el municipio de San José de Gracia y parcialmente los municipios de Calvillo, Rincón de Romos, Pabellón de Arteaga y Jesús María (Fig. 8). Las pruebas fueron realizadas por los veterinarios aprobados en rumiantes, resultando probados 24,400 cabezas con PPC, lo que resulto en 191 reactores (Tabla 9).

*Tabla 8. Bovinos probados con PPC (Prueba de pliegue caudal) para detectar Tb por municipio ANPSF del estado de Aguascalientes, barrido 2006-2007-2008.*

Municipio	Bovinos Probados (No.)
Calvillo	5074
San Jose de Gracia	13295
Rincon de Romos	3091
Jesus Maria	2540
TOTAL	24000

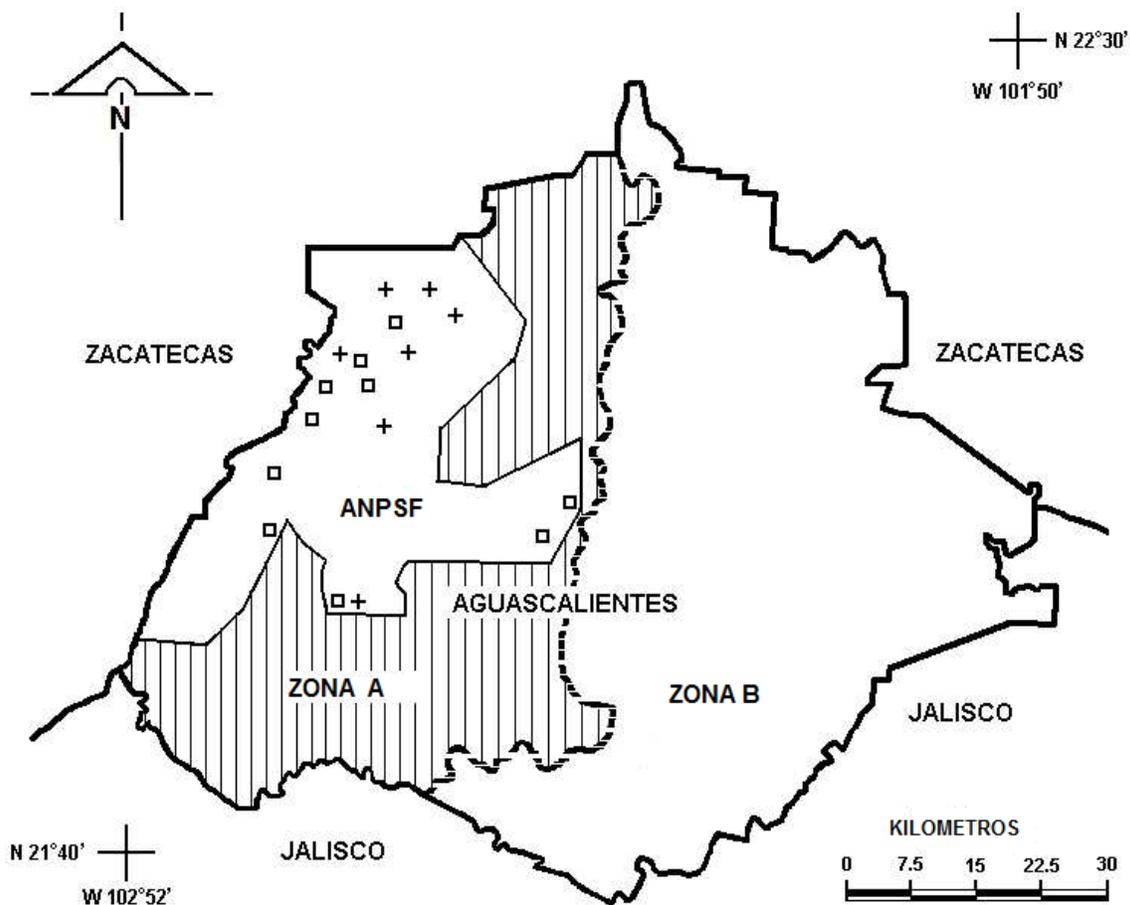
*Fuente CEFOPPA.*

El ganado positivos a PPC fue reprobado con PCC; resultando dos sospechosos y ocho reactores, ubicados en dos de los 793 hatos del ANPSF (Tabla 9). Los bovinos positivos PPC-PCC fueron enviados inmediatamente a las plantas de sacrificio autorizadas por SAGARAPA bajo control oficial.

*Tabla 9. Resultados de las pruebas de campo para detectar Mycobacterium spp. En el ganado bovino del ANPSF (Hatos).*

<i>Diagnosticos</i>	Año	
	2006	2007
Hatos	287	506
Prueba de Pliegue Caudal PPC	9,200	15,200
Reactores a la PPC	132	59
Prueba Cervical Comparativa PCC	132	59
Positivos a la PCC	6	4

Por otra parte de los 33 bovinos con lesiones compatibles en histopatología y HMC positivas provinieron de siete hatos (Figura 7), dos hatos de ganado con siete vacas detectadas durante la vigilancia de pruebas de campo por las pruebas de tuberculina, confirmado por el HMC, y cinco hatos de ganado con 26 cabezas TB positivas detectadas por HMC en las lesiones observadas en bovinos sacrificados comercialmente en la seis plantas de sacrificio del estado de Aguascalientes.



*Fig.7. Mapa del área Natural Protegida de Sierra Fría Aguascalientes, que muestra la zona "A" (baja prevalencia), zona "B" (alta prevalencia), los sitios de muestreo de rumiantes silvestres (cuadros) en las Unidades Medio-ambientales y los sitios con ganado infectado detectado (+) en 2006/2007.*

Todas las UMA's de donde se obtienen las muestras están en aéreas las cuales se encuentran inmersas en zonas con alta densidad de bovinos productores principalmente de carne.

Las diez UMA's que conformaron el muestreo de rumiantes silvestres tiene características muy particulares las cuales quedaron asentadas en las encuestas realizadas al momento de tomar las muestras. Algunas de estas características se plasmaron en la tabla 10.

*Tabla 10. Características principales de las UMA's monitoreadas para evaluar la interacción de las especies (Datos recopilados de las acuestas).*

<b>UMA's</b>	<b>Combinación de ganado y rumiantes silvestres</b>	<b>Manejo Alimenticio</b>	<b>Pruebas de Diagnostico Bovinos</b>	<b>Barreras físicas Separación de especies.</b>
<b>1-T.SJG</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>2-B.SJG</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>
<b>3-AT.SJG</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>4-BA.JM</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>5-CO.SJG</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>6-SP.JM</b>	<b>SI</b>	<b>NO</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>7-F.CA</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>8-C.CA</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>9-E. CA</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>
<b>10-D.SJG</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>	<b>SI</b>



*Fig.8. Ejemplo de instalación utilizada para la alimentación de rumiantes silvestres en el área Natural Protegida de Sierra Fría Aguascalientes, en los sitios interfase de rumiantes silvestres-ganado para evitar el contacto y posible contagio por medio del alimento.*

*Tabla 11. Clasificación de las muestras por tipo de nódulo linfático afectado tanto de rumiantes silvestres como de ganado. \**

Especies	Muestras	Nódulos linfáticos de cabeza	Nódulos linfáticos de la cavidad torácica.	Nódulos linfáticos de la cavidad abdominal.
Bovinos	113	24	88	1
Venado cola blanca	60	5	53	2
Ciervo Rojo	20	4	15	1
Elk	12	0	11	1
TOTAL	205	33	167	5

Las lesiones encontradas en los bovinos se concentraron principalmente en los nódulos linfáticos de la cavidad torácica igual que rumiantes silvestres (167/38) (Tabla 11).

Los rumiantes silvestres que resultaron con algún tipo de lesiones macroscópicas fueron predominantes en adulto y mayor (90.9%; 60/66) además de machos (65,1%; 43/66; Cuadro 12).

*Tabla 12. Especie, Sexo y Edad del Ganado y rumiantes silvestres diagnosticados por histopatología de muestras de nódulos linfáticos (Significancia, hallazgos/total).*

Especies	Sexo		Valor de P <sup>a</sup>	Edad (Años)			Valor de P <sup>a</sup>
	Macho	Hembra		Joven (≤ 3.0)	Adulto (3.5-5.0)	Mayor (> 5.0)	
Ganado	11/17	59/96	0.7993	10/13	19/51	41/49	0.0000
Venado C .B.	38/38	5/22	0.0000	5/5	15/20	23/35	0.2596
Ciervo Rojo	12/12	1/8	0.0001	1/2	5/8	7/10	0.8480
Elk	9/9	1/3	0.0073	0/0	4/4	6/8	0.2733 <sup>b</sup>
Total de Rumiantes Silvestres	59/59	7/33	0.0000	6/7	24/32	36/53	0.5427

<sup>a</sup> *Uncorrected Pearson chi-square.*

<sup>b</sup> *Un grado de libertad.*

No hubo diferencias estadísticamente significativas ( $X^2$ ,  $p > 0,05$ ) entre la proporción de muestras positivas en relación al sexo (Tabla 12) de los bovinos diagnosticados por histopatología. Muestras de bovinos con lesiones sugestivas fueron predominantes ( $P < 0,01$ ) para el ganado adulto y mayor (60/70 superior a 3 años).

Tabla 13. Hallazgos histopatológicos en ganado y rumiantes silvestres diagnosticados para tuberculosis provenientes del Area Natural Protegida de Sierra Fria Aguascalientes.

Especie	Muestras	SHS <sup>a</sup>	MC	BN	NC	NA	LA	FGL	DL
Ganado	113	43	33	9	1	9	11	0	7
Venado C. B.	60	17	0	7	14	6	2	0	14
Ciervo Rojo	20	7	0	0	0	0	5	1	7
Elk	12	2	0	3	1	1	3	0	2
Total	205	69	33	19	16	16	21	1	30

<sup>a</sup> SHS = Sin hallazgos significativos; MC = Compatible Mycobacteriosis; BN = Bronconeumonía; NC= Neumonía Crónica; NA = Nódulos linfáticos con abscesos; LA = Linfadenitis; FGL = Fibrosis de los ganglios linfáticos; DL = Depleción linfoide.

Noventa y dos rumiantes silvestres fueron examinados por histopatología y 46.8% (43/92) tenían algún tipo de hallazgos significativos relacionados con varios procesos inflamatorios (bronconeumonía, neumonía crónica, abscesos, linfadenitis y fribrosis en nódulos), y el 25,0% (23/92) depleción linfoide (Tabla 13).



Fig. 9. Ejemplo de lesiones macroscópicas tanto en bovinos y rumiantes silvestres que necesitaron diagnostico histopatológico y cultivo (A, Venado Cola Blanca del ANPSF; B. muestra de bovino en el rastro FREASA).

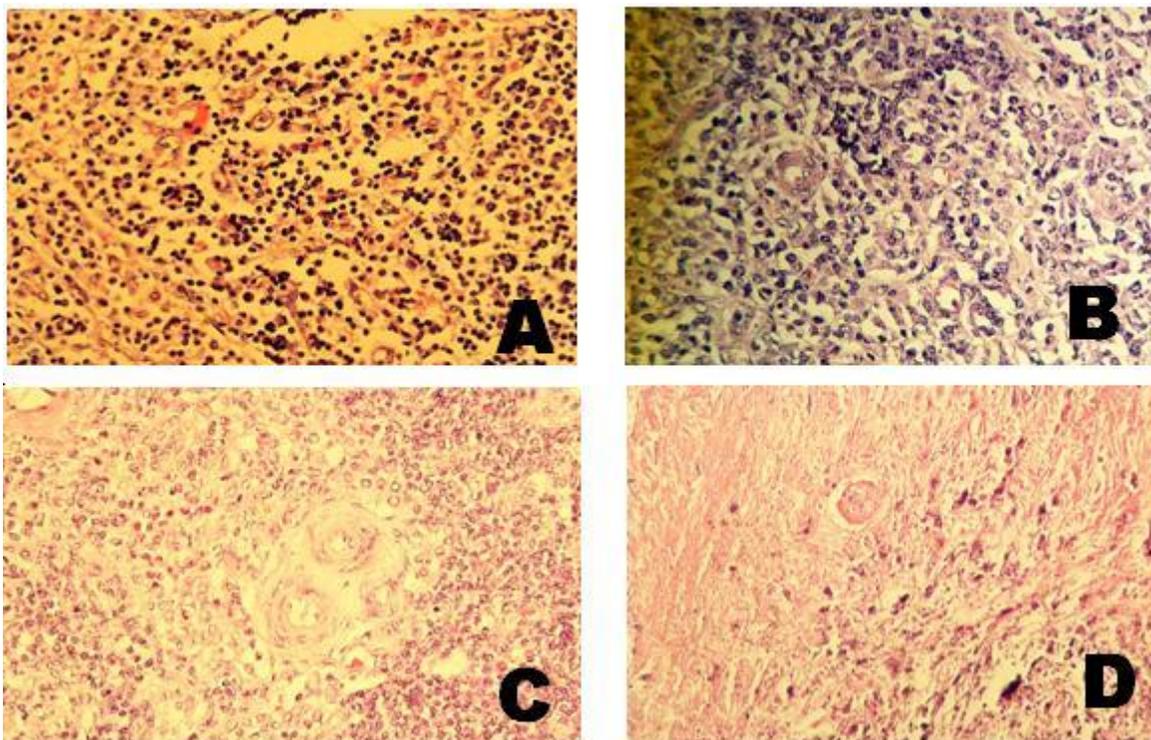


Fig. 10. Diagnóstico diferencial de TB. Panel A: Actinomicosis, neutrofilos, macrófagos y células epitelioides (*Actinobacillus lignieresii*). Panel B: Piogranuloma, neutrofilos y macrófagos. Panel C y D: Diagnóstico compatible con Tuberculosis bovina por tinción de Ziehl Neelsen.

Los valores observados de bronconeumonía en la prueba de independencia (X2) mostró que en edades de entre 3.5-5.0 años es significativa, en contra posición de la neumonía crónica que se presenta con valores significativos en edades que van de más de 5 años, por otro lado la depleción linfoide observada tiene los valores que presentaron diferencias significativas en las edades mayores de 3 años (Tabla 13). Ninguna de las muestras de especies silvestres de los rumiantes se reportaron con lesiones compatibles con tuberculosis bovina, pero el ganado bovino presento un 29.2% (33/113 bovinos) con lesiones microscópicas compatibles con tuberculosis bovina (Tabla 13). Adicionalmente por lo menos un bovino de cada hato identificado con TB fue analizado y corroborado mediante la prueba de PCR confirmando ser positivo a *M. tuberculosis* complex, presumiblemente de *M. bovis*, pero negativo a *M. avium* y *M. avium* subespecie *paratuberculosis*.

Los hatos de bovinos positivos a TB fueron totalmente despoblados y los bovinos fueron sacrificados en las plantas de sacrificio de la zona "B" bajo control veterinario oficial y, además, los hatos adyacentes y relacionados fueron puestos en cuarentena de forma cautelar ó precautoria. La cuarentena fue cancelada cuando la infección por TB no fue detectada por las pruebas de campo y de laboratorio. Ninguno de los rumiantes silvestres fue identificado como infectado con tuberculosis a la histopatología y el aislamiento. La Prevalencia real de *M. bovis* en ganado doméstico se calculó en 0.50% (intervalo de confianza 95%: 0.00-0.79) y 0.00% para los rumiantes silvestres.



## 7 DISCUSION

---

A pesar de que muchos aspectos de la epidemiología de la TB en ganado bovino en México se han descrito en los últimos 10 años, incertidumbres acerca de la verdadera prevalencia de la tuberculosis bovina en la población de rumiantes silvestres todavía se mantiene. En nuestro estudio, ninguno de los 142 rumiantes silvestres inspeccionados en el ANPSF fueron identificadas como positivos a TB; Sin embargo, en varios bovinos se demostró, a través de la histopatología, el cultivo y / o PCR, que presentaban la infección por *Mycobacterium bovis*. Aunque la tuberculosis bovina ha sido reportada en una amplia variedad de animales, a nuestro conocimiento este informe se presenta como el primer estudio documentado de búsqueda de esta enfermedad en rumiantes silvestres en cautiverio y silvestres en una zona de interfase en México. Es de gran relevancia esta información ya que conocemos el gran impacto y lo negativo de la tuberculosis bovina en la industria que afecta la calidad de los animales y su productividad. Además, este estudio demostró que es posible llevar a cabo en los rumiantes silvestres de las zonas de interfase la vigilancia epidemiológica. En condiciones naturales, los rumiantes silvestres tienen pocas enfermedades infecciosas, (Mackintosh, 1998) pero al entrar en contacto con las especies domésticas infectadas con TB eventualmente podría llegar a ser enzoótico. Este problema se ha informado en varios países como Nueva Zelanda (Griffin and Mackintosh, 2000), Francia (De Lisle *et al*, 2001) Inglaterra (Zanella *et al*, 2008) y USA (O'Really, 1995 y VerCauteren *et al*, 2008).

Durante el 2006 y 2007, dentro de las temporadas de caza fueron examinadas y colectadas muestras biológicas de nódulos linfáticos con lesiones sugestivas de TB del 64.8% (92/142) de los rumiantes silvestres aprovechados en las UMA's del ANPSF del Estado de Aguascalientes. Todas las muestras fueron analizadas y el resultado fue negativo en histopatología así como en bacteriología (Cultivo). Con esto se demostró la ausencia de tuberculosis bovina en los rumiantes silvestres del ANPSF. Esta ausencia de TB como resultado no es rara; de la misma manera, en Nebraska (U.S.A), no se encontró evidencia de tuberculosis en una muestra

271 nódulos linfáticos principalmente obtenidos de los cabezas, los cuales se examinaron con histopatología, bacteriología y PCR (Steffen *et al.*, 1999). Esta ausencia de TB se asoció con una baja densidad de población de venados cola blanca. En nuestra área de estudio, la densidad de población de venados cola blanca también fue baja, 4 venados/km<sup>2</sup> (Villalobos, 1998), por lo tanto los resultados de este estudio sugieren que la densidad de población del ANPSF puede ser un factor de riesgo relevante para la tuberculosis bovina. Lo que no representa un peligro epizootológico siempre y cuando no se suplemente, coincidiendo con lo reportado por Carranza *et al.*, 1995, quienes han demostrado que al comparar una misma zona sin suplementar y suplementándola, el número de interacciones ganado-ciervos pasa de 3.8 a 8.7. Palmer *et al.*, 2006 en su estudio sugieren que la contaminación de alimentos por bovinos infectados con *M. bovis* podría actuar como una fuente de transmisión indirecta entre el venado porque *M. bovis* es capaz de sobrevivir por largos períodos en el medio natural. A este respecto, se han realizado un limitado número de trabajos sobre la supervivencia de *M. bovis* en diversas condiciones ambientales. Si bien estos estudios no coinciden respecto al tiempo de vida del bacilo bovino ante la exposición directa al sol, todos ellos están de acuerdo en que las posibilidades de supervivencia aumentan en medios húmedos, sombreados y con condiciones de pH cercanos a la neutralidad. En estas condiciones se han detectado bacilos viables durante seis semanas (Duffield, 1985). Schmitt *et al.*, 1997 consideran que la suplementación de alimentos en épocas de escasez y el exceso de densidad (25 animales/km<sup>2</sup>) fueron los factores de riesgo más importantes para la difusión y mantenimiento de la enfermedad, los actuales esfuerzos para prohibir o controlar la alimentación suplementaria de los ciervos en los Estados Unidos deben tener un efecto positivo en la disminución de la transmisión de *M. bovis* entre los ciervos.

El ANPSF ha tenido la incorporación de los ciervos en el negocio de la caza controlada activamente sólo durante una década, lo acertado de la gestión cinegética, por ejemplo la correcta relación machos-hembras, la calidad y cantidad de los recursos naturales repercuten en el bienestar de los venados y por lo tanto

en su estrés, o lo que es lo mismo, a su susceptibilidad a padecer patologías, entre ellas la tuberculosis (Palmer *et al*, 2001). También se debe tener en cuenta que las prácticas de los suplementos dietético y el acceso de las distintas especies en los sitios de alimentación puede elevar el riesgo de transmisión (Miller y Kaneene, 2006). Hasta ahora se puede mencionar que ni el vallado cinegético, ni la densidad actual, parecen ser factores de riesgo para la presentación de TB en el ANPSF; aunque eventualmente se debe considerar el riesgo potencial de gestiones mal desarrolladas donde se permita o se propicie la interacción ganado-rumiantes silvestres.

En nuestro estudio, las necropsias fueron realizadas por personal capacitado en los procesos de inspección sanitaria de la carne y por rutina la inspección consideraba laminar todos los nódulos linfáticos importantes de forma bilateral tanto de la cabeza, como la cavidad torácica y abdominal teniendo en cuenta que en los exámenes parciales se puede perder lesiones (Zanella *et al*, 2008). O'Brien *et al*, 2001 y Fitzgerald *et al*, 2000 proponen que la inspección de los cadáveres parece ser un herramienta eficaz para el monitoreo de rutina de TB en las poblaciones de venados silvestres ya que puede llegar a ser enzoótica.

Las lesiones de tipo inflamatorio en los nódulos linfáticos fueron predominantes en los rumiantes silvestres adultos y maduros (90.9%) además de machos (65,1%). Esto sugiere que el comportamiento reproductivo es un factor de riesgo, ya que los grupos de rumiantes silvestres machos son por naturaleza estrictamente jerárquicos y muy competitivos, mientras que los grupos de hembras son cooperativos en la alimentación y transporte (Clutton-Hadley *et al*, 2002 y Carranza, 1988).

En el ganado, el examen microscópico con preparados de hematoxilina-eosina ha sido reportado como el medio más eficaz para identificar infecciones por *M. bovis*, debido a las características de los cambios celulares (Thoen *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando *M. bovis* infecta a otras especies, las lesiones pueden ser menos típicas, por lo tanto más difíciles de diferenciar de otras causas. Por lo cual, el cultivo bacteriano es necesario para confirmar la infección. El cultivo bacteriano tiene la inconveniencia de toma de 4 a 8 semanas (Cassidy *et al.*, 1999). En

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nuestro estudio el análisis microscópico reveló notables diferencias celulares, ya que en lugar de los granulomas característicos, con un núcleo necrótico, se observaron abscesos en lesiones de seis venados cola blanca y un Elk, el motivo de estas lesiones se desconoce con exactitud, pero creemos que es debido al estrés y las heridas producidas durante las luchas por el derecho a reproducirse o el consumo de alimentos ásperos y semileñosos durante el invierno. Estos abscesos como las lesiones de tuberculosis se encuentran comúnmente en venados y otros animales salvajes. También han sido reportadas en bovinos después de infecciones naturales y experimentales (Rhyan *et al.*, 1995); Reforzando lo descrito por Schmitt *et al.*, 1997 donde la tuberculosis bovina en otros rumiantes incluyendo el venado y el reno produce lesiones que a simple vista recuerdan a las del ganado bovino, pero extensamente se observan lesiones granulomatosas que involucran el lóbulo diafragmático del pulmón y pueden aparecer abscesos purulentos, en los nódulos linfáticos mesentéricos.

En este estudio, un total de 24.400 bovinos fueron probados en 793 hatos del ANPSF, resultando reactivos el 0.80% (191/24,400) a la PPC y el 0.04% (10/24,000) a la PCC. El uso de las pruebas intradérmicas ha sido una herramienta fundamental para la detección de bovinos infectados con *M. bovis*; Sin embargo, cuando la prevalencia es baja sus valores predictivos son insuficientes (Weddle y Livingstone, 1994). Otro de los problemas con la PPC y PCC es que no puede detectar animales anérgicos que presentan hipersensibilidad de tipo retardado hacia *M. bovis*, debido a su inmunidad celular deprimida, como es el caso de la administración de corticoides, la infección por diarrea viral bovina, avanzada gestación y lactancia (Ritacco *et al.*, 1991). Varias explicaciones se han propuesto para esta incapacidad de las pruebas cutáneas para detectar animales infectados, como la variación de potencia de PPD con el tiempo, la identificación errónea de los animales y los errores de los médicos aprobados en el momento de la inyección del PPD (Norby *et al.*, 2004). De todo el ganado probado los 10 PPC-PCC sospechoso y reactivos fueron sacrificados en plantas con inspección oficial, de los cuales 7 animales mostraron lesiones compatibles con *mycobacterium* y esto fue corroborado por HMC.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante el 2006 y 2007, un total de 0.19% (33/17,351) de los bovinos sacrificados provenientes del ANPSF fueron identificados como infectados por tuberculosis bovina a través de HMC y / o PCR para el complejo *M. tuberculosis*, presumiblemente de *M. bovis*. La frecuencia de las características histopatológicas observadas en los bovinos positivos fueron similares a las anteriormente reportadas por Cassidy *et al*, 1998 que consiste en un granuloma caseo-necrótico con fibrosis periférica y un foco mineralizado central rodeado de leucocitos mononucleares mixtos y células gigantes multinucleadas. Además, los bacilos ácido-resistentes estaban presentes en bajos números durante el examen histopatológico.

Los hatos de origen del ganado infectado fueron cuarentenados definitivamente y posteriormente despoblados, así como los colindantes que quedaron cuarentenados precautoriamente y fueron liberados después de cumplir con los requisitos estipulados en la NOM-031-ZOO-1995, campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). Como resultado de estas acciones el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, a través del Comité Binacional México-Estados Unidos de Tuberculosis, brucelosis y Garrapata resolvió en el 2010 mejorar la condición de clasificación de la zona en la que se encuentra el ANPSF como acreditada Preparatoria, esta resolución es reportada por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Los resultados de la vigilancia realizada en el ANPSF mostraron que todos los animales positivos a HMC provenían de siete hatos. Se sabe que la prevalencia aparente puede subestimar la verdadera prevalencia de tuberculosis bovina, ya que no toma en cuenta los animales infectados con *M. bovis* que aún no han manifestado lesiones (Palmer *et al*, 2004) La prevalencia real de *M. bovis* en ganado doméstico se calculó en 0.50% y 0.00% para los rumiantes silvestres. No hubo diferencias en la frecuencia de casos positivos en los 5 municipios del ANPSF, lo que indica que la TB en ganado es baja y se distribuye de manera uniforme. La ausencia de resultados de la prevalencia de tuberculosis bovina en los rumiantes silvestres no es una prueba concluyente, ya que puede tener un valor muy cercano a cero, lo que podría ser mayor en el futuro; por lo cual se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sugiere la necesidad de consolidar y ampliar las estrategias para el diagnóstico y la prevención de la TB en la fauna silvestre.

Aunque la prevalencia de tuberculosis bovina en el ganado doméstico en el área de estudio es baja (prevalencia real = 0.50%), existe siempre el riesgo de que los carnívoros locales, como los coyotes puedan acceder a los restos de bovinos muertos, por lo que es importante garantizar la eliminación adecuada de los restos de animales, para prevenir el contagio, con el fin de que los carnívoros no se conviertan en un mecanismo plausible de transmisión, ya sea para el ganado o de venado a carnívoro; sabemos que esta frecuencia de tipo de transmisión se desconoce. Y se sabe en este caso que la tradición en México propicia el uso de los órganos internos para preparar un gran número de recetas, lo que garantiza que la infección no se propaga a otras especies por este medio.

La respuesta general a las pruebas de campo propuestas fue positiva. La mayoría de los propietarios de tierras que fueron contactados para solicitar su anuencia para el muestreo en sus UMA's de caza recibieron positivamente la solicitud, aunque hubo algunos que no querían ser molestados con el proyecto. La experiencia en este estudio demostró que es perfectamente posible llevar a cabo la vigilancia epidemiológica de calidad en rumiantes silvestres en México, sin sobrepasar el costo medio de la vigilancia pasiva en el ganado doméstico.

## 8. CONCLUSIONES

---

Este estudio se realizó para demostrar la prevalencia de *Mycobacterium bovis* en una zona de interfase ganado-rumiantes silvestres y se encontró una prevalencia real en bovinos de 0.5 %.

No se encontró ninguna evidencia de que los rumiantes silvestres estén infectados con TB.

Aunque los brotes originales de la tuberculosis bovina en el ganado vacuno fueron erradicados, las actividades de vigilancia de tuberculosis bovina se deben mejorar en las zonas de interfase donde actualmente se crían y comercializan rumiantes silvestres exóticos y nativos.

El examen post mortem debe ser seguido por ensayos histológicos, bacteriológicos y moleculares de una proporción adecuada de todos los rumiantes silvestres, incluso en ausencia de signos evidentes de TB.

Debe de realizarse el manejo correcto de los órganos internos, con el fin de prevenir la propagación de la infección a los animales carnívoros.

En los programas gubernamentales para el control y erradicación de la TB se debe de considerar a los rumiantes silvestres como un reservorio potencial de TB y en consecuencia se debe implementar de manera rutinaria la inspección de los animales después de la caza o el sacrificio.

## 9. BIBLIOGRAFIA

---

Algood H., Chan J. y Flynn, J. 2003. *Chemokines and tuberculosis. Cytokine Growth Factor* 467-477.

Anthony F.G. y Smith N.S. 1997. *Ecological relationships between mule deer and white-tailed deer in southeastern Arizona. Ecol.Monogr.* 47[3], 255-277.

ASERCA. 1995. *El ganado vacuno en México. Claridades Agropecuarias de apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria* [23], 4-27. México, D.F., Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

ASERCA. 1995. *Panorama Internacional de la Ganadería. Claridades Agropecuarias de apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria* [23], 20-28. México, D. F., Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.

Audige L., Wilson P.R. y Morris R.S. 2001. "Disease and mortality on red deer farms in New Zealand." *Vet Rec* [148], 334-340.

Benavides G. 1994. *Bosquejo histórico del manejo y administración del venado cola blanca texano (O. v. texanus) en el noroeste de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 87. Mexico, D.F., UNAM.*

Bengis R.G., Kriek N.P., Keet D.F., Raath J.P., De Vos V. y Huchzermeyer H.F., 1996. *An outbreak of tuberculosis in free-living African buffalo (Syncerus caffer) population in the Kruger National Park: A preliminary report. J Vet Res* 15.

Begins RG, Kock RA, and Fischer J. 2002. *Infectious animal disease: the wildlife / livestock interface. Rev Sci Tech*;21:53-65

Bernabe A., Gomez,M.A., Navarro,J.A., Gomez,S., Sanchez,J., Sidrach,J., Menchen,V., Vera,A. y Sierra,M.A. 1990. "Morphology of caprine Tuberculosis II. Pulmonary Tuberculosis.". *An Vet Murcia* [6-7], 9-20.

Bishofburger A. y Nabhdy A., 1964. *Tuberkuloses wild als Ursache von Neuinfelationen in Rindviehbestanden. Schwiezer Archiv fur Tierheilkunde* 759-777.

Bolske G., Englund L., Wahlstrom H., de Lisle G.W., Collins D.M. y Croston P.S., 1995. *Bovine tuberculosis in Swedish deer farms: epidemiological investigations and tracing using restriction fragment analysis*. *Vet. Rec.* 136:414-417.

Bouvier G. 1963. *Possible transmission of tuberculosis and brucellosis from game animals to man and to domestic animals*. *Office International Des Epizooties* [59], 433-436.

Brox P.A. 1972. *Age determination of Venezuela Whitetailed deer* *Journal of Wildlife Management*. Dis. M1060-1067.

Bruning-Fann C.S., Schmitt S.M., Fitzgerald S.D., Fierke J.S., Friedrich P.D., Kaneene J.B., Clarke K.A., Butler K.L., Payeur J.B., Whipple D.L., Cooley T.M., Miller J.M. y Muzo D.P. 2001. *"Bovine tuberculosis in free-ranging carnivores from Michigan"*. *J Wildl.Dis* [37], 58-64.

Buddle B.M., Wedlock D.N. y Denis M., 2006. *Progress in the development of tuberculosis vaccines for cattle and wildlife*. *Vet. Microbiol.* 112:191-200.

Carranza J., Garcia-Munoz A.J. y Vargaz J.D. 1995. *"Experimental shifting from harem defence to territoriality in rutting red deer"*. *Anim Behav* [49], 551-554.

Cassidy J.P., Bryson D.G. y Pollock J.M. 1998. *Early lesion formation in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol*;119:27-44.

Cassidy J.P., Bryson D.G. y Neill S.D. 1999. *"Tonsillar lesions in cattle naturally infected with Mycobacterium bovis"*. *Vet Rec* [144], 139-142.

Castro-Martinez P.V., Escoriza M.T. y Sanahuja M. 2002. *Trabajo y Espacios Sociales en el ámbito domestico. Producción y prácticas sociales en una unidad domestica de la prehistoria de Mallorca*. *Geocritica VI*[10], 119. España, Scripta Nova.

Clifton-Hadle R.S. y Wilesmith, J.W. 1991. *Tuberculosis in deer: a review*. *Vet. Rec.* 129:5-12.

Clifton-Hadley R.S., Wilesmith J.W., Richards M.S., Upton P. y Johnston S. 1995. *"The occurrence of Mycobacterium bovis infection in cattle in and around an area subject to extensive badger (Meles meles) control"*. *Epidemiol Infect* [114], 179-193.

Collins D.M. 2001. "Virulence factors of *Mycobacterium bovis*". *Tuberculosis* [81], 97-102.

Collins D.M., Gabric D.M. y De Lisle G.W. 1988. "Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and other animals in the same locality". *N Z Vet J* [36], 45-46.

Corner L.A., 1994. *Postmortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle*. *Vet. Microbiol* 53-60.

Corner L.A., Melville L., McCubbin K., Small K.J., McCormick B.S. y Wood, P.R., Rothel J.S. 1990. "Efficiency of inspection procedures for detection of tuberculosis lesions in cattle". *Aust. Vet. J.* [67], 389-392.

Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C, Fujikura T. y Cousins D. 1998. *Zoonotic tuberculosis due to Mycobacterium bovis in developing countries*. *Emergency Infect Dis* 1-14.

Davidson W.R., Hayes F.A., Nettles V.F. y Kellogg F.E. 1981. *Diseases and parasites of whitetailed deer*. *Misc. Publ.*[No. 7], 458. Tallahassee, Fla., Tall Timbers Reserch Station.

De Lisle G.W., Bengis R.G., Schmitt S.M. y O'Brien D.J. 2002. "Tuberculosis in free-ranging wildlife: detection, diagnosis and management". *Rev Sci Tech* [21], 317-334.

De Lisle G.W., Mackintosh C.G. y Bengis R.G. 2001. "*Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer". *Rev Sci Tech* [21], 317-334.

Degerbol M. y Fredskild B. 1970. *The urus (Bos primigenius bojanus) and neolithic domesticated cattle Kongelige Danske Videnskabernes selskab. Biologiske Skrifter* 17[1], 1-234.

Delahay R.J., Cheeseman C.L. y Clifton-Hadley R.S. 2001. "Wildlife disease reservoirs: the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in the european badger (*Meles meles*) y other British mammals". *Tuberculosis* [81], 43-49.

Dodd K. 1984. "Tuberculosis in free-living deer". *Vet Rec* [115], 592-593.

Duffield B.J. 1985. "Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions". *Vet.Microbiol* [10], 193-197.

Dungworth D.L., Jubb K.V., Kennedy P.C. y Palmer N. 1993. "The respiratory system". Pages 493-504 in Academic Press Inc editor. *Pathology of domestic animals*. San Diego.

Fitzgerald S.D, Kaneene J.B. y Butler K.L. 2000. Comparison of postmortem techniques for the detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Vet Diagn Invest*;12(4):322-7.

Fricke I., Mitchell D., Mittelstadt J., Lehan N., Heine H., Goldmann T., Bohle A. y Randau S. 2006. *Mycobacteria* induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol*5173-5182.

Fujiwara P.I. 2001. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med*189-200.

Fulford G.R., Roberts M.G. y Heesterbeek J.A. 2002. "The metapopulation dynamics of an infectious disease: tuberculosis in possums". *Theor Popul Biol* [61], 15-29.

Gallagher J. y Clifton-Hadley R.S. 2000. "Tuberculosis in badgers; a review of the disease its significance for other animals.". *Res Vet Sci* 69[3], 203-217.

Gardner I.A, y Greiner M. 2000. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic studies. *Prev Vet Med*;45:43-59.

Gavier-Widen D., Chambers M.A., Palmer N., Newell D.G. y Hewinson R.G. 2001. "Pathology of natural *Mycobacterium bovis* infection in European badgers (*Meles meles*) and its relationship with bacterial excretion". *Vet Rec* [148], 299-304.

Gobierno del Estado de Aguascalientes. Decreto 88. Periódico Oficial: Órgano del 371 Gobierno Constitucional del Estado de Aguascalientes. Enero 30 1994; Tomo LVII:1-4.

Gortazar C., Torres M.J., Vicente J., Acevedo P., Reglero M., Negro J.J. y Aznar-Martin J. 2008. Bovine tuberculosis in Doña Ana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *Plus. One*.2776.

Gould S.J., 1974. The origin and function of "bizarre" structures: antler size and skull size in the irish elk "*Megaloceros giganteus*". *Evolution*.191-220.

Griffin J.F. y Mackintosh C.G. 2000 "Tuberculosis in deer: perceptions, problems and progress.". *Vet J* [160], 202-219..

Gutiérrez 1996. "Contribución al conocimiento anatomopatológico y diagnóstico de la tuberculosis bovina y caprina por *Mycobacterium bovis*". *Universidad de Leon* [32], 8-23. Leon, España, Universidad de Leon.

Hall E.R. 1981. *The Mammals of North America*. John Wiley and Sons, New York., 601-1181..

Hall E.R. y Kelson K.R. 1959. *The Mammals of North America*. The Ronald Press Co. New York, 1083.

Hirth D.H. 1973. *Social behavior of white-tailed deer in relation to habitat*. Ann Arbor, University of Michigan.

Hobbs M.V., Weigle W.O. y Nooman D.J. 1993. "Patterns of cytokine gene expression by CD4+ T cells from young and old mice". *J Immunol* [150], 3602-3614.

INEGI. 1981. *Síntesis Geográfica del Estado de Aguascalientes*, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México (D. F.) 78-94.

Johnson L.K., Liebana E., Nunez A., Spencer Y., Clifton-Hadley R., Jahans K., Ward A., Barlow A. y Delahay R., 2008. *Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from British deer*. *Vet. J.* 175:409-412.

Jubb K., Kennedy T.C. y Palmer N. 1985. *Pathology of domestic animals*. Pages 231-256 "Tuberculosis.". Orlando, Florida.

Leopold A.S. 1959. *Wildlife of Mexico*. Berkeley. University of California Press., 568.

Liebana E., Aranaz A., Dominguez L., Mateos A., Llamazares O., Ferr E., Dominfo M., Vidal D. y Cousins D. 1997. *The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprint of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain*. *Vet. Microbiol.* 54: 223-233.

Livingstone P.G. 1988. "Cattle TB: An update on the situation in New Zealand". *Surveillance* [15], 3-7.

Lugton I.W., Wilson P.R., Griffin J.F. y Lisle G.W. 1997. Natural infection of red deer with bovine tuberculosis. *N Z Vet J* 19-26.

Mackintosh C.G. 1998. "Deer health and disease". *Act Vet Hung* [46], 381-394.

Mackintosh C.G. y Griffin J.F., 1995. Investigation into the role of genetic resistance in the epidemiology of tuberculosis in deer. *Proceeding of a deer course for veterinarians deer branch of the mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal peyer's patches in calves. Vet. Pathol* 131-137.

Marcato P.S. 1981. *Anatomía e Histología Patológica del Mamífero Domestico* Pag. 323 "Tuberculosis (Patogenesi e morfologia generale)." Bologna, Italy.

Marin L.P. 1995. Efectos de la apertura comercial y la asimetría económica en la producción de carne de bovino. *Revista México Ganadero* [45], 69. México, D. F.

McIlroy S.G., Neill S.D. y McCracken R.M. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Veterinary Record* 718-721.

McMillin J.M., Sea U.S., Keenlyne K.D., Erickson A.W. y Jones J.E., 1974. Annual testosterone rhythm in the adult white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). *Endocrinology*. 1034-1040.

Medina F.A. 1988. Avances en materia de protección dentro del programa de conservación y aprovechamiento cinegético del venado cola blanca en el estado de Aguascalientes. *Simposio sobre venado cola blanca.*, 135-146. Laredo Texas.

Michael E.D. 1970. Activity patterns of white-tailed deer in south Texas. *Texas Journal Science*. XXI[4], 417-428.

Miller M.S. and Kaneene J.B. 2006. Evaluation of historical factors influencing the occurrence and distribution of *Mycobacterium bovis* infection among wildlife in Michigan. *Am J Vet Res*;67:604-615.

Mirarchi R.E., Scalon P.F. y Kirkpatrick R.L., 1977. Annual changes in spermatozoa production and associated organs of whitetailed deer. *Journal Wildlife Management*. 92-99.

Morris R.S. y Pfeiffer D.U. 1995. "Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand.". *N Z Vet J* [43], 256-265.

Morris R.S. y Pfeiffer D.U., Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology* 153-177.

Nieberle K. y Cohrs P. 1966. *Special pathological anatomy of domestic animals*. 2 edition. Pergamon Press Ltd, London.

Norby B, Bartlett P.C. y Fitzgerald S.D. 2004. *The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* 16:126-31.

Nugent G. y Lugton I.W. 1995. *Prevalence of bovine tuberculosis in wild deer in the Hauhungaroa Range, North Island, New Zealand*. *Tuberculosis in Wildlife and Domestic animals* 43, 273-275.. Otago, University of Otego Press.

O'Brien D.J., Fitzgerald S.D., y Lyon T.J. 2001. *Tuberculosis lesions in free-ranging whitetailed deer in Michigan*. *Short Communications. J Wildl Dis*;37:608-613.

O'Brien D.J., Schmitt S.M., Fierke J.S., Hogle S.A., Winterstein S.R., Cooley T.M., Moritz W.E., Diegel K.L., Fitzgerald S.D., Berry D.E. y Kaneene J.B. 2002. *Epidemiology of Mycobacterium bovis in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000*. *Prev. Vet. Med.* 54:47-63.

O'Brien D.J., Schmitt S.M., Fitzgerald S.D., Berry D.E. y Hickling G.J., 2006. *Managing the wildlife reservoir of Mycobacterium bovis: the Michigan, USA, experience*. *Vet. Microbiol.* 112:313-323.

O'Reilly L.M. 1995. "The epidemiology of Mycobacterium bovis infections in animals and humans: a review.". *Tuberculosis and Lung Disease* 76[1], 1-46.

Office of International Epizootics. 1996. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 3rd. Edition Office International des Epizootics, Paris, France, 723.

Ozoga J.J. y Verme J.L., 1982. *Physical and reproductive characteristics of a supplementally fed white-tailed deer herd*. *J Wildlife Management*.281-301.

Palmer M.V., Whipple D.L. y Olsen S.C., 1999. *Development of a model of natural infection with Mycobacterium bovis in white-tailed deer*. *J. Wildl. Dis.* 35:450-457.

Palmer M.V, Whipple D.L, y Waters W.R. 2001. *Experimental deer-to-deer transmission of Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res*;62:692-696.

Palmer M.V., Waters W.R. y Whipple D.L., 2004. *Shared feed as a means of deer-to-deer transmission of Mycobacterium bovis*. *J. Wildl. Dis.* 40:87-91.

Palmer M.V. y Waters W.R. 2006. *Survival of Mycobacterium bovis on feedstuffs commonly used as supplemental feed for white-tailed deer (Odocoileus virginianus)*. *J Wildl Dis* 42:853-858

Payeur J.B., Church S., Mosher L., Robinson-Dunn B., Schmitt S. y Whipple D. 2002. Bovine tuberculosis in Michigan wildlife. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969:259-261.

Penn N.D., Purkings L. y Kellcher J. 1991. "The effect of dietary supplementation with vitamins A, C y E on the cell-mediated immune function in elderly long-stay patients: A randomized controlled trial". *Age Ageing* 20, 169-174.

Rhyan J., Aune K., Hood B., Clarke R., Payeur J., Jarnagin J. y Stackhouse L. 1995. Bovine tuberculosis in a free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) from Montana. *J. Wildl. Dis.* 31:432-435.

Rhyan J. y Saari D. 1995. A comparative study of the histopathologic features of bovine tuberculosis in cattle, fallow deer (*Dama dama*), sika deer (*Cervus nippon*), and red deer and elk (*Cervus elaphus*). *Vet. Pathol.* 32:215-220

Rhyan J., Livingstone P., Ramsey D., De Lisle G., Nugent G., Collins D. y Buddle B. 2006. Advances in understanding disease epidemiology and implications for control and eradication of tuberculosis in livestock: the experience from New Zealand. *Vet. Microbiol.* 112:211-219.

Ritacco V, Lopez B. y De Kantor I. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*;50

Robinson R., Phillips P., Stevens G. y Storm, P., 1989. An outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in fallow deer (*Dama dama*). *Aust. Vet. J.* 66:195-197.

Rodwell T.C., Kriek N.P., Bengis R.G., Whyte I.J., Viljoen P.C., De Vos V. y Boyce W.M. 2001. "Prevalence of bovine tuberculosis in African buffalo at Kruger National Park." *J Wildl. Dis* [37], 258-264.

SAGARPA. NOM-031-ZOO, 1998. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Micobacterium Bovis*). Publicada en el Diario Oficial de la Federación el día 27 de Agosto de 1998.

Sauter C.M. y Morris R.S., 1995. Dominance hierarchies in cattle and red deer (*Cervus elaphus*): their possible relationship to the transmission of bovine tuberculosis. *N. Z. Vet. J.* 43:301-305.

SAS Institute, Inc. SAS/STAT<sup>MR</sup>. Release 6.12. 1999. Procedures guide for personalcomputers. Cary, N.C.: SAS Institute, Inc. USA.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Schmidbauer S., Wohlsein P., Kirpal G., Beineke A., Muller G., Muller H., Moser. y Baumgartner, W. 2007. Outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in a wild animal park. *Vet. Rec.* 161:304-307.

Schmitt S.M., Fitzgerald S.D., Cooley T.M., Bruning-Fann C.S., Sullivan L., Berry D., Carlson T., Minnis R.B., Payeur J.B. y Sikarskie J., 1997. Bovine tuberculosis in free-ranging white-tailed deer from Michigan. *J. Wildl. Dis.* 33:749-758.

SEDESOL. 1994. Programa Integral de Manejo de la Sierra Fría, Aguascalientes. Secretaría de Desarrollo Social de Gobierno del Estado. Subsecretaría De Ecología, 17-25.

Steffen D.J., Oates D.W., y Sterner M.C. 1999. Absence of tuberculosis in free-ranging deer in Nebraska. *J Wildl Dis.* 35:105-107

Severinghaus C.W. 1949. Tooth development and Wear as criteria of age in white-tailed deer. *Journal Wildlife Management.* 195-216.

Tato A. 1999. "Infecciones por *Mycobacterium* spp, en animales salvajes en la provincia de Caceres". *UNEX* 20[39], 56.

Thoen C.O., Quinn W.J. y Miller L.D. 1992. *Mycobacterium bovis* infection in North American elk (*Cervus elaphus*). *J Vet. Diagn Invest* 423-427.

Toward D.R., Scott R.M. y Goyengs L.S., 1965. Tuberculosis in a captive deer. *Amer. J. Vet. Res.* 26:339-346.

VerCauteren K.C., Atwood T.C., De Liberto T.J., Smith H.J., Stevenson J.S., Thomsen B.V., Gidlewski T. y Payeur J. 2008. Surveillance of coyotes to detect bovine tuberculosis, Michigan. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1862-1869.

Villalobos S.V. 1998. El Venado Cola Blanca en la sierra Fría Aguascalientes. Gobierno del Estado de Aguascalientes., 33-35. Oficina de Coordinación de Asesores.

Villareal G.J. 1988. Practicas para el mejoramiento del hábitat del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en el Noroeste de México. Simposio sobre venado cola blanca. Laredo, Texas U.S.A.[1], 198-226.

Weddle N.E. y Livingstone P.G. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet Microbiol*;40:23-39.

White M. 1973. The whitetail deer of the Arkansas National Wildlife Refuge. *Texas Journal Science.* 457-489.

*Wilson E.D. y Reeder D.M. 1993 Mammals species of the world. Smithsonian Institution Press., 1206.. Washington. USA.*

*Zanella G., Durand B., Hars J., Moutou F., Garin-Bastuji B., Duvauchelle A., Ferme M., Karoui C. y Boschioli M.L. 2008. Mycobacterium bovis in wildlife in France. J. Wildl. Dis. 44:99-108.*



ANEXO 1. Formato Oficial de envío de Muestras para Diagnostico de Tuberculosis

 <p>SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN</p>		 <p>COMITÉ ESTATAL PARA EL FOMENTO Y PROTECCIÓN PASTORAL DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES, S.C.</p>		<p><b>Campaña Estatal para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina en el Estado de Aguascalientes</b></p>		 <p>CODAGEA COMISIÓN PARA EL DESARROLLO AGROPECUARIO DEL ESTADO DE AGUASCALIENTES</p>	
<p><b>Formato de Envío de Muestras para Diagnóstico de Tuberculosis</b></p>				<p>FOLIO <b>Nº 807 A</b></p>			
<p>1.- TIPO DE ESTABLECIMIENTO</p> <p>TIF <input type="checkbox"/> RASTRO <input type="checkbox"/></p> <p><input type="checkbox"/> Otro _____</p>		<p>2.- ESPECIE</p> <p><input type="checkbox"/> Bovino <input type="checkbox"/> Caprino</p> <p><input type="checkbox"/> Porcino <input type="checkbox"/> Ovino</p> <p>Otro _____</p>		<p>3.- FECHA DE SACRIFICIO</p> <p>____/____/____</p> <p>Día Mes Año</p>		<p>4.- No. DE LOTE</p> <p>_____</p>	
<p>5.- No. DE ANIMALES QUE FORMAN EL LOTE</p> <p>_____</p>				<p>6.- No. DE ANIMALES CON LESIONES EN EL LOTE</p> <p>_____</p> <p>¿DE QUE TIPO?</p>			
<p>7.- No. DE CASO EN EL RASTRO</p> <p>_____</p>				<p>8.- DATOS DEL M.V.Z. QUE REMITE PARA DAR RESULTADOS</p> <p>Nombre y Apellidos _____</p> <p>Teléfono _____ Fax _____</p>			
<p>9.- DATOS DEL RASTRO</p> <p>Nombre y Apellidos _____</p> <p>Domicilio _____ Col. _____</p> <p>Municipio _____ Estado _____ Tel. _____</p>				<p>10.- DATOS DEL DUEÑO DEL ANIMAL</p> <p>Nombre y Apellidos _____</p> <p>Domicilio _____ Col. _____</p> <p>Municipio _____ Estado _____ Tel. _____</p>			
<p>11.- DATOS DEL INTRODUCIDOR/COMPRADOR</p> <p>Nombre y Apellidos _____</p> <p>Domicilio _____ Col. _____</p> <p>Municipio _____ Estado _____ Tel. _____</p>				<p>12.- TIPO DE ANIMAL EN RELACION A TUBERCULOSIS</p> <p>EXPUESTO <input type="checkbox"/> REACTOR <input type="checkbox"/> SOSPECHOSO <input type="checkbox"/> NEGATIVO <input type="checkbox"/> SE DESCONOCE <input type="checkbox"/></p>			
<p>13.- IDENTIFICACION DEL ANIMAL</p>							
<p>A) No. DE ARETE DE CAMPAÑA (ANOTAR LAS INICIALES DEL ESTADO DE ORIGEN)</p> <p>_____</p>		<p>B) OTROS ARETES</p> <p><input type="checkbox"/> ROJO (REACTOR TB)</p> <p><input type="checkbox"/> NARANJA (VACUNACION)</p> <p><input type="checkbox"/> AZUL (EXPORTACION)</p> <p>No _____</p>		<p>C) OTRAS IDENTIFICACIONES</p> <p><input type="checkbox"/> ARETE DE PLASTICO <input type="checkbox"/> TATUAJE</p> <p><input type="checkbox"/> MARCA A FUEGO <input type="checkbox"/> MARCA EN FRIJO</p> <p><input type="checkbox"/> MARCA DE SANGRE</p> <p>No _____</p>		<p>D) FIERRO (BIBULAR)</p> <p>_____</p>	
<p>E) EDAD _____ MESES</p>		<p>F) SEXO: <input type="checkbox"/> Hembra <input type="checkbox"/> Macho</p>		<p>G) RAZA _____</p>		<p>H) COLOR _____</p>	
<p>H) FOLIO DE CERTIFICADO ZOO-SANITARIO</p> <p>_____</p>		<p>I) FOLIO DE LA GUIA DE TRANSITO</p> <p>_____</p>		<p>J) No. DE CANAL</p> <p>_____</p>		<p>K) CLAVE DE RETENCION</p> <p>_____</p>	
<p>L) SE ANEXAN IDENTIFICACIONES</p> <p><input type="checkbox"/> SI (ESPECIFICAR) _____</p> <p><input type="checkbox"/> NO</p>		<p>M) PESO CANAL: BALANZA: _____ KILOGRAMOS ESTIMADO _____</p>					
<p>14.- RESULTADO DE INSPECCION POST-MORTEM. CRUCE SI ES: <input type="checkbox"/> CS LESION CASEOSA <input type="checkbox"/> CL LESION CALCIFICADA</p> <p>SEÑALE TODAS LAS LESIONES ENCONTRADAS.</p>							
<p>NODULOS LINFATICOS</p>				<p>OTROS</p>			
<p>A) CABEZA</p> <p><input type="checkbox"/> CS <input type="checkbox"/> CL</p> <p>RETROFARINGEOS MEDIOS _____</p> <p>RETROFARINGEOS LATERALES _____</p> <p>MANDIBULARES _____</p> <p>PAROIDEOS _____</p>		<p>B) VISCERAS</p> <p><input type="checkbox"/> CS <input type="checkbox"/> CL</p> <p>TRAQUEBRONQUIALES _____</p> <p>MEDIASTINICOS _____</p> <p>HEPATICOS _____</p> <p>MESENTERICOSOS _____</p>		<p>C) CANAL</p> <p><input type="checkbox"/> CS <input type="checkbox"/> CL</p> <p>CERVICAL SUPERIOR _____</p> <p>POPULTEOS _____</p> <p>ILIACOS _____</p> <p>ESCROTALES (M) _____</p> <p>MAMARIOS (H) _____</p>		<p>D) ORGANOS</p> <p><input type="checkbox"/> CS <input type="checkbox"/> CL</p> <p>PULMON _____</p> <p>HIGADO _____</p> <p>BAZO _____</p> <p>INTESTINO _____</p> <p>RISON _____</p>	
<p>E) GENERAL</p> <p><input type="checkbox"/> MILIAR (PERLADA)</p> <p><input type="checkbox"/> OTRA ESPECIFICA _____</p>		<p>15.- MUESTRA(S) QUE ENVIA AL LABORATORIO</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>					
<p>16.- Nombre y Apellidos del M.V.Z. Responsable de la Campaña en su Localidad</p> <p>_____</p> <p>Teléfono _____</p> <p>Fax _____</p>							
<p><b>PARA USO EXCLUSIVO DE LABORATORIO</b></p>							
<p>17.- FECHA DE RECEPCION</p> <p>_____</p>		<p>18.- No. DE CASO</p> <p>_____</p>		<p>19.- RECIBIO:</p> <p>_____</p>			

Original: Laboratorio

1ª Copia: Coordinador Estatal y/o Superior Distrital

2ª Copia: Médico que tomó la muestra

1           **No evidence of *Mycobacterium bovis* transmission from domestic cattle to wild**  
2                           **ruminants in a Mexican wildlife-livestock interface area**

3  
4       Luis F. Cisneros, DVM, Ph. D.; Arturo G. Valdivia, DVM, Ph. D.; Kenneth Waldrup, DVM,  
5       Ph. D.; Efrén Díaz-Aparicio, DVM, Ph. D.; Armando Martínez, DVM, Ph. D.; Carlos R.  
6                           Cruz-Vázquez, DVM, Ph. D.; Raúl Ortiz, DVM, Ph. D.

7  
8       From the Committee for Promoting and Protecting Livestock (Cisneros), km 21.5 carretera  
9       Aguascalientes-Zacatecas, San Francisco de los Romo, Aguascalientes 20300, México;  
10       Agricultural Sciences Centre (Valdivia, Martínez, and Ortiz), Universidad Autónoma de  
11       Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20131, México; Texas Department of  
12       State Health Services, Zoonosis Control (Waldrup), 401 E. Franklin Street, Suite 210, El  
13       Paso, Texas 79901-1206, USA; National Center for Disciplinary Research in Microbiology  
14       (Díaz-Aparicio), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, km  
15       15.5, carretera México-Toluca, Cuajimalpa D. F. 05110, México; and Instituto Tecnológico  
16       El Llano (Cruz-Vazquez), Aguascalientes 20041, Mexico.

17  
18       Supported by the Aguascalientes Produce Foundation A. C. (Project of financial support No.  
19       01-2008-1343).

20  
21       The authors give thanks to the Unión Ganadera Regional Hidrocálida, the Aguascalientes  
22       Committee for Promoting and Protecting Livestock, and the owners of the Wildlife  
23       Management Units.

24  
25       Address correspondence to Dr. Valdivia ([avaldiv@correo.uaa.mx](mailto:avaldiv@correo.uaa.mx)).

26 **Objective-** To determine the association of *Mycobacterium bovis* infected cattle and wild  
27 ruminants in a wildlife-livestock interface area (WLIA), in Mexican highland plateau.

28 **Animals-** 110 white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), 20 red deer (*Cervus elaphus*), and  
29 12 North American elk (*Cervus canadensis*) harvested by licensed hunters between 2006 and  
30 2007 in a WLIA with low population density (4 deer/km<sup>2</sup>) in central Mexico. All cattle herds  
31 in the WLIA (N=793) which comprised 24,400 cattle in field, and 17,351 commercially  
32 slaughtered cattle.

33 **Procedures-** Cattle were serially tested with intradermal tuberculin at the caudal fold and  
34 comparative cervical tests. Cattle and wild ruminants were inspected postmortem for gross  
35 lesions; samples were analyzed via histopathology and mycobacterial culture (HMC). A PCR  
36 assay was performed on HMC positive samples. True prevalence and chi-square tests were  
37 calculated.

38 **Results-** Wild ruminants showed inflammatory lesions in lymph nodes, although HMC  
39 results were not compatible with *M. bovis* infection. Positive reactions to tuberculin and  
40 positive HMC test results (10 and 33, respectively) were found in cattle. In 7 herds, at least 1  
41 bovine was confirmed as PCR-positive for *M. tuberculosis* complex, presumably *M. bovis*.  
42 Positive herds were depopulated and disinfected; adjacent and related herds were quarantined  
43 as a precaution. The true prevalence of *M. bovis* was 0.50% (95% confidence interval: 0.00-  
44 0.79%) in cattle and 0.00% in wild ruminants.

45 **Conclusions and Clinical Relevance-** Even though these findings suggest that *M. bovis* still  
46 has not been transmitted from cattle to wild ruminants in this WLIA, diagnosis and  
47 prevention activities should be implemented and consolidated.

48 **Abbreviations**

- 49 bTB Bovine tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*
- 50 CEFOPPA The Aguascalientes Committee for Promoting and Protecting Livestock
- 51 HMC Histopathology and mycobacterial culture
- 52 WLIA Wildlife/livestock interface area
- 53 WR Wild ruminant
- 54 WTD White-tailed deer



55 The tuberculosis is an infectious, granulomatous disease caused by bacilli of the genus  
56 *Mycobacterium* which has plagued humankind since prehistoric times.<sup>1</sup> Bovine tuberculosis  
57 (bTB), caused by *M. bovis*, affects a number of mammalian species and it was a major  
58 disease in humans and domestic animals before control measures were adopted.<sup>2</sup> The bTB  
59 remains as a significant zoonosis in many parts of the world and it can affect animal trade and  
60 commerce in infected areas. A wildlife-livestock interface area (WLIA) is a place where  
61 domestic cattle and wild ruminant coexist and share access to natural resources. One problem  
62 in WLIA is the lack of basic field data on their pathogen-animal interactions.<sup>3</sup>  
63 In North America, bTB infection has become enzootic in free-ranging cervid populations,<sup>4</sup>  
64 specially white-tailed deer (WTD) which have been implicated as the bTB source of infection  
65 for domestic cattle herds.<sup>5</sup> The bTB can be transmitted between animals through aerosol,  
66 saliva and nasal secretions;<sup>6</sup> the use of common feeding sites may increase *M. bovis*  
67 transmission<sup>7</sup> by concentrating deer and promoting direct interaction among them, as well as  
68 with contaminated feedstuff.<sup>8</sup> The bTB lesions in infected cattle and deer are sometimes not  
69 visible, therefore infection can only be confirmed by bacteriologic culture of tissue.<sup>9</sup>  
70 In Mexico, bTB infection is widely spread in cattle.<sup>2,10</sup> Based on cattle prevalence, the  
71 National Tuberculosis Eradication Campaign considers two bTB zones. Zone “A” has a  
72 lower (<0.5 %) herd prevalence and it is considered in eradication phase, while Zone “B” has  
73 a higher (0.5-2.5 %) herd prevalence and is in control phase. On the other hand, there is not  
74 any information concerning bTB prevalence in any Mexican WLIA. The Sierra Fria is a  
75 WLIA Protected Natural Area, legally recognized in 1994 by the Government of the State of  
76 Aguascalientes,<sup>11</sup> is located within Zone “A” and contains an important population of wild  
77 and captive ruminants and other fauna. A low density was found in the last deer population  
78 estimate in WLIA;<sup>12</sup> population was calculated at 2,690 (4/km<sup>2</sup>), and projected fawn  
79 recruitment was 350 per year with a 45% average of survival.

80 The Aguascalientes Committee for Promoting and Protecting Livestock (CEFOPPA) and the  
81 Aguascalientes Produce Foundation are two local civil societies concerned with decreasing  
82 the incidence of bTB in domestic livestock through diagnostic tests, slaughter and the  
83 implementation of control measures prescribed by the Mexican Ministry of Agriculture,  
84 Livestock, Rural Development, Fishing and Food.<sup>13</sup> The bTB transmission between cattle and  
85 wild ruminant (WR) populations is considered an evidence of lost of efficiency in control  
86 measures.<sup>3,4</sup> Therefore, bTB eradication may not be possible in those WLIA where domestic  
87 cattle and wildlife are handled without diagnosis, surveillance and control measures.<sup>8</sup> This  
88 premise encouraged this epidemiological study which was performed in special WLIA  
89 Wildlife Management Units intended for legal and sustained hunting.

90 The aim of this study was to determine the association of *Mycobacterium bovis* infected cattle  
91 and wild ruminants in a wildlife-livestock interface area in the Mexican highland plateau via  
92 postmortem examination, histopathology, mycobacteriological culture, and molecular  
93 identification.

## 94 MATERIALS AND METHODS

95  
96  
97 **Survey area**– This study was performed in the WLIA, located in the northwestern part of the  
98 state of Aguascalientes, Mexico (Fig.1); this area is approximately located at 21°52'50" and  
99 22° 19'46" North and 102° 22'50" and 102° 51'26" West, and extends over 1120 km<sup>2</sup>  
100 (276,980 acres).<sup>11</sup> The municipalities of San José de Gracia, Calvillo, Jesús Maria, Rincón de  
101 Romos and Pabellón de Arteaga are located within the area. The WLIA has a rugged  
102 topography with an altitude ranging from 1,800 to 3,050 meters above sea level. There are  
103 many rocky canyons, ravines, hills and plateaus. The lithology of the region consists mainly  
104 of sandstone, igneous rock, acidic extrusions, alluvial deposits, calcareous tuffs basalt and

105 rhyolite. Temperate oak (*Quercus* spp.) and pine (*Pinus* spp.) cover nearly 72 % of the  
106 region.<sup>14</sup>

107

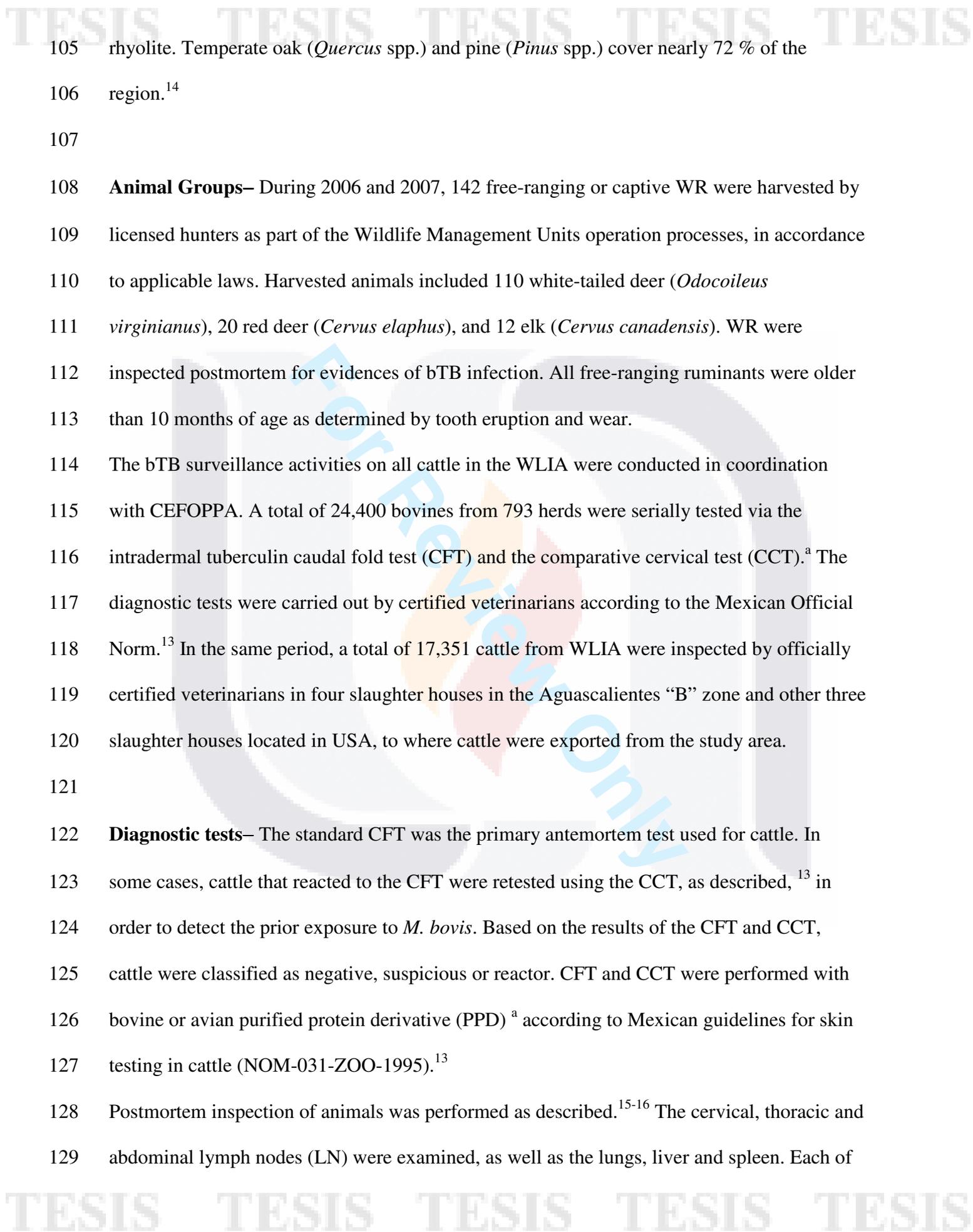
108 **Animal Groups**– During 2006 and 2007, 142 free-ranging or captive WR were harvested by  
109 licensed hunters as part of the Wildlife Management Units operation processes, in accordance  
110 to applicable laws. Harvested animals included 110 white-tailed deer (*Odocoileus*  
111 *virginianus*), 20 red deer (*Cervus elaphus*), and 12 elk (*Cervus canadensis*). WR were  
112 inspected postmortem for evidences of bTB infection. All free-ranging ruminants were older  
113 than 10 months of age as determined by tooth eruption and wear.

114 The bTB surveillance activities on all cattle in the WLIA were conducted in coordination  
115 with CEFOPPA. A total of 24,400 bovines from 793 herds were serially tested via the  
116 intradermal tuberculin caudal fold test (CFT) and the comparative cervical test (CCT).<sup>a</sup> The  
117 diagnostic tests were carried out by certified veterinarians according to the Mexican Official  
118 Norm.<sup>13</sup> In the same period, a total of 17,351 cattle from WLIA were inspected by officially  
119 certified veterinarians in four slaughter houses in the Aguascalientes “B” zone and other three  
120 slaughter houses located in USA, to where cattle were exported from the study area.

121

122 **Diagnostic tests**– The standard CFT was the primary antemortem test used for cattle. In  
123 some cases, cattle that reacted to the CFT were retested using the CCT, as described,<sup>13</sup> in  
124 order to detect the prior exposure to *M. bovis*. Based on the results of the CFT and CCT,  
125 cattle were classified as negative, suspicious or reactor. CFT and CCT were performed with  
126 bovine or avian purified protein derivative (PPD)<sup>a</sup> according to Mexican guidelines for skin  
127 testing in cattle (NOM-031-ZOO-1995).<sup>13</sup>

128 Postmortem inspection of animals was performed as described.<sup>15-16</sup> The cervical, thoracic and  
129 abdominal lymph nodes (LN) were examined, as well as the lungs, liver and spleen. Each of



130 the inspected organs was subjected to extensive macroscopic examination with multiple  
131 incisions in order to detect possible granulomas. Samples from suspected lesions were taken  
132 for histopathology and *Mycobacterium spp.* culture (HMC).  
133 Samples for histopathology were fixed using formalin (10%) in phosphate buffered saline  
134 (PBS) and imbedding them in paraffin. Embedded tissues were sliced, mounted and stained  
135 with Hematoxylin-Eosin and Ziehl-Neelsen; bTB suggestive lesions with acid-fast bacilli  
136 were identified as described.<sup>17</sup> Additional samples from these lesions were independently  
137 macerated in mortars with 5.0 ml of PBS with red phenol as pH indicator. Afterwards,  
138 samples were digested, decontaminated with 0.5 N sodium hydroxide, neutralized with 6 N  
139 hydrochloric acid, and centrifuged at 3500 x g for 20 minutes. The sediment from each  
140 sample was cultured at 37 °C in either Stonebrink's media supplemented with pyruvate,  
141 Middlebrooks 7H11 media, Herrold's media with egg yolk or Lowenstein-Jensen media.  
142 After incubation, suspicious colonies were cultured again in Proskauer-Beck medium with  
143 5% equine serum in order to perform biochemical testing and identifying the genus and  
144 species. Cultures without bacilli growth after three months were considered negative.<sup>17</sup>  
145 The polymerase chain reaction (PCR) was performed on samples from animals with bTB  
146 compatible histopathology and mycobacterial culture. The samples tested were formalin-  
147 fixed and paraffin-embedded tissues. The following primers were used for mycobacterial  
148 identification as described:<sup>18</sup> IS6110 for *Mycobacterium tuberculosis* complex (including *M.*  
149 *tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* and *M. africanum*), 16S rRNA for *M. avium* and IS900 for  
150 *M. avium* subspecies *paratuberculosis*.<sup>b</sup>

151

152 **Statistical analysis**—The sensitivity (Se) was calculated as the conditional probability of a  
153 positive test result, given that the animal was actually infected with bTB. The specificity (Sp)  
154 was calculated as the conditional probability of a negative test result, given that the animal

155 was not actually infected with bTB. The individual apparent prevalence (AP) was calculated  
156 as the proportion of tested animals that tested positive. True prevalence (TP) was estimated  
157 with AP, adjusted by Se and Sp,<sup>19</sup> using the formula  $TP = [(AP - Sp - 1) / (Se + Sp - 1)]$ , where Se  
158 and Sp are the combined sensitivity and specificity of the CFT, CCT and gross necropsy  
159 results.<sup>15</sup> Animals were classified as infected if they tested positive on the histopathology -  
160 mycobacterial culture, the PCR or both. AP, Se and Sp are reported as point estimates with a  
161 95% confidence interval for binomial proportions. Gender, age, and lesion type differences in  
162 TP were determined by use of  $\chi^2$  tests with  $P \leq 0.05$  as the value needed for reject the null  
163 hypothesis of no significant differences among evaluated groups. Commercially available  
164 software<sup>c</sup> was used for all statistical analyses.

165

## 166 **RESULTS**

167

168 During the 2006 and 2007 regular hunting seasons, all legally harvested WR were examined  
169 postmortem (Table 1): 64.8% of the carcasses (92/142) showed grossly lesions. All samples  
170 collected were identified as bTB negative for histopathologic granulomatous lesions and  
171 *Mycobacterium spp.* culture. During the same period, tests were conducted on the entire cattle  
172 population of WLIA (N = 24,400) with CFT, resulting in 191 reactors (Table 2). These CFT-  
173 positive cattle were CCT re-tested, resulting in 2 suspects and 8 reactors from 2 of the 793  
174 herds. The CFT-CCT positive cattle were immediately sent to local and foreign slaughter  
175 plants under official inspection.

176 The WR carcasses with suspicious gross lesions were predominant in middle and mature  
177 (90.9%; 60/66) male animals (65.1%; 43/66; Table 3). On the other hand, a total of 0.65 %  
178 slaughtered cattle (113/17,351) were identified with bTB suggestive lesions (Table 1), but  
179 only 29.2 % (33/113) of them showed bTB compatible granulomatous lesions. From this last

180 group, 93.9 % (31/33) were identified as infected with bTB via isolation of *Mycobacterium*  
181 *spp.* The 33 HMC positive cattle came from the following 7 herds (Figure 1): 2 herds with 7  
182 bovines detected during field surveillance by tuberculin tests and confirmed by HMC, as well  
183 as 5 herds with 26 TB positive bovines detected by HMC in lesions observed in  
184 commercially slaughtered cattle. There were not significant statistical differences ( $\chi^2$ ,  $P >$   
185 0.05) among the proportions of positive samples related to cattle gender (Table 3). Bovine  
186 samples with bTB suggestive lesions were predominant ( $P < 0.01$ ) in middle and mature cattle  
187 (60/70) older than 3 years old.

188 Ninety-two WR were examined by histopathology and 46.8 % (43/92) showed some types of  
189 significant findings related to several inflammatory processes (bronchopneumonia, chronic  
190 pneumonia, abscessed node, lymph adenitis or fibrotic lymph nodes), and 25.0% (23/92)  
191 evidenced lymphoid depletion. The inspected WR showed relation between lesion types and  
192 their anatomic locations: inflammatory lesions (66/92) were observed mainly in the  
193 mediastinic and tracheo-bronchial nodes (Table 4).

194 The HMC positive samples were analyzed via PCR; at last one bovine per cattle herd was  
195 confirmed as bTB positive for *M. tuberculosis* complex, presumably from *M. bovis*, but  
196 negative to *M. avium* and *M. avium* subspecies *paratuberculosis*. The bTB -positive cattle  
197 herds were totally depopulated and the bovines were slaughtered in the “B” zone under  
198 official veterinary inspection; in addition, the adjacent and related herds were quarantined as  
199 a precaution. The quarantine was cancelled when the bTB infection was not detected by field  
200 and laboratory tests. None of the WR were identified as infected with tuberculosis neither by  
201 histopathology nor isolation, therefore the PCR test was not performed. In cattle, herd and  
202 individual apparent prevalence were estimated at 0.88 and 0.14% (7/793 herds and 33/24,400  
203 cattle). Combined sensibility and specificity of CFT-CCT-necropsy were calculated at 93.9

204 and 99.7 % (31/33 and 24,285/24,367). The true prevalence of *M. bovis* in domestic cattle  
205 was calculated at 0.50% (95% confidence interval: 0.00-0.79) and 0.00% for WR.

206

## 207 **DISCUSSION**

208

209 Even though many aspects of bTB epidemiology in Mexican cattle have been described in  
210 recent years,<sup>10</sup> uncertainties about the true prevalence of bTB in the WR population have still  
211 remained. In our study, none of the 142 inspected WR were identified as bTB positive;  
212 however, several bovines were proved, via histopathology-culture and/or PCR, to have a  
213 *Mycobacterium bovis* infection.

214 Although bovine tuberculosis has been reported in a wide variety of animals, to our  
215 knowledge this report provides the first documented research of this disease in free-ranging  
216 and captive WR in any WLIA in México. It is highly relevant for the wildlife and livestock  
217 industry to decrease the large and negative impact that bTB has on animal quality and  
218 productivity. In addition, this study demonstrated that it is possible to perform wildlife  
219 epidemiological surveillance in developing countries like Mexico.

220 Under natural conditions, the WR species have few infectious diseases,<sup>20</sup> but upon contact  
221 with infected domestic species, bTB might eventually become enzootic. This problem has  
222 been reported in various countries<sup>21</sup> such as New Zealand,<sup>22</sup> France,<sup>23</sup> England,<sup>24</sup> and the  
223 USA.<sup>25</sup>

224 During the 2006 and 2007 regular hunting seasons, free-ranging and captive WR carcasses  
225 were examined grossly for granulomatous lesions. In 64.8% (92/142) of the carcasses LN  
226 samples with some lesion type were collected, but all of them were bTB negative by HMC.

227 This study showed the absence of bTB in WR from this WLIA. This absence is not a rare  
228 result; in the same manner, in Nebraska (USA), there was not any evidence of tuberculosis in

229 cranial LN (n = 271) microscopically examined and by PCR using *M. bovis* specific probes.<sup>26</sup>

230 The bTB absence was associated with a low density of WTD population. In our study area,

231 the WTD population density was also low (4 deer/km<sup>2</sup>),<sup>12</sup> therefore the results of this study

232 suggest WR population density in the WLIA as a relevant risk factor for bTB.

233 Feed supplementation is another important risk factor for the dissemination and maintenance

234 of the disease, because it induces an excess in population density and increases the number of

235 cattle-deer or deer–deer interactions.<sup>5-27</sup> However, in last two decades the Wildlife

236 Management Units in our WLIA have participated in the business of controlled hunting, and

237 local residents feed WR creating an artificially high population density of WR. This,

238 combined with interaction among cattle herds may constitute a potential risk for the increase

239 of diseases transmission in WLIA.

240 In our study, whole WR carcasses were inspected by a professional staff with wide expertise

241 in slaughter activities with a field routine consistent in bilateral examination of the cranial,

242 thoracic, and abdominal organs and lymphatic nodes, given that partial examinations might

243 have missed some gross lesion.<sup>28</sup> Authors<sup>23-29</sup> propose that necropsy seems to be a

244 satisfactory routine tool for monitoring bTB in wild deer populations where it may become

245 enzootic. Inflammatory lesions in lymphatic nodes were predominant in middle and mature

246 (90.9%) male WR (65.1%). This suggests that reproductive behavior is a risk factor, since the

247 WR male groups are strictly hierarchical and very competitive, while the female groups are

248 cooperative in feed and transport.<sup>30-31</sup>

249 In cattle, microscopic examination using a stain of hematoxylin-eosin preparations has been

250 reported as efficient procedure to identify *M. bovis* infections, due to their characteristic

251 cellular changes.<sup>32</sup> On the other hand, when *M. bovis* infects other species, the lesions can be

252 less typical, hence harder to discriminate from other etiologies,<sup>33</sup> therefore bacterial isolation

253 is required in order to confirm the infection. In our study, microscopic analysis in WR

254 revealed remarkable cellular differences compared to bTB; instead of the characteristic  
255 granuloma with a caseus necrotic core, lymphatic nodes were abscessed with liquefactive  
256 necrosis.<sup>32</sup> These abscesses similar to bTB lesions are commonly found in deer and other wild  
257 animals. They have also been reported in cattle after natural and experimental infections.<sup>34</sup>  
258 The origin of these lesions remains unknown, but we believe that is due to stress and injuries  
259 suffered in fights during the near hunting season reproductive periods. In our study, the  
260 inspected WR showed association between lesion type and its anatomic location; our  
261 necropsy protocol included not only the head nodes but all lymphatic nodes (tracheal-  
262 bronchial, mediastinal, retropharyngeal, submaxillary, mesenteric, hepatic, prescapular,  
263 prefemoral, iliac and supramammary, as well as lungs, liver and spleen). The bTB  
264 examination for hunted WTD commonly includes only the head lymphatic nodes; results of  
265 such examinations may underestimate disease prevalence as much as 57%.<sup>35</sup> It has been  
266 indicated that there is a relationship between lesion location and management circumstances,  
267 being thoracic and abdominal lesions the most common in captive cervids and cranial lesions  
268 in free-ranging cervids.<sup>21</sup> Retropharyngeal lymphatic nodes are more sensitive in detecting  
269 lesions than extracranial lymphatic nodes or lungs.<sup>36,37</sup> This data suggests that during bTB  
270 surveillance in WR, it is appropriate to perform a necropsy with a comprehensive review of  
271 whole carcasses.

272 In this study, a total of 24,400 bovines were tested in 793 herds from a WLIA, resulting in  
273 0.80 % reactors (191/24,400) to the CFT and 0.04 % (10/24,000) to the serial CCT. The use  
274 of intradermal tests has been a fundamental tool for detecting infected cattle with *M. bovis*;  
275 however, when prevalence is low its predictive values are insufficient.<sup>38</sup> Another problem  
276 with CFT and CCT is that they cannot detect anergic animals that do not present delayed-type  
277 hypersensitivity towards *M. bovis* due to their depressed cellular immunity, such is the case  
278 of corticosteroid administration, infection with bovine diarrhea virus, advanced gestation and

279 lactation.<sup>39</sup> Several explanations have been proposed for this inability of skin tests to detect  
280 infected animals, such as PPD potency variance with time, mistaken animal identification,  
281 and other operator errors in the PPD injection.<sup>15</sup>

282 All of the 10 CFT-CCT reactor-suspicious cattle were slaughtered under official inspection  
283 from which 7 animals showed lesions compatible to mycobacteriosis by HMC. During the  
284 2006 to 2007 period, a total of 0.19 % (33/17,351) slaughtered cattle from WLIA were  
285 identified as infected with bTB via HMC and/or PCR for *M. tuberculosis* complex,  
286 presumably from *M. bovis*. The commonly observed histopathologic features in positive  
287 cattle were similar to those previously reported<sup>33</sup> consisting of a caseonecrotic granuloma  
288 with peripheral fibrosis and a central mineralized foci surrounded by mixed mononuclear  
289 leukocytes and multinucleate giant cells. In addition, acid-fast bacilli were present in low  
290 numbers during histopathologic examination.

291 The origin, adjacent, and related cattle herds were depopulated or quarantined. As a result of  
292 these bTB surveillance actions, the United States Department of Agriculture and the Bi-  
293 National Tuberculosis and Brucellosis Eradication Committee, resolved in 2010 to improve  
294 the ranking status of the area where the WLIA is located to Preparatory Accredited; this  
295 resolution was reported by the Mexican National Service of Food and Agriculture, Health,  
296 Safety and Quality.<sup>d</sup>

297 The results of the bTB surveillance in WLIA showed that all of the MHC positive cattle were  
298 allocated in 7 herds. It was proposed that the apparent prevalence may underestimate the real  
299 prevalence of bTB because it does not consider those animals infected with *M. bovis* that  
300 still have not manifested gross lesions.<sup>40</sup> The true prevalence of *M. bovis* in domestic cattle  
301 was calculated at 0.50% and 0.00% for wild ruminants. There was no difference in the  
302 frequency of positive cases within the 4 municipalities of the WLIA, indicating that bTB in  
303 cattle is low and evenly distributed. The absence of findings of bTB prevalence in WR is not

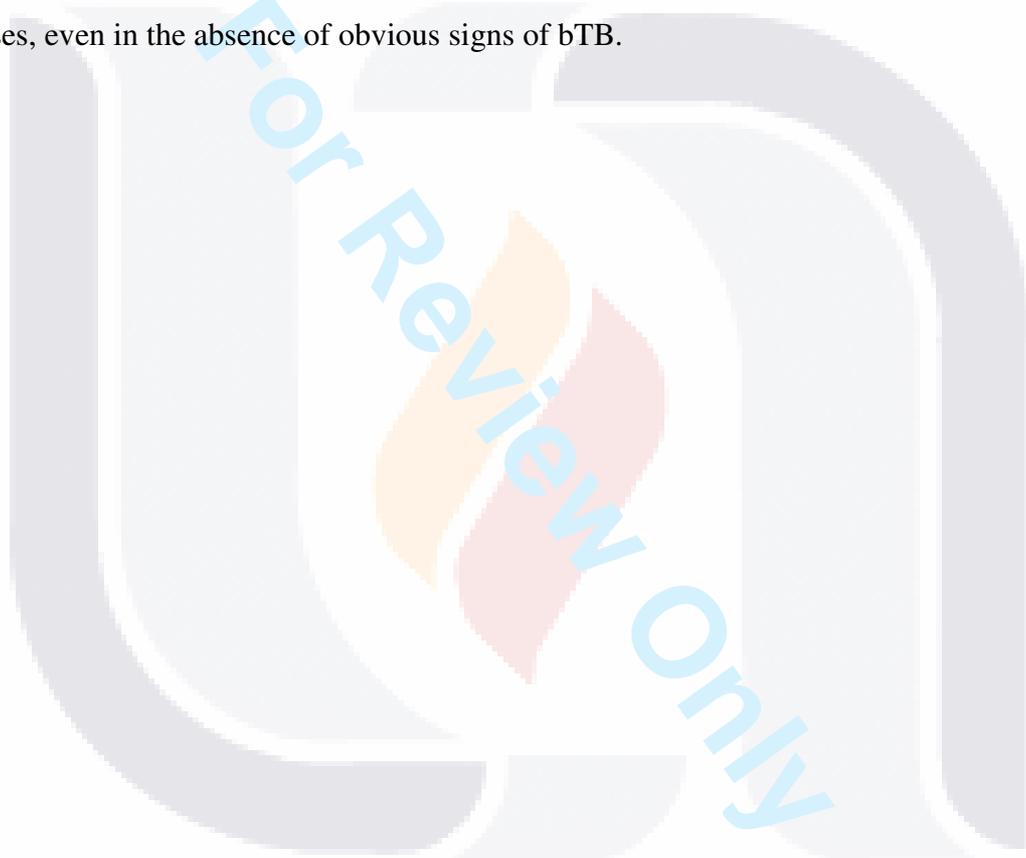
304 a conclusive proof, as it may have a value very close to zero, which could be increased in the  
305 future, suggesting the need to consolidate and expand strategies for diagnosis and prevention  
306 of bTB in wildlife.

307 It has been reported recently that feedstuff contaminated with *M. bovis* from infected deer  
308 could act as a source of indirect transmission between wild and domestic animals, due to the  
309 capability of this bacterium to survive in these materials.<sup>41-42</sup> Current efforts to ban or control  
310 supplemental deer feeding should have a positive effect on decreasing transmission of *M.*  
311 *bovis* among deer. In the study area, the incorporation of WR to the controlled hunting  
312 business has only been active for a decade; it is important to consider dietary supplementation  
313 and to be careful with the access of various species to common feeding sites.<sup>43-44</sup> Although  
314 bTB prevalence in domestic cattle in the study area is low (true prevalence = 0.50%), there is  
315 always a risk that local carnivores such as coyotes might access the remains of dead animals,  
316 therefore it is important to prevent contagion, in order to ensure the proper disposal of  
317 carcasses or discarded internal organs. Carnivores sometimes scavenge on WR and cattle  
318 carcasses providing a plausible mechanism for either cattle or deer-to-carnivore transmission,  
319 but still the frequency of such transmission type is unknown. In this case, the tradition in  
320 Mexico is to use internal organs to prepare a large number of recipes, which ensures that the  
321 infection is not propagated to other species.

322 The general response of landowners to the proposed field trial was positive; the majority who  
323 were contacted for permission to sample their hunting areas agreed to the request. This study  
324 demonstrated that it is entirely possible to carry out wildlife epidemiological surveillance in  
325 developing countries like Mexico, while performing passive surveillance activities in  
326 domestic livestock.

327 In summary, this study was conducted to prove the *Mycobacterium bovis* prevalence in a  
328 WLIA, but there was not any evidence that wild ruminants were bTB infected; although, the

329 original focus of bTB in cattle was eradicated. Since bTB is widespread among cattle in  
330 Mexico, bTB surveillance activities must be improved in farmed and free-ranging WR. In  
331 addition, government bTB programs must consider WR like a potential bTB reservoir, and  
332 improved measures should include the proper examination of WR carcasses after hunting or  
333 slaughter; as well as the proper disposal of the internal organs in order to prevent bTB  
334 infection in carnivore scavengers. The postmortem examination must be followed by the  
335 histological, bacteriological and molecular testing of an appropriate proportion of the WR  
336 carcasses, even in the absence of obvious signs of bTB.



337

---

- 338 a. Purified protein derivative, SAGARPA: B-0653-035, B-0653-034, México, D. F.
- 339 b. Integrated Technologies, Coralville, IA.
- 340 c. Statistical Analysis System software (SAS/STAT, 1996, Release 6.11). Institute Inc.,  
341 Cary, NC.
- 342 d. SAGARPA-SENASICA (Ministry of Agriculture, Livestock, Rural Development,  
343 Fishing and Food - National Service of Food and Agriculture, Health, Safety and  
344 Quality. Agricultural Health Inspection Office) website. Classification of states or  
345 regions by the United States Department of Agriculture.  
346 <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>. Accessed March 1, 2011.
- 

347

348 **References**

- 349 1. Taylor GM, Murphy E, Hopkings R., First report of *Mycobacterium bovis* DNA in human  
350 remains from the Iron Age. *Microbiology* 2007;153:1243-1249.
- 351 2. Cosivi OJ, Grange M, Daborn CJ, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*  
352 in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998;4:1-14.
- 353 3. Begins RG, Kock RA, and Fischer J. Infectious animal disease: the wildlife/livestock  
354 interface. *Rev Sci Tech* 2002;21:53-65
- 355 4. Lees VW. Learning from outbreaks of bovine tuberculosis near Riding Mountain National  
356 Park: Applications to a foreign disease outbreak. *Can Vet J* 2004;45:28–34.
- 357 5. Schmitt SM, Fitzgerald SD, Cooley TM, et al. Bovine tuberculosis in free-ranging white  
358 tailed deer from Michigan. *J Wildl Dis* 1997;33:749-758.
- 359 6. Clifton-Hadley RS, Sauter-Louis CM, Lugton IW, et al. Mycobacterial diseases. In: E.S.  
360 Williams and I.K. Baker, editors. Infectious diseases of wild animals. Iowa State University  
361 Press, Ames, USA. 2001;340-361
- 362 7. Palmer MV, Waters WR, and Whipple DL. Shared feed as a means of deer-to-deer  
363 transmissions of *Mycobacterium bovis*. *J Wildl Dis* 2004;40:87-91.
- 364 8. Morris RS and Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet*  
365 *Microbiol* 1994;40:153–177.
- 366 9. McIlroy SG, Neill SD. and McCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis*  
367 excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec* 1986;118:718-721.
- 368 10. Perez-Guerrero L, Millian-Suazo F, Arriaga-Diaz C, et al. *Salud Pública de Mexico*  
369 2008;50:286-291.
- 370 11. Gobierno del Estado de Aguascalientes. Decreto 88. Periódico Oficial: Órgano del  
371 Gobierno Constitucional del Estado de Aguascalientes. Enero 30 1994; Tomo LVII:1-4.

- 372 12. Villalobos SV. El Venado Cola Blanca en la sierra Fría Aguascalientes. In: Cuadernos de  
373 Trabajo Agricultura y Recursos Naturales. No. 89. Gobierno del Estado de Aguascalientes,  
374 Mexico, 1998;73.
- 375 13. NOM-031-ZOO-1995 (Norma Oficial Mexicana). Campaña Nacional contra la  
376 Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Diario Oficial de la Federación 27 de agosto de  
377 1998.
- 378 14. INEGI. Síntesis Geográfica del Estado de Aguascalientes, Instituto Nacional de  
379 Estadística Geografía e Informática. México (D. F.):1981. 78-94.
- 380 15. Norby B, Bartlett PC, Fitzgerald SD. The sensitivity of gross necropsy, caudal fold and  
381 comparative cervical tests for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Diagn Invest*  
382 2004;16:126-31.
- 383 16. Corner LA. Postmortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary*  
384 *Microbiology* 1994;40:53-63.
- 385 17. Payeur J, Jarganin J, Marquart J. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for  
386 the isolation and identification of mycobacteria. National Service Laboratories Iowa, USA:  
387 United States Department of Agriculture. 1993; 117.
- 388 18. Miller JM, Allen JL, Rhyon J, et al. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed,  
389 paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence  
390 specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J Vet Diagn Invest* 1997;9:244-  
391 249.
- 392 19. Gardner IA, and Greiner M. Application of diagnostic tests in veterinary epidemiologic  
393 studies. *Prev Vet Med* 2000;45:43-59.
- 394 20. Mackintosh CG. Deer health and disease. *Acta Vet Hung* 1998;46:381-394.
- 395 21. Griffin JF, and Mackintosh CG. Tuberculosis in deer: perceptions, problems, progress.  
396 *Vet J* 2000;160:202-219.

- 397 22. De Lisle GW, Mackintosh CG, and Bengis RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and  
398 captive wildlife, including farmed deer. *Revue Scientifique et Technique de l'Office*  
399 *International Des Epizooties*. 2001;20:86-111.
- 400 23. Zanella G, Durand B, Hars J, *Mycobacterium bovis* in wildlife in France. *J Wildl Dis*  
401 2008;44:98-108.
- 402 24. O'Reilly LM. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and  
403 humans: a review. *Tuber Lung Dis* 76 (supplement 1), 1995;1-46.
- 404 25. VerCauteren KC, Atwood TC, DeLiberto TJ, et al. Surveillance of coyotes to detect  
405 bovine tuberculosis, Michigan. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1862-1869.
- 406 26. Steffen DJ, Oates DW, Sterner MC, et al. Absence of tuberculosis in free-ranging deer in  
407 Nebraska. *J Wildl Dis* 1999;35:105-107.
- 408 27. Carranza J, Garcia-Muñoz AJ and Vargas JD. Experimental shifting from harem defence  
409 to territoriality in rutting red deer. *J Anim Behav* 1995;49:551-554.
- 410 28. O'Brien DJ, Fitzgerald SD, Lyon TJ, et al. Tuberculosis lesions in free-ranging white-  
411 tailed deer in Michigan. Short Communications. *J Wildl Dis* 2001;37:608-613.
- 412 29. Fitzgerald SD, Kaneene JB, Butler KL, et al. Comparison of postmortem techniques for  
413 the detection of *Mycobacterium bovis* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Vet*  
414 *Diagn Invest* 2000;12(4):322-7.
- 415 30. Clutton-Hadley TH, Coulson TN, Milner-Gulland EJ, et al. "Sex differences in emigration  
416 and mortality effect optimal management of deer populations. *Nature* 2002;415(6872):633-  
417 637.
- 418 31. Carranza J. Dominance relationships in female groups of red deer: seasonal changes. *Acta*  
419 *Theriol* 1988;33:335-342.
- 420 32. Thoen CO, and Steele JE. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. In:  
421 Ames Iowa State University Press, Iowa, 1995;355.

- 422 33. Cassidy JP, Bryson DG, Pollock JM, et al. Early lesion formation in cattle experimentally  
423 infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol* 1998;119:27-44.
- 424 34. Rhyan JC, Saari DA, Williams ES, et al. Gross an microscopic lesions of naturally  
425 occurring tuberculosis in a captive herd of wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*) in Colorado. *J Vet*  
426 *Diagn Invest* 1992;4:428-433.
- 427 35. Palmer MV, Whipple DL, Payeur JB, et al. Naturally occurring tuberculosis in white-  
428 tailed deer. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216:1921-1924.
- 429 36. Palmer MV, Butler KL, Fitzgerald SD, et al. Tonsillar lesions in white-tailed deer  
430 (*Odocoileus virginianus*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Rec*  
431 2002;151:149–151.
- 432 37. Martin-Hernando MP, Torres MJ, Aznar J, et al. Distribution of lesions in red and fallow  
433 deer naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol* 2010;142:43-50.
- 434 38. Weddle NE, and Livingstone PG. Bovine tuberculosis control and eradication programs  
435 in Australia and New Zealand. *Vet Microbiol* 1994;40:23-39.
- 436 39. Ritacco V, Lopez B., De Kantor IN, et al. Reciprocal cellular and humoral immune  
437 responses in bovine tuberculosis. *Res Vet Sci* 1991;50:365-367.
- 438 40. O'Brien DJ, Schmitt SM, Berry DE. Estimating the true prevalence of *mycobacterium*  
439 *bovis* in free-ranging elk in Michigan. *J Wildl Dis* 2008;44:802-810
- 440 41. Palmer MV and Waters WR. Survival of *Mycobacterium bovis* on feedstuffs commonly  
441 used as supplemental feed for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildl Dis*  
442 2006;42:853-858.
- 443 42. Palmer MV, Waters WR, Whipple DL. Investigation of the transmission of  
444 *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *Am J Vet Res*  
445 2004;65:1483-1489.

- 446 43. Miller MS, and Kaneene JB. Evaluation of historical factors influencing the occurrence  
447 and distribution of *Mycobacterium bovis* infection among wildlife in Michigan. *Am J Vet Res*  
448 2006;67:604-615.
- 449 44. Palmer MV, Whipple DL, Waters WR. Experimental deer-to-deer transmission of  
450 *Mycobacterium bovis*. *Am J Vet Res* 2001;62:692-696.



451 *Table 1. Bovine and wild ruminants evaluated for Mycobacterium bovis (heads) in a Mexican*  
 452 *wildlife-livestock interface area*

SPECIES	Wild ruminants		Bovine	
	(Year)		(Year)	
	2006	2007	2006	2007
Slaughter / hunting	75	67	8,060	9,291
Suggestive lesions	39	53	58	55
Negative TB histopathology	39	53	39	41
Granulomatous lesion	0	0	19	14
<i>Mycobacterium spp.</i> isolation	0	0	18	13

453 *Table 2. Field surveillance for Mycobacterium spp. in cattle herds (No.) located in a wildlife-*  
 454 *livestock interface area in central Mexico*

<i>Diagnostic actions</i>	<b>Year</b>	
	2006	2007
Herds	287	506
Caudal fold test (CFT)	9,200	15,200
Reactors to CFT	132	59
Comparative cervical test (CCT)	132	59
Positive to CCT	6	4

455

456 Table 3. Species, sex and age of cattle and wild ruminants diagnosed by histopathology in lymph  
 457 nodes (significant findings/total)

Species	Sex			Age (years)			
	Male	Female	P-value <sup>a</sup>	Young (≤ 3.0)	Middle (3.5-5.0)	Mature (> 5.0)	P-value <sup>a</sup>
Cattle	11/17	59/96	0.7993	10/13	19/51	41/49	0.0000
White-tailed deer	38/38	5/22	0.0000	5/5	15/20	23/35	0.2596
Red deer	12/12	1/8	0.0001	1/2	5/8	7/10	0.8480
Elk	9/9	1/3	0.0073	0/0	4/4	6/8	0.2733 <sup>b</sup>
Total wild ruminants	59/59	7/33	0.0000	6/7	24/32	36/53	0.5427

458 <sup>a</sup> *Uncorrected Pearson chi-square.*

459 <sup>b</sup> *One degree of freedom.*

Table 4. Histopathologic findings in cattle and wild ruminants diagnosed for tuberculosis in the wildlife-livestock interface area in central Mexico

Species	Samples	NSF <sup>a</sup>	MC	BP	CP	AN	LA	FLN	LD
Cattle	113	43	33	9	1	9	11	0	7
White-tailed deer	60	17	0	7	14	6	2	0	14
Red deer	20	7	0	0	0	0	5	1	7
Elk	12	2	0	3	1	1	3	0	2
Total	205	69	33	19	16	16	21	1	30

<sup>a</sup> NSF = No significant findings; MC = Mycobacteriosis compatible; BP = Bronchopneumonia; CP = Chronic pneumonia; AN = Abscessed node; LA = Lymph adenitis; FLN = Fibrotic lymph node; LD = Lymphoid depletion.

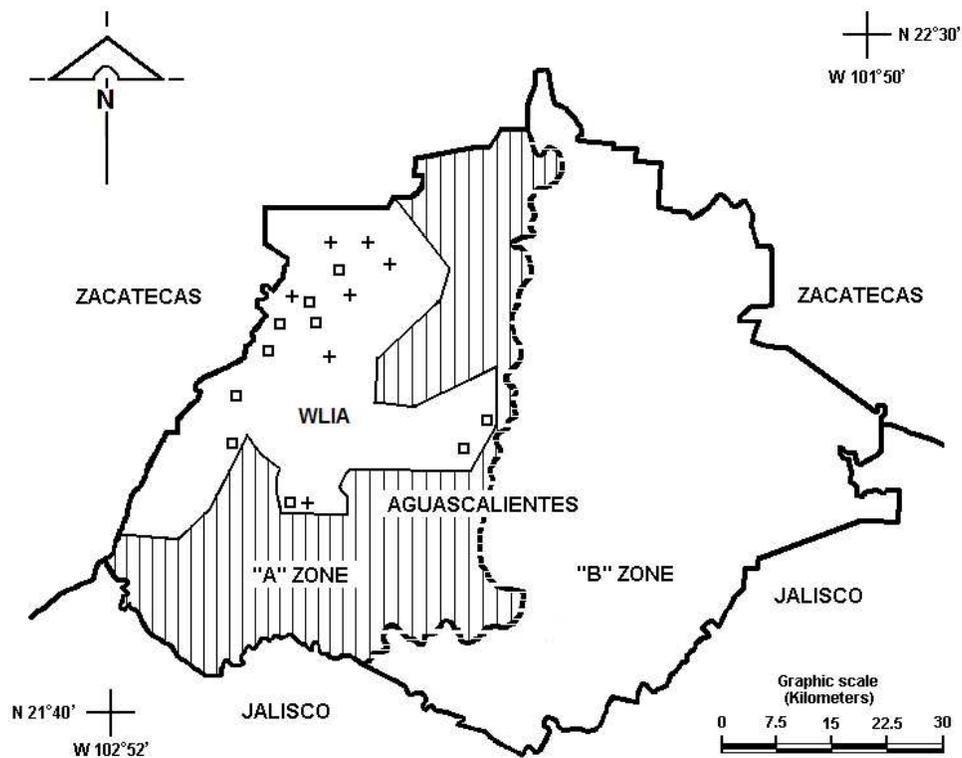


FIGURE 1. Map of Wildlife-Livestock Interface Area (WLIA) located in Sierra Fria Natural Protected Area in the State of Aguascalientes, Mexico. It shown "A" zone (low bTB prevalence), "B" Zone (high bTB prevalence), and sites of *Mycobacterium bovis* infected cattle (+) in 2006/2007; square shapes (□) represent the Wildlife Management Units with wild ruminants harvested in 2006/2007.