

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



GENOTIPIFICACIÓN DE *Mycobacterium bovis* EN AISLADOS
PROVENIENTES DE BOVINOS SACRIFICADOS EN DOS RASTROS T.I.F.
DE BAJA CALIFORNIA.

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA
M. V. Z. CARLOS ALBERTO MARTINEZ VIDAL

MEXICALI B. C., MÉXICO.

NOVIEMBRE DEL 2010.

Genotipificación de *Mycobacterium bovis* en Aislados Provenientes de Bovinos Sacrificados en dos Rastros T.I.F. de Baja California. Tesis presentada por Carlos Alberto Martínez Vidal como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el Comité Particular indicado:

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto.
Director Principal

Dr. Gilberto López Valencia.
Asesor

Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista.
Asesor

Dra. Sawako Hori Katsuragui.
Asesor

Lugar y Fecha.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias por el apoyo incondicional que me brindo durante todo este tiempo.

A conacyt por el apoyo en el financiamiento que me otorgo para lograr con éxito la culminación de mi proyecto de maestría.

Al Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto por su paciencia, y por el apoyo durante estos dos años. Siempre estaré agradecido por haberme impulsado a finalizar.

Al cuerpo académico de Salud Animal por haberme prestado sus instalaciones para llevar a cabo este proyecto.

A la UABC por hacerme parte de sus profesionistas, siempre estaré agradecido.

DEDICATORIAS

A mi madre Ma. Griselda por brindarme su apoyo y su amor, gracias por estar siempre conmigo.

A mi Padre Alfredo que a pesar de estar lejos siempre conté con sus consejos y sus buenos deseos en mi vida profesional.

A mis hermanos por ser parte importante en mi vida y por ser mi ejemplo a seguir en todos los aspectos.

A mi Mujer Cristina Volene que nunca dejo de creer en mí, gracias por estar siempre en las buenas y en las malas conmigo, espero siempre estar a tu lado, te amo.

A mi Hijo Emiliano por ser la luz y la fuerza que me impulso a concluir mis estudios de posgrado, quiero que sepas que te amo con toda la fuerza del mundo y que seguiré preparándome para brindarte siempre lo mejor, te amo.

A mis sobrinos Julián, Astrid y Luis Daniel, que a pesar de la distancia que nos separa, siempre pienso en ustedes y que sus buenos deseos siempre me han acompañado, espero verlos pronto para decirles lo mucho que los quiero.

A mis compañeros de posgrado les doy las gracias de por haber contado siempre con ustedes, espero seguir teniendo su amistad (Julieta, Iris, Emilio, Alejandro, Daniel y Abelardo).

A mi asesor Gerardo Medina por brindarme no nada su conocimiento si no también su amistad.

Genotipificación de *Mycobacterium bovis* en aislados provenientes de bovinos sacrificados en dos rastros T.I.F. de Baja California.

Resumen: La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, la cual genera grandes pérdidas económicas por reducción en la producción de leche y decomisos de la canal, además de ser una importante enfermedad zoonótica. En México, la TBB es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, teniendo pérdidas económicas directas e indirectas, con alta prevalencia en bovinos productores de leche. Actualmente se cuenta con métodos moleculares, para la detección y genotipificación de la TBB haciendo posible determinar las variables epidemiológicas como fuentes de infección, seguimiento de un brote, diferencias en patogenicidad, distribución de genotipos y la filogenia de las distintas cepas de TBB, lo cual ayudará para establecer la relación que existe entre las diferentes cepas presentes en la región y determinar algunos factores que incidan posteriormente en los programas de control y erradicación de la enfermedad en Baja California. En el presente trabajo se aplicó la técnica de VNTR a 11 aislados provenientes de ganado sacrificado en un rastro de Mexicali B.C. y a 10 aislados de ganado sacrificado en un rastro de Tijuana B.C., corroborándose que los animales provenieran de la misma región de sacrificio. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar los loci ETR-A, ETR-B, QUB11a, QUB11b, QUB1895, QUB26, QUB3232 y QUB3336, determinándose la variabilidad genética y el parentesco entre las cepas aisladas, así como el poder discriminatorio para cada locus en particular y para todos los loci en su conjunto. Se obtuvieron 14 perfiles alélicos al utilizar los 8

loci con un poder discriminatorio de 0.90 siendo el locus QUB 3336 el que mostró el mayor poder discriminatorio ($h=0.72$) en tanto el locus ETR-B mostró un nulo poder discriminatorio ($h=0.00$). En un dendrograma regional, se observaron 6 grupos genéticos, en los cuales se encuentran indistintamente, aislados de Tijuana y Mexicali Baja California, lo que pone de manifiesto que el movimiento de ganado y la compra venta en la región han provocado la dispersión de cepas que ahora son comunes en estas dos áreas. La técnica de VNTR con los loci utilizados en este estudio es adecuada para genotipificar aislados de *M. bovis* provenientes de la región y es comparable con estudios en otras regiones. Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo son la primera aproximación para conocer los genotipos de *M. bovis* presentes en la región aunque faltan estudios más amplios e interdisciplinarios para obtener los datos suficientes que puedan ayudar directamente al control y erradicación de la TBB.

Palabras claves: *Mycobacterium bovis*, VNTR, genotipificación.

Genotyping by VNTR of *Mycobacterium bovis* isolates of cattle sacrificed in slaughterhouses from Mexicali and Tijuana, Baja California, México.

Abstract: Bovine tuberculosis (TBB) is a contagious infectious disease caused by the bacterium *Mycobacterium bovis*, which generates large economic losses by reduced milk production and seizure of the canal. In Mexico, the TBB is one of the main problems facing the national livestock, taking direct and indirect economic losses, with high prevalence in dairy cattle. Currently there are molecular methods for the detection and genotyping of TBB making it possible to determine the epidemiological variables as sources of infection, outbreak monitoring, differences in pathogenicity, genotype distribution and phylogeny of different strains of TBB, which help to establish the relationship between the different strains present in the region and identify some factors influencing later in the control and eradication programs of the disease in Baja California. In this work the VNTR technique was applied to 11 isolates from cattle slaughtered in a slaughterhouse in Mexicali BC and 10 isolates from cattle slaughtered in a slaughterhouse in Tijuana BC. Specific primers were used to amplify loci ETR-A, ETR-B, QUB11a, QUB11b, QUB1895, QUB26, QUB3232 and QUB3336, determining the genetic variability and relationship among the isolates, and discriminatory power for each locus in particular and for all loci as a whole. Fourteen allelic profiles were obtained when using eight loci with a whole discriminatory power of 0.90. The locus QUB 3336 showed the highest discriminatory power ($h = 0.72$) and the ETR-B locus showed no discriminatory power ($h = 0.00$). In a regional dendrogram, there were six genetic groups in which are either isolated from Tijuana and Mexicali, Baja California, which

shows that the movement of livestock and purchase market in the region have led to the dispersal of strains that now common in these two areas. The VNTR technique with loci used in this study is suitable for genotyping isolates of *M. bovis* from the region and is comparable with studies in other regions. The results obtained in this work are the first attempt to know the genotypes of *M. bovis* in the region, but lacking broad and interdisciplinary studies to obtain sufficient data that can help directly to the control and eradication of TBB.

Keys words: *Mycobacterium bovis*, VNTR, Genotyping.

CONTENIDO

Lista de Figuras	i
Lista de cuadros.....	ii
Introducción	1
Revisión de Literatura	6
Diagnóstico	6
<i>Aislamiento</i>	7
<i>Prueba intradérmica</i>	7
<i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	9
Tipificación	11
Genotipificación	12
<i>Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción</i>	12
<i>Espoligotipificación</i>	14
<i>Número Variable de Secuencias en Repetición (VNTR)</i>	17
<i>Comparación de técnicas de genotipificación</i>	21
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivo	24
Materiales y métodos.....	25
<i>Origen de muestras</i>	25
<i>Toma de muestras</i>	25
<i>Histopatología</i>	26
<i>Cultivo y Aislamiento</i>	26
<i>Reacción en Cadena de Polimerasa</i>	27
<i>Número Variable de Secuencias en Repetición (VNTR)</i>	28
<i>Análisis de datos</i>	29
<i>Diversidad alélica</i>	29
Resultados	30
<i>Lesión macroscópica</i>	30
<i>Estudios histopatológicos</i>	30

<i>Aislamiento bacteriológico</i>	31
<i>Diferenciación de M. bovis y M. tuberculosis</i>	32
<i>Tipificación por VNTR de las cepas aisladas</i>	32
Discusión	38
Conclusiones	43
Literatura citada	44

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag.
1	Relación filogenética de las diferentes especies del género <i>Mycobacterium</i>	22
2	Corte histológico de un nódulo linfático teñido con Hematoxilina y Eosina observado a 400x de un típico centro necrótico en una lesión tuberculosa.....	30
3	Corte histológico de un nódulo linfático teñido con la técnica de Ziehl Neelsen observado a 1000x, donde se observan bacilos ácido alcohol resistentes.....	31
4	PCR de un fragmento del gen <i>hupB</i> para la identificación de <i>M. bovis</i> en los 11 aislados obtenidos del rastro de Mexicali B.C ..	32
5	VNTR utilizando el locus QUB 11b de 9 muestras obtenidas del rastro TIF de Tijuana B.C	33
6	VNTR utilizando el locus QUB 3336 de 10 muestras obtenidas del rastro TIF de Tijuana B.C.	33
7	Dendrograma de los 21 aislados de <i>Mycobacterium bovis</i> utilizando los loci ETR-A, QUB 11a, 11b, 1895, 3232, 3336.....	36
8	Dendrograma de los 21 aislados de <i>Mycobacterium bovis</i> y algunas cepas genotipificadas por Martínez et al., (2008), utilizando los loci ETR-A, QUB 11a, 11b, 3232, y 3336	37

LISTA DE CUADROS

Cuadros

1	Locus y oligonucleótidos utilizados para la genotipificación por VNTR	28
2	Comparación de resultados entre cultivo e histopatología del total de las muestras obtenidas del rastro TIF de Mexicali B.C.....	31
3	Número de copias por VNTR de todos los aislados de <i>Mycobacterium bovis</i> obtenidos para los 8 loci analizados	35
4	Diversidad alélica de cada locus amplificado en los 21 aislados de <i>M. bovis</i>	35

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, la cual genera grandes pérdidas por reducción en la producción de leche y decomisos de la canal (NOM-EM-017-ZOO-2005).

La TBB además de afectar al ganado en todo el mundo, es una enfermedad zoonótica, encontrándose en la lista de enfermedades con fuertes repercusiones socioeconómicas y de salud pública por la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA), antes organización internacional de epizootias. (OPS/OMS, 2000). La tuberculosis en humanos, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) es una enfermedad con una prevalencia alta en países en vías de desarrollo, detectándose anualmente cerca de 20 millones de casos en el mundo de los cuales aproximadamente el 7% es debido a *M. bovis*. De seguir con esta tendencia en los próximos años se podrían infectar de 50 a 100 millones de habitantes anualmente, principalmente en países subdesarrollados (Murray et al., 1990).

En los países industrializados se han llevado a cabo campañas para la erradicación de la TBB, las cuales han ayudando a reducir drásticamente la enfermedad causada por *M. bovis*. En Francia, en 1955, se detectó una prevalencia del 25%. En los años siguientes, se implementaron programas con

el fin de controlar la enfermedad, apoyándose en las campañas de tuberculinización y en los diagnósticos bacteriológico e histopatológico disminuyendo considerablemente (0.009%) en el año de 1998 (Haddad et al., 2001).

En México, la TBB es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, debido a la alta prevalencia en bovinos productores de leche (del 16% en general), provocando pérdidas económicas directas e indirectas (Milian et al. 2001).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 21 regiones de la Republica Mexicana de baja prevalencia de tuberculosis bovina, de las cuales 11 regiones pueden exportar con una sola prueba de tuberculina del hato, 9 regiones con prueba de hato y de lote y una región que no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos (SENASICA, 2009).

Antes de 1992, la prevalencia de Tuberculosis bovina era prácticamente desconocida en nuestro país, aunque se sospechaba que era alta en ciertas zonas lecheras, ya que era frecuente el hallazgo de lesiones generalizadas de Tuberculosis en vacas lecheras de desecho enviadas a rastro. Se asumía entonces que la prevalencia era baja o nula en la ganadería de carne. A partir del reconocimiento de regiones en Fase de Erradicación en 1994 por la

SAGARPA, se establecieron regiones o estados con una prevalencia menor al 2% (SENASICA, 2009).

Las exigencias cada día son más demandantes para la exportación de becerros, lo que ha motivado la creación de regiones de “Baja Prevalencia”, las cuales han ido paulatinamente disminuyendo su prevalencia desde 0.5 % hasta niveles de 0.01 %. Actualmente se encuentran en fase de Erradicación (prevalencia menor a 2 %) 10 estados y parte de 15 estados: Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán y parte de Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Durango, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Hidalgo y Zacatecas. En Control, prevalencia mayor al 2 % o desconocida pertenece el resto del país (SENASICA, 2009).

El Comité mixto, FAO/OMS de expertos en TBB, afirma que para lograr su control y erradicación en cualquier país, es necesario tener información local sobre su incidencia y distribución (OMS, 1986). La incidencia nos podrá dar una idea del número de casos nuevos que se están presentando en los animales y poder observar su distribución geográfica.

Con las técnicas moleculares se ha podido determinar la similitud que existe entre las diversas micobacterias causantes de la tuberculosis, la mayoría se ha agrupado en lo que conocemos como complejo *M. tuberculosis*, que incluye a: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caneti*, y *M. bovis*. *M.*

bovis posee un genoma de 4, 345,492 pb, con 4003 genes que codifican para 3952 proteínas y 50 RNAs estructurales, incluye un profago y 42 secuencias de inserción (IS). Estructuralmente *M. bovis* además, contiene aproximadamente 65% de G+C, lo que se refleja en el contenido de aminoácidos básicos de sus proteínas, en la mayoría enzimas necesarias para su pared celular. El genoma de *M. bovis* tiene más del 99.95% de identidad con *M. tuberculosis* (Garnier et al., 2003).

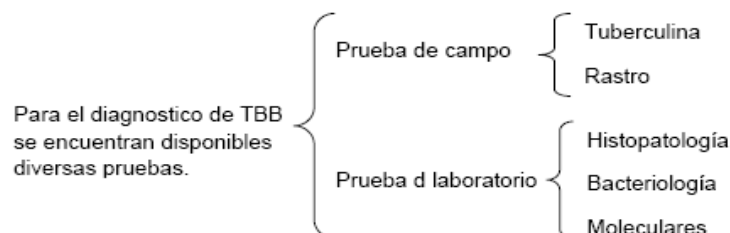
La mayoría de los cambios del genoma del complejo de *M. tuberculosis* se han asociado a elementos móviles como la IS, constituidas por fragmentos pequeños de DNA capaces de auto-insertarse dentro del genoma de la micobacteria y conferir polimorfismo entre las cepas (Garnier et al., 2003; Amadio et al., 2005). En los últimos años los laboratorios de diagnóstico han manejado la tipificación bioquímica de *M. bovis*, obteniendo resultados cualitativos para identificar las distintas cepas de esta micobacteria (Álvarez et al., 2006). La genotipificación de *M. bovis* tiene una gran importancia en todo el mundo, en especial cuando se tratan de determinar fuentes de infección y diseminación. De este modo, se puede deducir que cepas de *M. bovis* con idéntico genotipo tienen muy probablemente el mismo origen y que cepas con genotipo diferente provienen de diferentes lugares o fuentes de infección, esto nos permite por ejemplo, determinar si un animal recientemente introducido es causante de un brote de tuberculosis (Acosta et al., 2009).

Una de las técnicas actualmente utilizada para la genotipificación es VNTR, ya que con ella se han podido genotipificar diversos microorganismos entre ellos: *M. leprae*, *M. ulcerans*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus*. La rastreabilidad permite evaluar los riesgos derivados tanto por la movilización, como por el contacto con fauna silvestre, así como los presentes casos de tuberculosis en el ganado bovino (Sabat et al., 2003). Por lo anterior, en el presente trabajo se aplicó la técnica de VNTR a diferentes aislados de *M.bovis* provenientes de bovinos de la región, obteniendo datos de genotipificación, que al compararse entre sí y con aislados de otras regiones, aportaron información relevante en cuanto a las diferencias genéticas de los aislados, su relación y su distribución.

REVISIÓN DE LITERATURA

En la actualidad la importancia de la tuberculosis bovina (TBB) en México radica en que representa un riesgo para la salud pública y un grave problema para el comercio internacional. La estrategia para el control de la tuberculosis en el humano es la vacunación con la cepa BCG de *M. bovis*, sin embargo, esta estrategia no está disponible en el ganado. La vacunación con BCG no se utiliza comercialmente por que la respuesta inmune interfiere con las pruebas de detección en campo y los tratamientos antimicrobianos resultarían extremadamente costosos e incrementarían el riesgo de desarrollar cepas resistentes (Scorpio et al., 1997). Hoy en día se requiere de estudios epidemiológicos más precisos que permitan definir el origen de la infección, identificar las cepas de mayor prevalencia por región geográfica, medir el riesgo de la movilización de animales y su efecto en la distribución de la enfermedad (De Kantor et al., 2006).

Diagnostico: hoy en día para el diagnostico de la TBB se encuentran a la mano diversas pruebas tales como las de campo donde se puede llevar a cabo el control mediante la tuberculina o en el rastro. En el caso de pruebas de laboratorio podemos llevar un diagnostico mas preciso de la enfermedad, tal es caso de la prueba de histopatología, bacteriología y las actualmente las pruebas moleculares.



Aislamiento: La prueba considerada como de oro para el diagnóstico de TBB es el cultivo de la micobacteria, aunque ésta requiere alrededor de 6 a 8 semanas para el crecimiento. Los medios más utilizados para el crecimiento de este tipo de micobacterias son Stonebrink, Lowenstein-Jensen y Middlebrook, siendo el más recomendado para obtener un crecimiento de *M. bovis* el medio Stonebrink, ya que es un medio que no requiere glicerol y esta micobacteria no crece en glicerol (Bauer *et. al.*, 1997; Kell y Young, 2000). Una de las limitantes que aqueja el aislamiento es el peligro para técnicos, el tiempo de crecimiento y la utilización de campanas especiales como las de tipo III.

Prueba intradérmica: El complejo *M. tuberculosis*, incluye: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti* y *M. microti*. La TBB se ha controlado en muchos países mediante la identificación y sacrificio de los animales reactivos a la prueba de tuberculina (Neill *et. al.*, 1988), sin embargo en zonas de alta prevalencia es difícil aplicar esta estrategia ya que lleva a la descapitalización. La tuberculina es una de las pruebas inmunológicas más antiguas y en la actualidad es la prueba estándar internacional para el diagnóstico antemortem de la TBB. Está basada en una respuesta de hipersensibilidad tardía de tipo IV, se realiza mediante la aplicación de un concentrado de proteínas estéril, obtenido de un filtrado del cultivo del bacilo tuberculoso en medio de crecimiento, que es conocido como Derivado Proteínico Purificado (PPD) el cual es utilizado como antígeno, para diagnosticar la infección (Tizard, 2004).

En la prueba caudal simple se aplica intradermicamente 0.1 ml de PPD de *M. bovis* cepa AN5 en el pliegue caudal del animal y la lectura se hace a las 72 +/- 6 horas. La prueba se considera positiva cuando se ve o se toca cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis. Un animal que resulta positivo a la prueba de la tuberculina se conoce como reactor (NOM-031-ZOO-1995).

La prueba cervical simple se utiliza para corroborar la existencia de *M. bovis* en hatos donde no se conoce su existencia o para probar la existencia de la infección en animales que estuvieron en contacto directo o indirecto con el bacilo. En ésta se aplica 0.1 ml de PPD de *M. bovis* en la región media cervical, 10 cm debajo de la cresta, y la lectura se hace a las 72 +/- 6 horas (NOM-031-ZOO-1995).

En la doble comparativa, antes de aplicar la tuberculina, se rasura el área donde se inoculó (tercio medio superior del cuello). El sitio de aplicación superior es cerca de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior es aproximadamente de 13 cm debajo de la anterior. Previo a la inoculación, se levanta el pliegue de piel en el centro de las áreas rasuradas y se procede a medir y registrar el grosor de éstos, utilizando un cutímetro. Posteriormente, se inocula a nivel intradérmico 0.1 ml de PPD aviar y 0.1 ml de PPD bovino. El PPD aviar se inocula intradérmicamente en el área rasurada superior y el PPD bovino en la inferior. La lectura de esta prueba se realiza 72 h $\pm$ 6 h) después de la aplicación, midiendo con el cutímetro el grosor de las reacciones (NOM-

EM-017-ZOO-2005). Cualquier animal que presenta una reacción con una diferencia ≥ 4 mm entre la lectura inicial y final es considerado como positivo a la prueba de tuberculina (Buddle, *et al.*, 2003).

Liebana *et al.*, (1995), menciona que la prueba de tuberculina en trabajos recientes ha mostrado un 65.6% de sensibilidad y 98.8% de especificidad, en el caso de esta prueba se ha demostrado una sensibilidad de 90.7% y una especificidad de 100% según Ameni *et al.*, (2000).

El diagnóstico de la TBB obtenido por la prueba intradérmica y el aislamiento bacteriológico no es suficiente para el control y erradicación de esta enfermedad. En el caso de la tuberculina los resultados pueden generar la detección de falsos positivos con altos costos económicos para los propietarios de los animales; ya que, conforme a la NOM-031-ZOO-1995 todos los animales reactivos deberán ser eliminados (Costello *et al.*, 1997). En el aislamiento bacteriológico un resultado tarda alrededor de 4 a 8 semanas provocando que en ese tiempo de obtención del resultado, se disemine más el bacilo por los ranchos circunvecinos. (Kell D. y Young M., 2000).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Se basa en amplificar un segmento de ADN de la micobacteria. La identificación de la especie es un requisito previo para la posterior tipificación. La técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR) representa una herramienta importante para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Estudios recientes han demostrado que PCR es

mucho más rápida que el cultivo (2 días para PCR contra 6 a 8 semanas) reduciendo el tiempo de diagnóstico, teniendo la habilidad de detectar la presencia de *M. bovis*. (Liebana et al., 1995).

Uno de los métodos utilizados para la diferenciación de cepas de campo y vacunales es la técnica de PCR-múltiplex la cual fue desarrollada por Talbot (1997), llamada así porque pueden amplificar varias regiones génicas en una sola reacción, y esta se basa en identificar diferencias genéticas que se observan en un segmento de ADN de 9.5 Kilodaltones, denominado RD1. Utilizando los oligonucleótidos específicos denominados ET1, ET2 y ET3, se observó que las secuencias ET1 y ET3 son complementarias y se encuentran flanqueando a la secuencia RD1. Cuando estos iniciadores se unen con el ADN de la cepa *M. bovis* BCG que no tiene esta región, se amplifica un producto de 200 pb. La secuencia ET2 forma parte del extremo 3' de la secuencia RD1 y al unirse los iniciadores ET2 y ET3 con el ADN de las cepas virulentas que si presentan la región RD1 se obtiene un producto de amplificación de 150 pb, el cual está ausente en las cepas de *M. bovis* BCG pero se encuentra conservado en las cepas patógenas (Ramírez et al., 2004).

Ramírez et al. (2004), mencionan en su trabajo que la técnica de PCR-M tiene un buen porcentaje (sensibilidad 71%) para la identificación de *M. bovis* en secreción nasal pudiendo también identificar los animales que fueron vacunados con BCG.

También Prabhakar et al., (2004), utilizaron un PCR para diferenciar *M. bovis* y *M. tuberculosis* amplificando un fragmento flanqueando el gen *hupB*, el cual codifica para una histona del complejo *M. tuberculosis*. Esta prueba permite distinguir entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* del complejo *M. tuberculosis* por el tamaño de los fragmentos amplificados. Los oligonucleótidos N y S generan productos con los que se puede distinguir entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, siendo los fragmentos de 645 y 618pb, respectivamente, en tanto al utilizar los oligonucleótidos M y S se obtienen productos de 318 y 291pb respectivamente.

Tipificación: Para la caracterización de cepas, durante mucho tiempo se han utilizado marcadores que se basan en las características expresadas por los microorganismos como fagotipos (diferencia en la susceptibilidad de infección de la bacteria por bacteriófagos), resistotipos (diferencias de las cepas en cuanto a la resistencia a fármacos), serotipos (diferencia en la aglutinación por diferentes sueros) y análisis de plásmidos, las cuales, se están sustituyendo por técnicas moleculares que analizan directamente la variabilidad genética. Actualmente se han desarrollado diversos métodos de genotipificación que se basan en el análisis del grado de similitud entre los aislamientos de *M. bovis*, estudiándose la presencia, ausencia o variación en tamaño de determinados fragmentos de ADN y comparando el genoma completo del microorganismo (García y Rodríguez, 2005).

Genotipificación: Las Técnicas de genotipificación están basadas en la variación genética, utilizándose con éxito para caracterizar las poblaciones de bacterias (Gibson *et al.*, 2005). Las principales técnicas para genotipificación son: Spoligotyping, polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), secuencia polimorfa rica en guanina y citosina (PGRS) y número variable de secuencias en repetición (VNTR) (Frothingham y Meeker, 1998). Las técnicas más empleadas son spoligotyping y recientemente el VNTR, el cual ha demostrado ser de gran utilidad (Kamerbeek *et al.*, 1997; Mazans *et al.*, 2001).

Varios grupos de pequeñas repeticiones en tándem (RT) tales como repeticiones exactas en tándem (ETR), las Unidades Repetitivas Intertacaladas de Micobacterias (MIRU) y locus de Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR), han sido recientemente descritas como herramientas efectivas en la tipificación de cepas de aislados del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Frothingham y Meeker, 1998; Supply *et al.*, 2006).

Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP): Se basa en la variabilidad del número de copias y ubicación de la secuencia de inserción IS6110 en el genoma micobacteriano. Esta variabilidad permite diferenciar o establecer un patrón de similitud entre diferentes cepas (Thoen *et al.*, 2006).

La secuencia de inserción IS6110 es un elemento móvil perteneciente a la familia IS3 de elementos de inserción, la cual se encuentra sólo en los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Sin embargo, el número total de copias IS6110 encontrado en el genoma difiere ampliamente entre las distintas especies del complejo *M. tuberculosis*. Por ejemplo, el genoma de *M. tuberculosis* contiene hasta 19 copias de IS6110, mientras que *M. bovis* sólo contienen entre una a cinco copias. La técnica de RFLP se basa en la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción, su separación por electroforesis e hibridación de los fragmentos obtenidos con una sonda de ADN del fragmento de inserción, lo que permite observar polimorfismos en el ADN genómico (Thoen et al., 2006).

Bauer et al. (1997) mencionaron que las cepas deben ser diferenciadas por el método de RFLP ya que con esta técnica disminuyen diferencias en los resultados entre diferentes laboratorios. La utilización del fragmento IS6110 para la genotipificación de micobacterias ha mostrado ser muy útil para *M. tuberculosis* pero no tanto para *M. bovis*, debido al bajo número de copias que presenta ésta última, además de la necesidad de contar con una gran cantidad de DNA para realizar esta técnica. Montoro et al. (1998) comentan que la técnica de RFLP requiere de material muy caro para los laboratorios de diagnóstico, además, requiere más tiempo que otras técnicas. Hilty et al. (2005) mencionan que para esta técnica se requieren extensiones previas y cultivo de cepas y que los resultados son difíciles de comparar entre los laboratorios de diagnóstico. García y Rodríguez, (2005) recomiendan que esta técnica presenta

algunas limitaciones, ya que no puede utilizarse si la micobacteria tiene menos de 6 copias de este fragmento en su cromosoma, como es el caso de *M. bovis*, en cuyo caso es preciso la utilización de otras técnicas.

Cousins et al. (1998) Manejaron 273 aislados de *M. bovis* de Australia, Canada, Republica de Irlanda e Irán, utilizando la técnica de RFLP y Spoligotyping. Se encontrando 23 genotipos diferentes utilizando la RFLP con la sonda IS6110 y 35 genotipos para Spoligotyping. Los agrupamientos encontrados mostraron asociación con los establos de procedencia o entre establos con evidencia epidemiológica de movimiento de animales entre ellos.

Harris et al. (2007) en su trabajo sobre la identificación de *M. bovis* en queso fresco evaluaron un total de 203 muestras de queso originarias de México y aislaron *M. bovis* de una de las muestras. Utilizaron las técnicas de RFLP y Spoligotyping obteniendo como resultado que cepas aisladas de ganado en México fueron muy similares a la encontrada en queso proveniente del mismo país encontrando cierta correlación de la fuente de contagio aunque el estudio no fue concluyente.

Espoligotipificación: Se basa en la amplificación por PCR de la región de Repetición Directa (DR), un locus único y altamente polimórfico presente en el cromosoma de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Esta región tiene múltiples secuencias repetidas de 36 pares de bases (pb) separados por espacios intersecuenciales de una longitud de 35 a 41 pb. Al producto de PCR

de cada aislado individual se le permite hibridarse a 37 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* H37Rv y seis secuencias espaciadoras de *M. bovis* BCG Después de la hibridación y la detección pueden identificarse las secuencias espaciadoras presentes en el aislado (Kemerbeek et al., 1997). Por lo tanto, la técnica establece el diagnóstico de la presencia del agente etiológico y también determina la diferenciación de la especie y la diferenciación de cepas (Pérez et al., 2007).

Zumárraga et al. (1998) Tipificaron mediante la técnica de espoligotipos 211 cepas de *M. bovis* provenientes de diferentes provincias de Argentina. 20 diferentes espoligotipos fueron identificados con significancia epidemiológica ya que ocurrió correlación entre los espoligotipos y la región de origen. Mencionan que la técnica de espoligotipos es conveniente para discriminar inicialmente porque es bastante sencillo de realizar e interpretar y lleva a una rápida detección y tipificación directa de cepas de *M. bovis*, siendo parte fundamental en programas de control y erradicación.

Haddad et al. (2001) genotipificaron 1349 aislados de *M. bovis* provenientes de Francia y países cercanos, encontrando 161 espoligotipos muy relacionados entre ellos y mencionan la necesidad de una base de datos internacional para determinar la dispersión de las cepas de *M. bovis* entre diferentes países.

Gibson et al. (2004) demostraron que la combinación de Spoligotyping y VNTR es una herramienta eficiente para discriminar entre aislados de *M. bovis*. El combinado de VNTR Spoligotyping tiene la capacidad de diferenciar cepas del complejo *M. tuberculosis*. Nuevas mejorías en estas técnicas podrían producir un sistema combinado de alta capacidad de discriminación también para todos los aislados de micobacterias en los seres humanos y otros mamíferos.

Marin et al. (2005) mencionan que la tipificación de *M. bovis* llevada a cabo por Spoligotyping para análisis epidemiológicos es rápida, simple y reproducible. En este estudio analizaron los espoligotipos de 58 aislados de *M. bovis* del norte de México, los cuales fueron analizados por la técnica de Spoligotyping. 9 patrones fueron observados en total. Dos fueron predominantes (SB0121 y SB0140) representando el 50% y 14% de los aislados, respectivamente. Seis patrones de los encontrados, ya habían sido escritos en la base de datos de espigotipos para *M. bovis*, mientras otros tres (SB0985, SB0986 y SB0987), fueron nuevos. Nueve de los 58 aislados no correspondían a ningún otro patrón mexicano previamente reportado. Este es el primer análisis de espigotipos entre México y Estados Unidos de cepas de *M. bovis*, donde los autores mencionan que es necesario encontrar estudios que sirvan para formular una mejor identificación de cepas de *M. bovis* y saber más sobre la diseminación entre estos dos países.

Muller et al. (2008) muestrearon 3330 animales en la región de Mali, África. De estas muestras, pudieron obtener 60 con lesión aparente, lograron 20 aislados los cuales fueron corroborados por la técnica de espoligotipos, teniendo características comunes con los aislados de *M. bovis* encontrados en Chad, Camerún y Nigeria.

Número Variable de Secuencias en repetición (VNTR): Los VNTR son secuencias repetidas secuencialmente, de número variable y dispersas en el genoma cuyo polimorfismo se origina por adición o delección de las secuencias (Supply et al., 2006).

Este método se basa en la medición, después de correr por electroforesis y detectar el fragmento amplificado, del número variable de repeticiones en tándem ó Unidades Repetidas Intercaladas de Micobacterias (MIRU). En aislados de micobacterias, se determina el número de unidades con secuencia específica que se repiten en varios loci dispersos por todo el genoma y compuestas de 52-77 nucleótidos de longitud. (Frothingham y Meeker, 1998).

Los primeros loci VNTR fueron publicados por Frothingham y Meeker (1998), quienes los localizaron en las secuencias de cósmidos replicables en *M. tuberculosis* H37Rv antes de la publicación del genoma. Analizaron 11 loci de repeticiones en tándem (RT) en el genoma de *M. tuberculosis*, de los cuales 5 fueron repeticiones principales polimórficas en tándem (MPTR) que contienen entre 15 y 17 copias de una secuencia de 15pb y 6 loci de Secuencias Exactas

Repetitivas en Tándem (ETR) específicas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que contienen entre 1 y 7 copias de secuencias entre 53 y 79pb. Frothingham y Meeker también determinaron la variabilidad de dichos loci amplificando el ADN de 48 cepas de diferentes partes del mundo. Las muestras analizadas incluyeron 25 cepas de campo de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti* y 23 cepas de *M. bovis* BCG vacunal. Una de las 5 MPTR y los 6 loci de ETR tuvieron polimorfismos, correspondiendo a la inserción o delección de repeticiones en tándem. Finalmente Identificaron 22 distintos perfiles alélicos en las 25 cepas de campo analizadas del complejo tuberculosis y 5 perfiles alélicos distintos en *M. bovis* BCG.

Skuce et al., 2002, describieron la identificación de 7 loci VNTR en la cepa H37RV de *M. tuberculosis* y observaron que el número de copias varía entre distintas cepas del complejo *M. tuberculosis*. Seis de estos loci fueron aplicados en un panel de 100 aislados de *M. bovis* y se evaluó la discriminación y correlación con Spoligotyping y un conjunto de ETR'S. El número de perfiles alélicos varió de 3 a 7 según el locus utilizado, difiriendo notablemente su poder discriminatorio. Además se encontró una correlación positiva con Spoligotyping y ETR. Pudieron identificar 33 perfiles alélicos diferentes con los VNTR's, 22 para ETR'S y 29 para Spoligotyping. Cuando combinaron los resultados obtenidos por VNTR's y ETR'S, encontraron 51 perfiles diferentes aumentando notablemente el poder discriminatorio. Finalmente concluyen que el VNTR es una herramienta valiosa para la caracterización de cepas y para el estudio global de la epidemiología molecular del complejo *M. tuberculosis*.

Roring *et al.*, (2004), evaluaron 17 nuevos marcadores de VNTR-MIRU individualmente y los compararon con un grupo de VNTR's publicados anteriormente, usando una tabla de 47 aislados de *M. bovis* y 9 cepas de referencia del complejo *M. tuberculosis*. Los loci individuales difirieron ampliamente en su poder de discriminación. De los 47 aislados de *M. bovis*, 17 perfiles alélicos fueron resueltos usando el grupo de VNTR, mientras los MIRU's y ETR diferenciaron 11 y 6 perfiles respetivamente. Una combinación de 10 VNTR's (VNTR 11a, 11b, 26, 1895, 3232, 3336, ETR-A, ETR-B, MIRU's 24 y 26) fueron altamente discriminatorios ($h=0.96$) ya que diferenciaron 30 perfiles únicos del total de 47 aislados de *M. bovis*. Lo anterior pone de manifiesto que la técnica es adaptable para diferentes tipos de estudio, así, si las muestras son numerosas y globales se pueden utilizar oligonucleótidos poco discriminatorios, en tanto si las muestras provienen de una sola región se pueden utilizar oligonucleótidos altamente discriminatorios, haciendo posible obtener datos sobre la prevalencia de cepas específicas, trazar el origen y distribución de un brote, seguimiento de un brote o para establecer relaciones entre las diferencias genotípicas y características fenotípicas como resistencia a fármacos, patogenicidad, serotipos y otros.

Bo-young jeon *et al.*, (2008) tomaron 59 muestras de 20 granjas de la región de Korea con lesiones sugestivas. Estas fueron aisladas de ganado lechero. 24 MIRU's-VNTR fueron aplicados a los aislados de *M. bovis* de los cuales 10 demostraron diversidad alélica. El mayor locus discriminatorio fue el

QUB 3336 ($h=0.64$), en tanto los locus QUB 26 y MIRU 31 demostraron ser medianamente discriminatorios ($h=0.35$).

Hilty *et al.*, (2005) evaluaron 16 loci (12 MIRU's, 3 ETRs y un VNTR) en cepas de *M. bovis*. Las muestras fueron tomadas en Chad. De 67 cepas de *M. bovis* analizadas 67% formaron grupos. Definieron cinco loci, ETR- A, B, C y MIRU 26, y 27 como altamente discriminativos. Dos locus, MIRU 4, y VNTR 3232 resultaron con moderado poder discriminatorio y tres locus, MIRU 16, 20, 31 como poco discriminatorios. Los loci restantes no mostraron polimorfismo en absoluto. El VNTR que se realizo para los locus ETR- A, B, C y MIRU 26 y 27 se observó que fue altamente discriminatorio ($h= 0.917$) por lo que proponen este grupo de loci como el más apropiado para genotipificar las cepas de *M. bovis* de la región de estudio, aunque mencionan que puede variar el poder discriminatorio de este grupo en otras regiones del mundo.

Allix *et al.*, (2006) utilizaron 127 aislados de *M. bovis* de ganado bovino de 77 explotaciones diferentes de Bélgica, tomadas entre 1995 y 2003. La estabilidad de la técnica MIRU-VNTR fue demostrada mediante el análisis de una serie de 74 cepas del total, obtenidas de diferentes animales de una misma granja o de diferente. La genotipificación y la diversidad alélica fue comparada con spoligotyping y RFLP resultando que 68 cepas sin relación epidemiológica evidente fueron mejor diferenciadas por VNTR que por RFLP o spoligotyping, ya sea individualmente (32 contra 16 y 17 genotipos; $h= 0.91$ contra 0.73 y 0.85,

respectivamente). Estos resultados aseguran que los marcadores de VNTR-MIRU son convenientes para la genotipificación de *M. bovis*.

Sahraoui *et al.*, (2009) tomaron 7250 muestras de animales sacrificados de agosto a noviembre del 2007, de los cuales únicamente 260 animales presentaron lesiones granulomatosas y de estos, solo en 88 se aisló *M. bovis*. Se llevó a cabo la genotipificación de los aislados por spoligotyping y VNTR, encontrando 22 patrones concordantes utilizando ambas técnicas, observando además similitud entre cepas aisladas de Argelia y Francia. Además mencionan que los espoligotipos y la base de datos de los VNTR acompañados de los protocolos, ayudarán a la investigación epidemiológica mundial para entender la infección por *M. bovis*.

Comparación de técnicas de genotipificación: Aunque el RFLP y el Spoligotyping, son excelentes técnicas para genotipificar, desafortunadamente tienen sus limitaciones. Así, el RFLP requiere de grandes cantidades de ADN de calidad y pureza excelente, además de una excesiva laboriosidad del procedimiento. El Spoligotyping tiene la desventaja de que a mayor estabilidad menor el polimorfismo de un marcador, así como su poder discriminatorio entre cepas no relacionadas, por lo cual es una desventaja para estudios epidemiológicos (Solvig *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2009). Hoy en día se han generado técnicas más adecuadas para la tipificación de *M. bovis*. La técnica VNTR recientemente desarrollada, se basa en una amplificación de secuencias variables por PCR, por lo que no necesita de grandes cantidades de ADN

además que las secuencias amplificadas son muy estables y los resultados son fácilmente comparables entre laboratorios (Hilty et al., 2005).

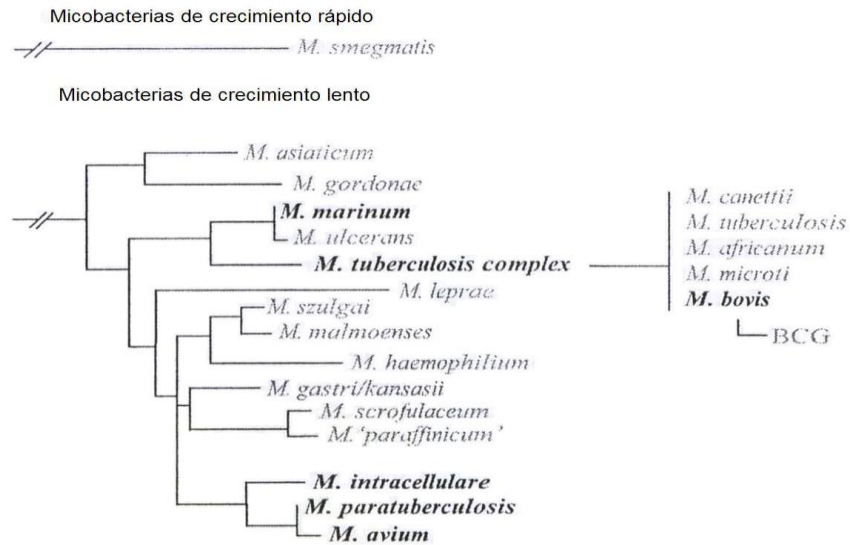


Figura.1. Relación filogenética de las diferentes especies del género *Mycobacterium* (Biet et al., 2005).

JUSTIFICACION

La Tuberculosis bovina (TBB) genera pérdidas económicas en la ganadería debido a decomisos de canales o partes de las mismas y a la presencia de lesiones por la TBB, además es una importante zoonosis. En México se han estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales tan solo por el desecho de ganado enfermo (INIFAP, 2004), por esta razón se ha intensificado los esfuerzos por controlar la TBB. Actualmente se cuenta con métodos moleculares como VNTR, para la detección y genotipificación de la TBB haciendo posible determinar algunas variables epidemiológicas como fuentes de infección, seguimiento de un brote, diferencias en patogenicidad, distribución de genotipos y la filogenia de las distintas cepas de TBB, lo cual ayudará para establecer la relación que existe entre las diferentes cepas presentes en la región y determinar algunos factores que incidan posteriormente en los programas de control y erradicación de la enfermedad en Baja California.

HIPOTESIS

Las cepas de *M. bovis* aisladas en Baja California presentan diferencias genéticas entre ellas, lo que se debe a diferencias en el área geográfica de procedencia de los animales infectados.

OBJETIVO

Genotipificar distintos aislados de muestras de ganado sacrificado en rastros de Mexicali y Tijuana mediante la técnica de VNTR.

Objetivos específicos

- Aislamiento e identificación de cepas obtenidas a partir de muestras obtenidas de dos rastros de Baja California.
- Genotipificación por VNTR de los aislados de *M. bovis* obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Origen de las muestras: Las muestras en Mexicali fueron obtenidas en el rastro T.I.F. No. 54 durante el periodo Junio 2009 - Enero 2010, mientras que las cepas del rastro 301 de Tijuana B.C. fueron obtenidas en el año 2008 y mantenidas en el Cepario del IICV.

Toma de muestras: La obtención de las muestras sugestivas a TBB se llevó a cabo en conjunto, y bajo la supervisión de inspectores sanitarios adscrito a las instalaciones de los rastros en mención. Se tomaron muestras de nódulos linfáticos de pulmones y cabeza.

Las muestras con lesiones sugestivas de tuberculosis detectadas durante la inspección postmortem en el rastro, fueron tomadas y colocadas una parte como tejido fresco para el cultivo bacteriológico y otra en formol al 10% para el estudio histopatológico. Cada muestra fue acompañada de su número en rastro, origen, nombre del propietario, raza, sexo y tipo de tejido

Histopatología: Todas las muestras, se procesaron y cortaron con la técnica de inclusión y corte en parafina. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina como tinción de rutina y se observaron en microscopio de luz, utilizando los objetivos de 10x, 40x y 100x. Si el tejido observado presentaba lesiones sugestivas a tuberculosis, se procedió a realizar nuevos cortes, los cuales se tiñeron con la tinción especial de Ziehl Neelsen para demostrar la presencia del bacilo, mismo que se caracteriza por ser alcohol-acido-resistente (Lee, 1968). Los tejidos que presentaron lesiones típicas de tuberculosis y que a la tinción especial no se les encontró bacilos, se consideraron como micobacteriosis sugestiva, mientras que en aquellas en las cuales se demostró la presencia de bacilos alcohol-acido-resistentes, se reportaron como micobacteriosis compatible, ya que esta técnica permite detectar directamente los bacilos acido-alcohol resistentes (Lee, 1968).

Cultivo y aislamiento: La bacteriología se realizó en una campana de seguridad clase III siguiendo el protocolo descrito por Payeur et al., 1993. Para evitar contaminación por agentes externos, las muestras se dejaron por 30 minutos en 250 mL con agua destilada (95%) y cloro al 5%. Se agregó una porción de 50 gr. de nódulos linfáticos (NL) con lesiones visibles sugestivas a tuberculosis. Se colocaron en un recipiente y se adicionaron 50ml de caldo rojo fenol, la mezcla se maceró por 2 minutos con ayuda de una licuadora. 7ml del material macerado se colocó en un tubo de polipropileno de 50ml, se adicionaron 5ml de NaOH al 0.5 N durante 5 minutos y posteriormente HCl al 6.0 N hasta que la mezcla se tornó amarilla. Subsecuentemente la mezcla se

neutralizó agregando NaOH al 1.0 N. El material se sometió a centrifugación durante 20 minutos a 1650 RFC. Posteriormente se removió la pastilla y se decantó el sobrenadante. Dos inclinados del medio Stonebrink se inocularon con el sedimento utilizando aplicadores de algodón estériles y se incubó a 37°C. Los medios inoculados se observaron periódicamente para la detección de presencia de colonias (Payeur *et al.*, 1993). Las colonias se sometieron a identificación de microorganismos del complejo tuberculoso por vía molecular (Liebana *et al.*, 1995).

Reacción en Cadena de Polimerasa: Para la identificación de colonias por PCR, se llevó a cabo un tratamiento a 95°C por 10 minutos para inactivación de las micobacterias y se utilizó el sobrenadante. Este PCR se hizo con la finalidad de corroborar si los aislados pertenecían al complejo *M. tuberculosis* mediante la identificación del fragmento de inserción IS6110. La amplificación del ADN se realizó conforme a la técnica descrita por Liébana *et al.*, (1995), en un termociclador marca BIO-RAD modelo i cicler. Los fragmentos amplificados junto con el marcador de peso y la muestra control se corrieron en gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X a 100V en una cámara de electroforesis BIO-RAD, modelo Sub-cell GT basic y se observaron en luz UV. Se utilizaron las cepas H37RV, AN5 y BCG Tokio como controles, las cuales se encuentran en el Cepario del laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis del IICV. Posteriormente se les realizó un PCR para amplificar el gen que codifica una histona (*hupB*) para la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Prabhakar *et al.*, 2004).

Número Variable de secuencias en repetición (VNTR): Todas las muestras positivas a aislamiento y PCR, declaradas como *Mycobacterium bovis*, se analizaron mediante la técnica de Número Variable de secuencias en repetición, para determinar la variabilidad genética y parentesco utilizando los loci anteriormente mencionados por Roring *et al* (2002), Frothingham y Meeker (1998), y Skuce *et al* (2002), referidos en la Cuadro 1. La detección de los fragmentos obtenidos para cada aislado se realizó también conforme a la técnica descrita por los autores ya mencionados.

Cuadro 1. Locus y oligonucleótidos utilizados para la genotipificación por VNTR.

Nombre de locus	Secuencia de oligonucleótidos (primer's)	Referencia
ETR-A	AATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	Frothingham y Meeker, 1998.
ETR-B	GCGAACACCAGGACAGCATCATG GGCATGCCGGTGATCGAGTGG	Frothingham y Meeker, 1998.
QUB 3232	CAGACCCGGCGTCATCAAC CCAAGGGCGGCATTGTGTT	Roring <i>et al.</i> , 2004.
QUB 1895	GGTGACGGCCTCGGCTCC AAGCCCCGCCGCAATCAA	Roring <i>et al.</i> , 2004.
QUB 3336	ATCCCCGCGGTATCCATC GCCAGCGGTGTCGACTATCC	Roring <i>et al.</i> , 2004.
QUB 11a	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA TTCAGGGGGGATCCGGGA	Skuce <i>et al.</i> , 2002.
QUB 11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT	Skuce <i>et al.</i> , 2002.
QUB 26	AACGCTCAGCTGTTCGGAT GGCCAGGTCCTTCCCGAT	Skuce <i>et al.</i> , 2002.

Análisis de datos: Los resultados obtenidos por VNTR de los aislados, se analizaron por medio de programas mencionados posteriormente, especializados con el fin de determinar la variabilidad genética y parentesco de las cepas aisladas. Los datos se capturaron en una matriz de EXCEL y se utilizó el paquete PHYLIP (con programas de Fitch.excel y Drawtree.excel) y el programa TreeView para editar el diseño de dendrogramas.

Diversidad alélica: La diversidad alélica (h) de VNTR's individualmente y en combinación, fue calculada usando la siguiente ecuación: $h = 1 - \sum x_i^2 [n/(n-1)]$, donde n es el número de aislados y x_i es la frecuencia del alelo i de un locus (Hunter R.P and Gaston M.A. 1988).

RESULTADOS

Lesión macroscópica: Se obtuvieron 37 muestras con lesiones macroscópicas sugestivas de TB del rastro de Mexicali B.C. y fueron seleccionadas 10 cepas del rastro de Tijuana B.C.

Estudios histopatológicos: De las 37 muestras procesadas 14 (37.84%) fueron declaradas como Mycobacteriosis sugestivas (H&E) el resto de las muestras fueron negativas. De estas solo 4 (10.81%) fueron declaradas como *M. bovis* compatible (Zielh-Neelsen).

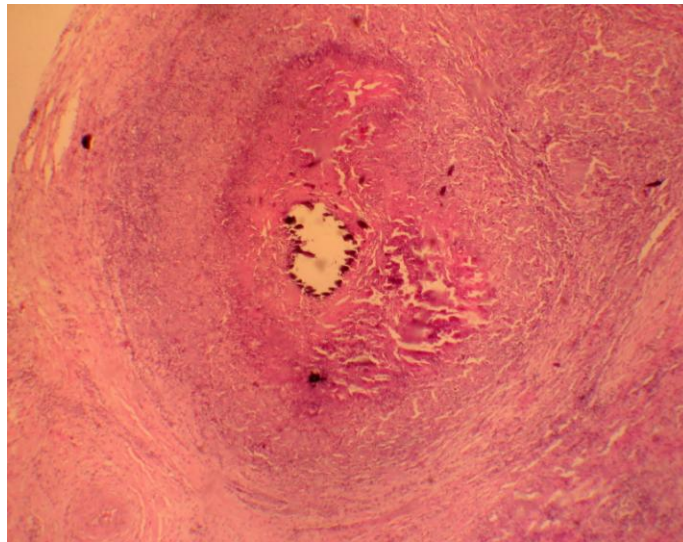


Figura 2. Corte histológico de un nódulo linfático teñido con Hematoxilina y Eosina observado a 400x de un típico centro necrótico en una lesión tuberculosa.

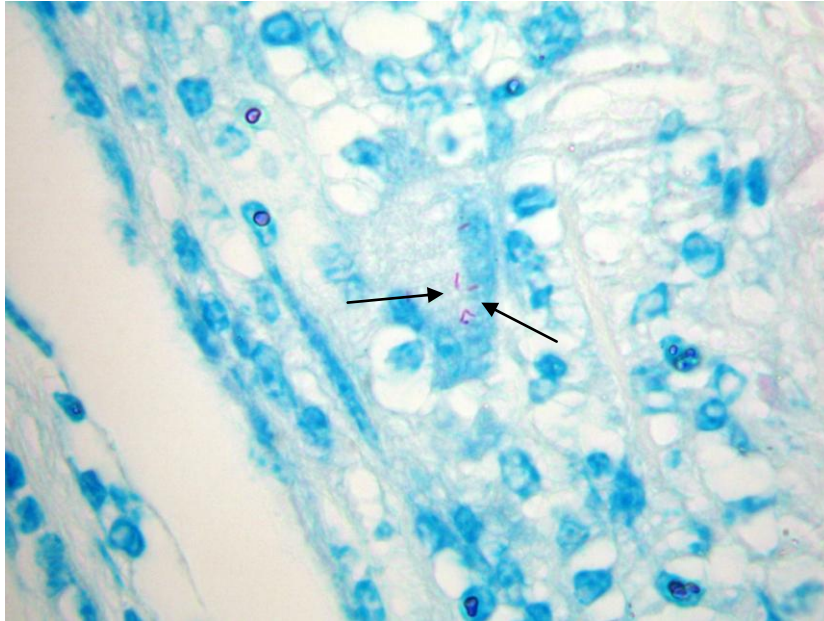


Figura 3. Corte histológico de un nódulo linfático teñido con la técnica de Ziehl Neelsen observado a 1000x, donde se observan bacilos ácido alcohol resistentes.

Aislamiento bacteriológico: Se procesaron por medio de cultivo, aislamiento y cultivo bacteriológico 37 nódulos de animales presentaron lesiones macroscópicas sugestivas de TB al sacrificio. Un total de 11 (29.73%) mostraron crecimiento (Cuadro 2). Además se utilizaron 10 aislados identificados anteriormente con el mismo procedimiento, provenientes del rastro 301 de Tijuana Baja California.

Cuadro 2.- Comparación de resultados entre cultivo e histopatología del total de las muestras obtenidas del rastro TIF de Mexicali B.C.

	CULTIVO	HISTOPATOLOGIA
+	11	14
-	26	23
TOTAL	37	37

Diferenciación de *M. bovis* y *M. tuberculosis*: A las 21 muestras positivas a *M. bovis* (11 de Mexicali y 10 de Tijuana), se les realizó PCR (Prabhakar et al., 2004), para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, obteniendo como resultado que todas pertenecían a *M. bovis* presentado un fragmento de 291pb. (Figura 4).

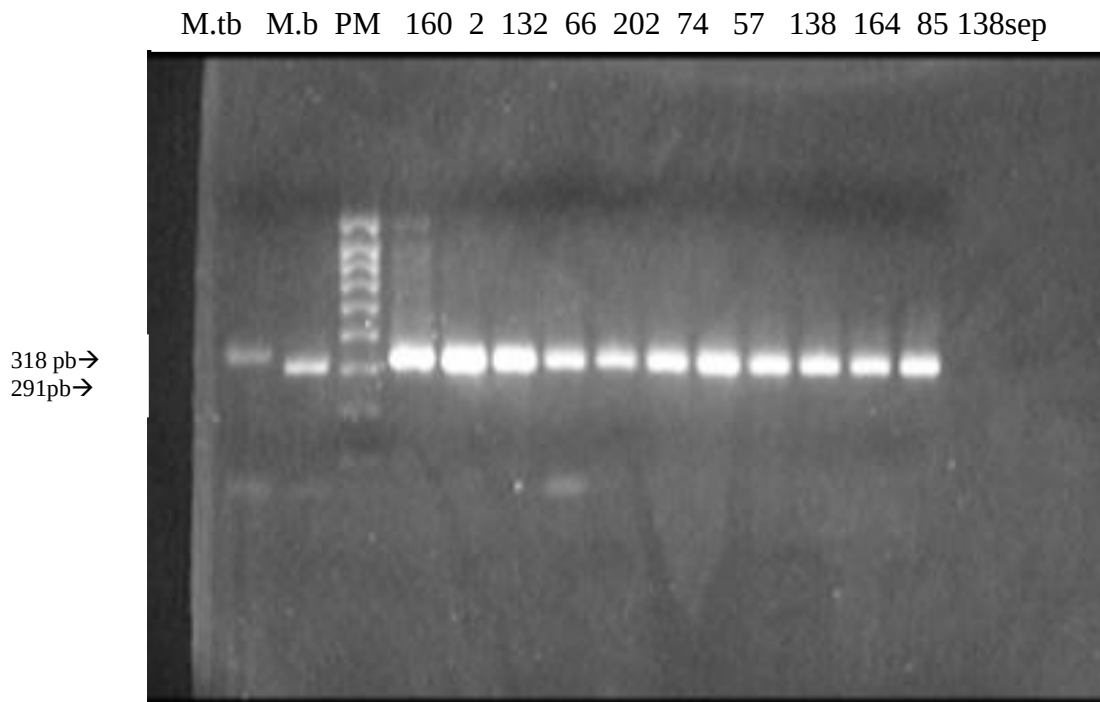


FIGURA 4. PCR de un fragmento del gen *hupB* para la identificación de *M. bovis* en los 11 aislados obtenidos del rastro de Mexicali B.C. Los oligonucleótidos utilizados fueron M y S que flanquean la región del gen *hupB* diferenciando *M. tuberculosis* con 318 pb y *M. bovis* con 291 pb. Carril 1) Control positivo *M. tuberculosis* H37RV, Carril 2) *M. bovis* BCG, Carril 3) Peso Molecular, Carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 aislados obtenidos de Mexicali, los cuales correspondieron a *M. bovis*.

Tipificación por VNTR de las cepas aisladas: Para el análisis de VNTR de los 21 aislados de *M. bovis*, se utilizaron 8 marcadores ya publicados (Cuadro 1). Los cuales incluyeron los loci ETR-A, ETR-B, QUB 11a, QUB11b, QUB1895, QUB26, QUB3232 y QUB3336 (Cuadro 1).

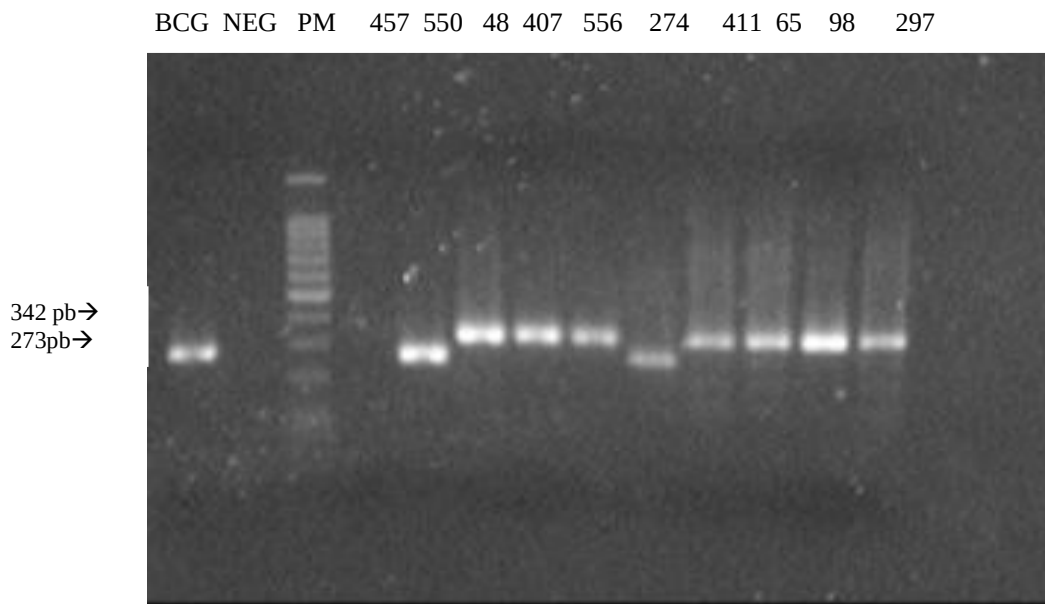


FIGURA 5. VNTR utilizando el locus QUB 11b de 9 muestras obtenidas del rastro TIF de Tijuana B.C. Se obtuvo alrededor de 342 pb para la cepa de referencia AN5 con 4 copias y, 273pb correspondiendo a 3 copias para BCG. Carril 1) BCG, carril 2) control negativo, Carril 3) peso molecular, Carril 5) 3 copias, Carril 6, 7, 8) 4 copias, Carril 9) 3 copias, Carril 10, 11, 12, 13) 4 copias.

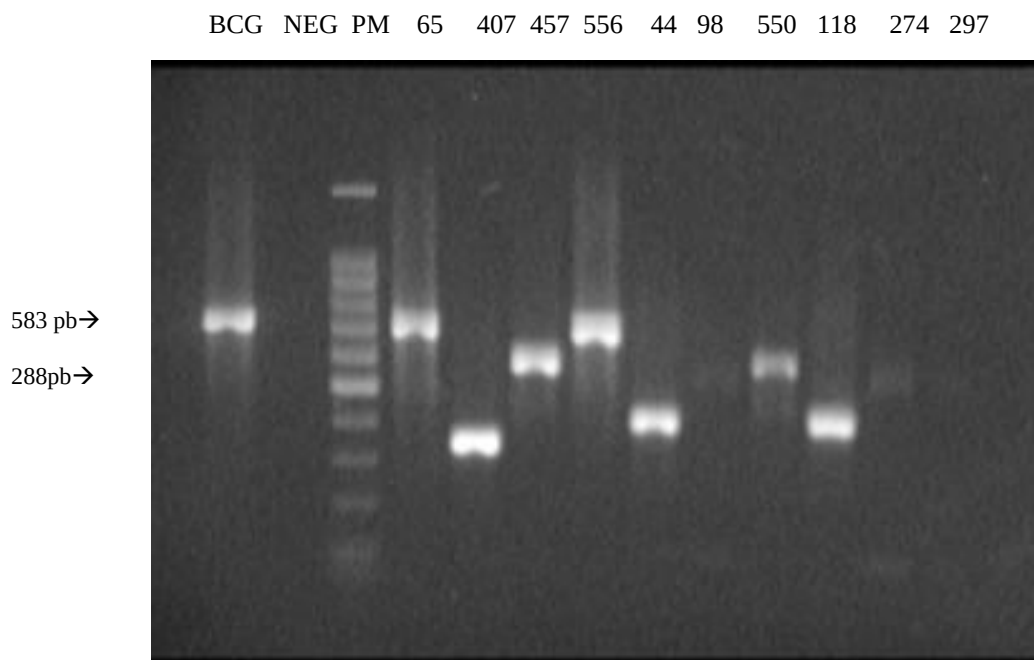


FIGURA 6. VNTR utilizando el locus QUB 3336 de 10 muestras obtenidas del rastro TIF de Tijuana B.C. Este locus fue el que presentó mayor diversidad alélica. Carril 1) BCG, Carril 2) negativo, Carril 3) peso molecular 100pb, Carril 4) 10 copias, Carril 5) 4 copias, Carril 6) 8 copias, Carril 7) 10 copias, Carril 8) 5 copias, carril 9) 8 copias, carril 10) 8 copias, Carril 11) 5 copias, Carril 12) 9 copias.

En el Cuadro 3 se pueden observar los diferentes números de copias obtenidas al analizar las bandas correspondientes de cada locus, corroborando las repeticiones con la pagina NCBI en el programa BLAST para BCG y H37RV. Los loci que mostraron mayor polimorfismo fueron QUB 3336 y QUB 3232. Se obtuvieron 14 perfiles alélicos (muestras con diferente número de copias en al menos un locus de los analizados) al utilizar los 8 loci y una diversidad alélica (poder discriminatorio) de 0.90 y de 0.89 al utilizar solo los loci ETR-A, QUB11a, QUB11b, QUB3232 y QUB3336. Veintitrés diferentes numeros de copias fueron obtenidos por estos 8 loci para los 21 aislados. La diversidad alelica (h) obtenida para cada uno de los loci, fué de 0.00 hasta 0.72 (cuadro 3). El locus QUB 3336 mostró el mayor poder discriminatorio ($h=0.72$, Fig. 4), en tanto el QUB 3232 mostró un poder discriminatorio moderado ($h=0.37$) al igual ETR-A ($h=0.22$) y QUB11b ($h=0.21$). Los loci QUB 11a ($h=0.14$), QUB26 y QUB 1895 ($h=0.05$) mostraron un bajo poder discriminatorio, en tanto el locus ETR-B mostró un nulo poder discriminatorio ($h=0.00$).

Cuadro 3. Número de copias por VNTR de todos los aislados de *Mycobacterium bovis* obtenidos para los 8 loci analizados.

Muestras	ETR-B	ETR-A	QUB11a	QUB-1895	QUB11b	QUB-26	QUB-3232	QUB-3336
TIJ98	5	6	10	4	4	3	9	8
TIJ457, MXL138 y MXL66	5	7	10	4	4	3	9	8
TIJ550 y MXL132	5	7	10	4	3	3	9	8
TIJ407	5	7	30	4	4	4	9	4
TIJ297	5	7	10	4	4	3	9	7
TIJ118, TIJ411 y MXL160	5	7	10	4	4	3	9	5
TIJ556	5	8	10	4	4	3	8	10
TIJ65	5	8	10	4	4	3	9	10
TIJ274	5	7	10	4	3	3	8	9
MXL202	5	7	10	3	4	3	9	10
MXL2, MXL85 y MXL57	5	7	10	4	4	3	9	10
MXL164	5	7	10	4	4	3	4	5
MXL138-1	5	7	7	4	4	3	4	8
MXL74	5	7	10	4	4	3	3	10

Cuadro 4. Diversidad alélica de cada locus amplificado en los 21 aislados de *M. bovis*.

Locus	Número de aislados para cada perfil alélico por locus.						Diversidad alélica (h)
	1	2	3	4	5	6	
ETR-B	21						0
ETR-A	1	18	2				0.22
QUB11a	1	19	1				0.14
QUB-1895	1	20					0.05
QUB11b	3	18					0.21
QUB26	1	20					0.05
QUB-3232	1	2	2	16			0.37
QUB-3336	1	4	1	7	1	7	0.72

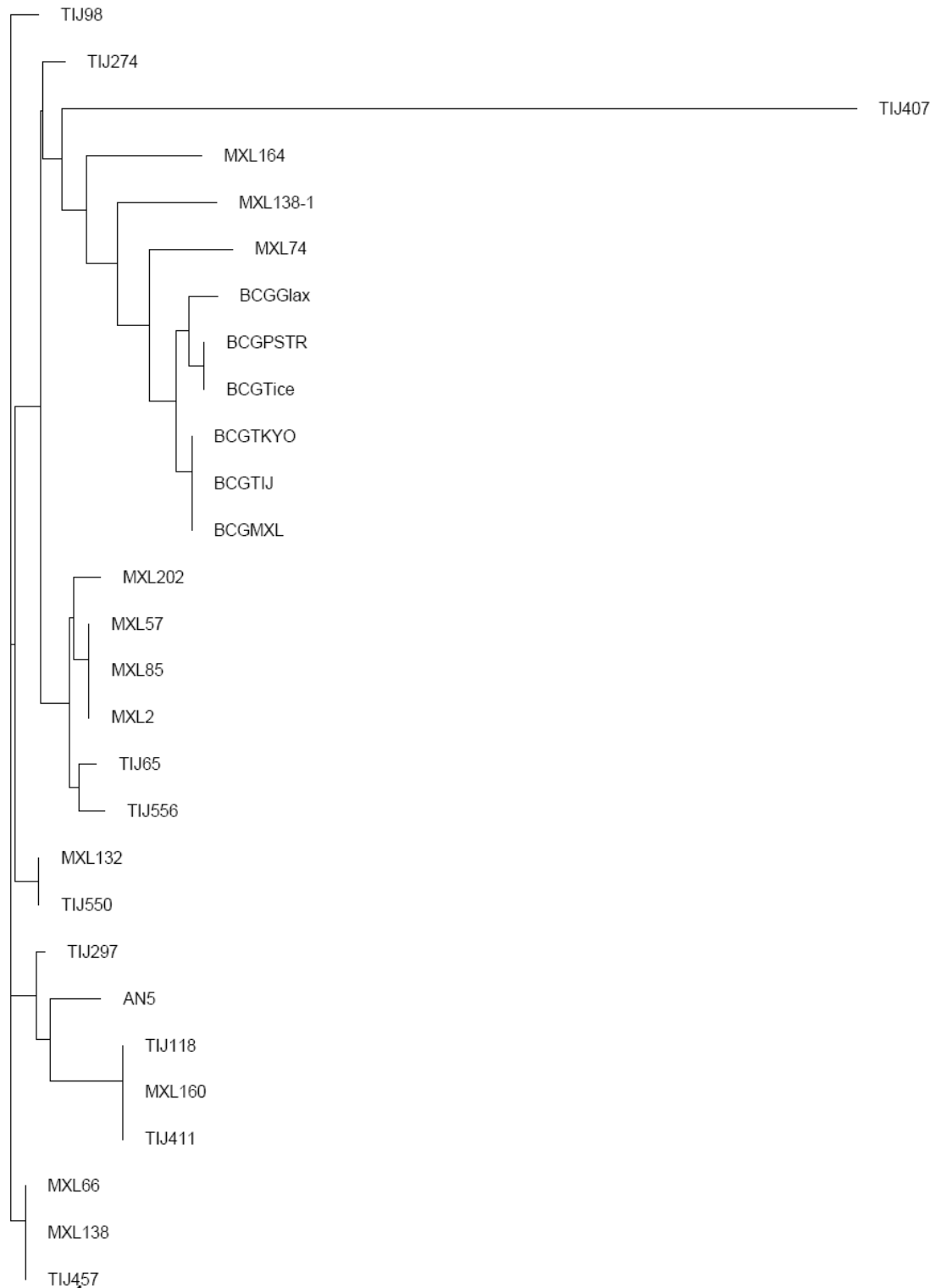


Figura 7. Dendrograma de los 21 aislados de *Mycobacterium bovis* utilizando 6 loci ETR-A, QUB 11a, 11b, 1895, 3232 y 3336. Las cepas tipo BCG fueron incluidas como referencia. Se lograron observar agrupamientos, encontrando como resultado que tanto las cepas obtenidas de Tijuana como de Mexicali están agrupadas indistintamente, excepto una (Tij98).

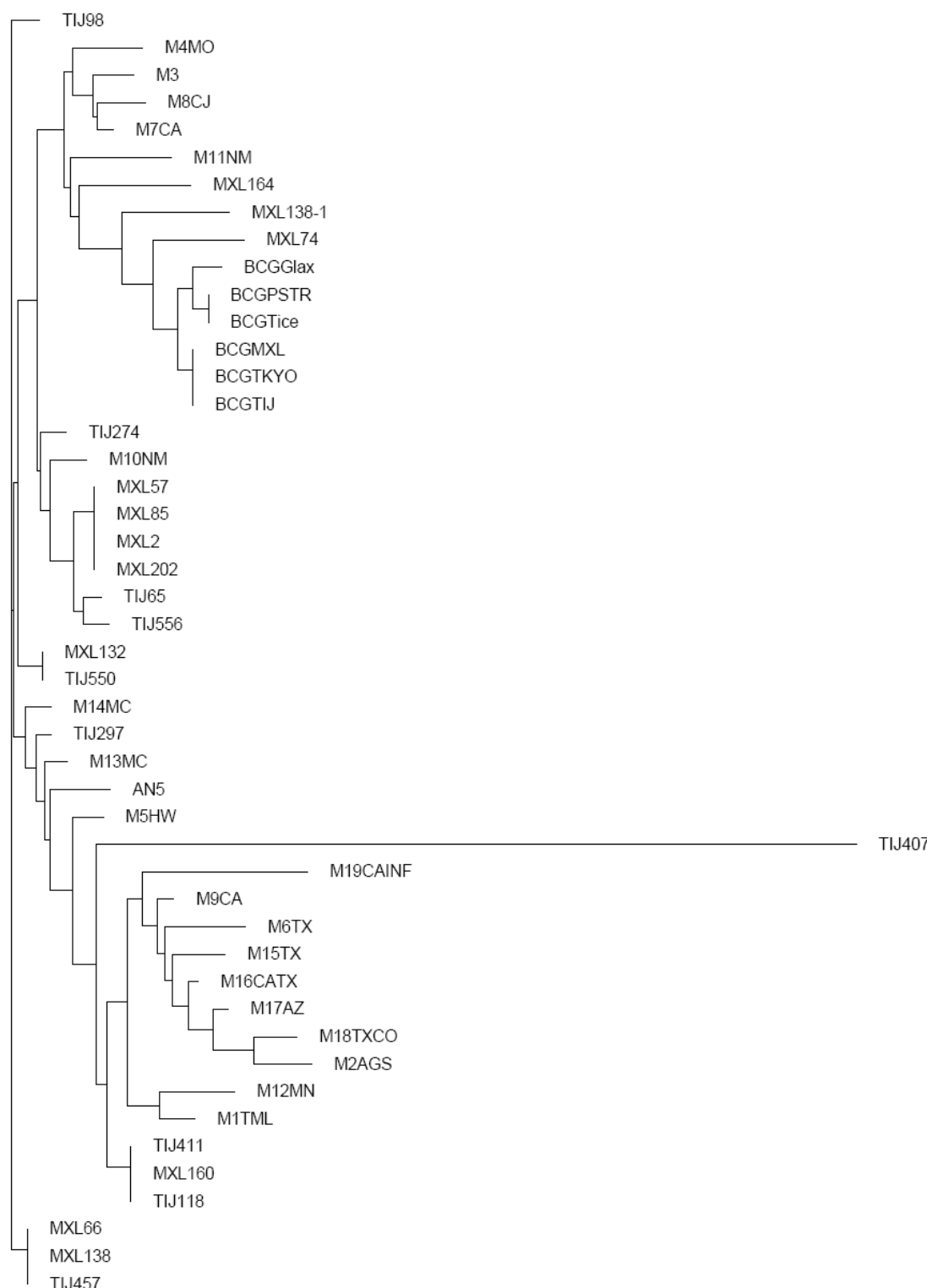


Figura 8. Dendrograma de los 21 aislados de *Mycobacterium bovis* y algunas cepas genotipificadas por Martínez et al., (2008), utilizando los loci ETR-A, QUB 11a, 11b, 3232, y 3336. Las cepas tipo BCG fueron incluidas como referencia. Como en la figura anterior, seis agrupamientos se lograron observar encontrando como resultado que una cepa procedente de Tijuana es diferente de todas las demás. Tres cepas procedentes de Mexicali pertenecen a un grupo que contiene cepas de Estados Unidos y las distintas cepas BCG.

DISCUSION

Se procesaron 37 nódulos mediastínicos y retrofaríngeos de animales sacrificados en el rastro T.I.F ubicado en Mexicali. Estas muestras presentaron lesiones sugestivas de TBB al sacrificio y se analizaron con histopatología, obteniendo un total de 14 positivas. De las 37 siembras realizadas en medio de cultivo Stonebrink, únicamente se obtuvieron 11 (29.73%) aislamientos bacteriológicos y 14 positivos a histopatología, de los cuales únicamente 6 fueron positivas a ambas pruebas. En el caso de Martínez et. al., (2008), comentan que en el aislamiento bacteriológico en medio de cultivo Lowenstein-Jensen únicamente pudo lograr el crecimiento del 16% de las 114 muestras de *M. bovis* muestreadas. Una posible explicación a esta tasa de recuperación tan baja pudo deberse a la presencia de pocos bacilos viables para el aislamiento en las muestras o debido a la contaminación de los medios (Portilla 2007; Estrada et. al., 2004).

Bermudez et al (2010), mencionan que el cultivo es la prueba de oro, sin embargo, esta consume demasiado tiempo, requiere de equipo especial y de personal calificado, además de que la sensibilidad es baja, lo que concuerda con el presente estudio.

Al analizar las cepas por VNTR con los 8 loci utilizados, se pudo comprobar que el QUB 3336 y QUB 3232 presentaron un alto poder discriminatorio (0.72 y 0.37). Este resultado es comparado con estudios demostrados por Bo-Young et al., (2008), donde obtuvieron 59 muestras de 20 granjas, aplicando 24 marcadores de VNTR, obteniendo un poder discriminatorio de 0.64 al utilizar el marcador QUB 3336. En el estudio realizado por Roring et al., 2004, utilizaron el marcador QUB 3336 para 47 cepas de *M. bovis*, obteniendo un moderado poder discriminatorio de 0.41. En el trabajo realizado por Allix et al., 2006 utilizando el QUB 3232, obtuvieron un alto poder discriminatorio ($h=0.74$) al diferenciar 68 cepas Belgas. En el caso de Hilty et al., 2005, reportaron un menor poder discriminatorio al analizar cepas de *M. bovis* y utilizando el marcador QUB 3232, con el cual obtuvieron un poder discriminatorio de $h \leq 0.25$. Esto se pudo comparar también con los resultados obtenidos por Roring et al., 2004, donde utilizó este mismo marcador para 47 cepas de *M. bovis*, donde se pudo obtener un alto poder discriminatorio ($h=0.60$). Tal es el caso de Allix et al., (2006) donde utilizando el marcador QUB 3232 pudo obtener un alto poder discriminatorio ($h=0.76$). En el presente estudio se observó un bajo poder discriminatorio al utilizar los marcadores ETR-A y ETR-B ($h=0.22$ y 0.00 respectivamente) esto fue comparado con los resultados reportados por Hilty et al., 2005, donde utilizando los marcadores ETR-A y ETR-B, encontraron un moderado poder discriminatorio ($h \geq 0.25$), y los obtenidos por Roring et al., 2004, en donde utilizando estos mismos marcadores, obtuvieron un moderado poder discriminatorio ($h=0.40$ y 0.37). En comparación, en el trabajo de Allix et al., (2006) para *M. bovis*, se obtuvo un

poder discriminatorio de $h = 0.66$ para ETR-A y $h = 0.69$ para ETR-B. En el presente trabajo, al utilizar los marcadores QUB 11a y 11b se observó un bajo poder discriminatorio ($h = 0.14$ y 0.21), contrastando con los obtenidos por Roring et al. (2004), quienes observaron un moderado poder discriminatorio de $h = 0.53$ y 0.34 . Los resultados de Allix demuestran también un moderado poder discriminatorio de $h = 0.44$ y 0.48 . En el caso de los marcadores QUB 26 y 1895 que en este trabajo demostraron tener un bajo poder discriminatorio ($h = 0.05$ y 0.05), los resultados también contrastan con los obtenidos por Roring et al. (2004) donde obtuvieron un moderado poder discriminatorio al utilizar QUB 26 y 1895 ($h = 0.44$ y 0.34). Similar a lo obtenido por Allix et al., 2006, presentando un moderado poder discriminatorio de $h = 0.55$ y 0.24 .

En general, los loci utilizados mostraron similitud en cuanto al poder discriminatorio entre el presente trabajo y trabajos anteriores, sobre todo cuando se utilizaron varios loci, sin embargo las diferencias encontradas hacen suponer que diferentes loci son más eficientes en unas regiones que en otras, por lo cual se debe utilizar un panel de por lo menos los loci QUB 3336, QUB 3232, ETR-A, QUB11a y QUB11b para obtener un alto poder discriminatorio de las cepas en la región de este estudio.

Cuando se analizó el parentesco entre las 21 cepas aisladas con un dendrograma utilizando el programa TreeView, se observaron seis grupos, uno de los cuales corresponde a solo un aislado de Tijuana, lo cual puede deberse a una cepa poco representada y exclusiva de dicha región o al bajo número de

muestras analizadas. Los otros 5 grupos contuvieron tanto cepas provenientes de Tijuana como de Mexicali, sin embargo se observó un subgrupo de dos cepas provenientes solo de Mexicali con cuatro aislados, lo cual sugiere que este subgrupo esta principalmente circulando en Mexicali. Debido a que de los 6 grupos genéticos encontrados, 5 contienen tanto aislados provenientes de Tijuana como de Mexicali se cree que se han compartido las cepas en las dos regiones. Lo anterior puede deberse a que el ganado, principalmente machos holstein-friesian provenientes de Tijuana han sido vendidos a corrales para engorda en Mexicali y a que las vaquillas de reemplazo también han sido vendidas entre estas dos regiones. Al analizar cada uno de los perfiles alélicos, se observó que 5 (de los 14 totales) corresponden solo a aislados de Mexicali, 6 a aislados solo de Tijuana y 3 a aislados compartidos. Lo anterior puede deberse a que actualmente hay mas control en el movimiento de animales, por lo que se pueden ahora observar diferencias genéticas pequeñas en la mayoría de los aislados dependiendo de la región de procedencia.

Al comparar los perfiles alélicos obtenidos con los de otros estados del país y de Estados Unidos, se observaron también 6 grupos genéticos, tres de los cuales corresponden a solo perfiles de la región y tres compartidos tanto con perfiles de otras regiones del país como de Estados Unidos. Aunque se encontraron perfiles similares, ningún perfil proveniente de Baja California fue igual a los de las otras regiones incluidas en el análisis. Lo anterior sugiere que por lo menos recientemente no ocurre un intercambio de cepas entre las

regiones analizadas, debido a las restricciones de movimiento aplicadas por la normatividad vigente.

CONCLUSIONES

- La técnica de VNTR con los loci utilizados en este estudio es adecuada para genotipificar aislados de *M. bovis* provenientes de la región y es comparable con estudios en otras regiones.
- Los aislados provenientes de Mexicali y Tijuana fueron genéticamente similares en lo general, sin embargo del total de perfiles alélicos obtenidos solo el 21% fueron compartidos en tanto el resto correspondieron a perfiles exclusivos de cada región.
- Los aislados provenientes de Baja California fueron diferenciables de los provenientes de otras partes del país y de Estados Unidos, sin embargo todos los aislados analizados pertenecen a los mismos grupos genéticos, lo que sugiere que existe cierto grado de parentesco entre los aislados analizados, indistintamente de la región de procedencia en el estudio.
- Los resultados obtenidos en el presente trabajo son la primera aproximación para conocer los genotipos de *M. bovis* presentes en la región, sin embargo faltan estudios más amplios e interdisciplinarios para obtener los datos suficientes que puedan ayudar directamente al control y erradicación de la TBB.

LITERATURA CITADA

- Acosta- Salinas R., C. E. Chavez, F. Millan-Suazo. 2009. Tipificación de cepas de *M. bovis*. Revisión. Tec. Pec. Mex. 47 (4): 389-412.
- Alvarez J, Aranaz A, Bezos J, Dominguez L, Gomez-Mampaso E, Juan de L, Mateos A. y Romero B. 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *M. bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolate from animals. J. Clin. Microbiol; **44**: 3405-3408.
- Allix C., K. Walravens, C. Saegerman, J. Godfroid, P. Supply and M. F. Dufaux. 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable number tandem repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and Spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 44:6: 1951-1962.
- Amadio A. M. I. Romano, F. Bigi, I. Etchechoury , T. Kubica, Niemanns, A. Cataldi, K. Caimi. 2005. Identification and characterization of genomic variations between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. J. Clin. Microbiol. 43: 248.
- Ameni G., H. Miorner, F. Roger, M. Tibbo, (2000). Comparison between comparative tuberculin and gamma-interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis in Ethiopia. Tropical Animal Health and Production. 32: 267-276.
- Bauer J., V. Ø. Thomsen, S. Poulsen and A. B. Andersen. 1997. False positive results from cultures of *Mycobacterium tuberculosis* due to laboratory cross contamination confirmed by restriction fragment length polymorphism. J. Clin. Microbiol. 35: 4: 988-991.

- Biet F., M.L. Boschirolì, M.F. Thorel and L.A. guilloteau. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis avium-intracellulare* complex (MAC). J. Vet. Res. 36: 411-436.
- Bo-Young J., J. Sungmo, J. Park, Y. Kim, E. G. Lee, H. Lee, S. Seo and S. C. Nae. 2008. Variable number tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Gyeonggi-do, Korea. J. Vet. Sci. (9) 2: 145-153.
- Buddle B. M., D. N. Wedlock, L. A. Porlane, A. L. Corner, G. W. de Lisle, M. A. Skinner. 2003. Revaccination of neonatal calves with M. bovis BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination infection and immunity. 71: 6411-6419.
- Costello E., J.W. Egan, F.C. Quigley and P.F. O'Reilly. 1997. Performarse of the sigle intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculosis lesions in irish herds. Vet. J. 141: 222-224-
- Cousins D, S. Williams, E. Liebana, A. Aranaz, A. Bunschoten, J. V. Embden y T. Ellis. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J. Microbiol. 36 (1); 168-178.
- De Kantor I.N., V. Ritacco. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in latin American and Caribbean countries. Vet. Microbiol. 1122-4: 111-118.
- Frothingham R. and O. W. A. Meeker. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiol. 144: 1189-1196.
- García P. E. y J. C. Rodríguez. 2005. Epidemiología molecular de la tuberculosis: Principales hallazgos y su aplicación en España. Arch Bronconeumol. 41(11): 618-624.

- Garnier T, K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansor, M. Pryor, S. Duthoy. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Sci U.S.A. 10013: 7877-7882.
- Gibson A. L., G. Hewinson, T. Goodchild, B. Watt, A. Story, J. Inwald and F. A. Drobniewski. 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 42 (1): 431-434.
- Gibson A. L., T. Brown, L. Baker and F. Probniewski. 2005. Can 15-locus Mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis provide insight into the evaluation of *Mycobacterium tuberculosis*? J. Clin. Microbiol. 71 (12); 8207-8213.
- Haddad N., A. Ostyn, C. Karoui, M. Masselot, M. F. Thorel, S. L. Hughes, J. Inwald, R. G. Hewinson and B. Durand. 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Frances from 1979 to 2000. J. Clin. Microbiol. 39(10): 3623-3632.
- Harris N. B., J. Payeur, D. Bravo, R. Osorio, T. Stuber, D. Farrell, D. Paulson, S. Treviso, A. Mikolon, A. R. Lainz, S. C. Hoskins, R. Rast, M. Ginsberg and H. Kinde. 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. Applied and Enviro. Microbiol. 73(3): 1025-1028.
- Hilty M., C. Diguimbaye, E. Schelling, F. Baggi, M. Tanner and J. Zinsstag. 2005. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. Vet. Microbiol. 109: 217-222.
- Hunter R.P and Gaston M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. J. Clin. Microbiol. 26: 11; 2465-2466.

- Kamerbeek J. I. Schouls, A. Kolk, M. Van Agterveld, D. Van Soolinger, S. Kuijper. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35: 907-914.
- Kell D. B. y M. Young. 2000. Bacterial dormancy and culturability: The role of autocrine growth factors. *Vet. Microbiol* **3**: 228-243.
- Lee G. Luna. 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed forces institute of Pathology. New York. Third Edition. Mc GRAW-HILL. P. 220-230.
- Liebana E., A. Aranaz, A. Mateos, M. Vilafranca, E. Gomez-Mampaso, J. C. Tercero, J. Alemany, G. Suarez, M. Domingo, y L. Dominguez. 1995. Simple and rapid detection of micobacterium tuberculosis complex organisms in Bovine Tissue Samples by PCR. *J. C. Microbiology.* 33 (1): 33-36.
- Marin L. C., J. M. Vargas, M. Zumárraga, A. Cataldi, M. I. Romano, I. E. Garcia and J. A. G. Merchand 2005. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern Mexico. *Can. J. Microbiol.* 51:996-1000.
- Martinez L.R., B. Harris, W. C. Black IV, R. M. Meyer, P. J. Brennan, V. V. Vissa, R. L. Jones. 2008. Genotyping North American animal *M. bovis* isolates using multilocus variable number tandem repeat analisis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20: 707-715.
- Mazars E., S. Lesjean, A.L. Banuls, M. Gilbert, V. Vicent, B. Gioquel. 2001. High-resolution minisatélite based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98; 1901-1906.

Milián-Suazo F., M. D. Solman, C. Ramirez, J. B. Payeur, J C. Rhyan and M. Santillan. 2001. Identification of tuberculosis in Cattle in Mexico. Am. J. Vet. Res. 61: 86-89.

Montoro E, J. Valdivia, and S. C. Leão. 1998. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolate obtained in Havana, Cuba, by IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and by the double-repetitive-element PCR method. J. Clin. Microbiol. 36(10):3099-3102.

Muller B., B Steiner, B Bonfoh, A. Fané, H. N. Smith and J. Zinsstag. 2008. Molecular Characterisation of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle slaughtered at the Bamako abattoir in Mali. BMC Vet. Res. 4(26): 1-6.

Murray C, J. L. Styblo, K. Rovillon. 1990. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. Tuber. Lung Dis. 65, 2-20.

Neill S.D., J.J. O' Brien and R.M. Mc Cracken. 1988. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin, reacting cattle. Vet. Rec; 122: 184-186.

Organización Panamericana de la Salud (OPS/ OMS). 2000. Brucelosis y Tuberculosis (*Mycobacterium bovis*). Situación de los programas en las Américas. Public. PANAFTOSA 4. Río de Janeiro, Brasil.

Organización Mundial de Salud/ (OMS) 1986. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Comité mixto, FAO/OMS de expertos en brucelosis y tuberculosis. Sexto informe, serie de informes técnicos No. **740**. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza.

Payeur B, Jarnagin L, Marquardt G, Sharper A, y M. Martin. 1993. Manual of laboratory methods in veterinary. Mycobacteriology for the isolation and identification of

Mycobacteria. Ames, Iowa: United States Department of Agriculture, animal and plant health inspection service. Veterinary services. P. 124.

Pérez G. L., S. F. Milian, D. C. Arriaga, C. T. Romero y C. M. Escartin. 2007. Epidemiología molecular de la tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Queretano, México. Salud Pública Mex.: 50: 286-291.

Prabhakar S., A. Mishra, A. Singhal, V. M. Katoch, S.S. Thakral, J.S. Tyagi, and H.K. Prasad. 2004. Use of the huB gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. J. Clin. Microbiol: 42: (6) 2724-2732.

Ramírez C. I. C., F. M. A. Santillán, D. C. Arriaga, R. B. Arellano y A. F. Morales. 2004. Empleo de una PCR-múltiplex para diferenciar caprinos vacunados con *M. bovis* BCG de infectados con *M. bovis* de campo. Tec. Pec. Mex; 42 (3): 419-428.

Roring S., N. S. Alistair, B. David, W. Ian, H. Glyn, S. D. Neill and A. S. Robon. 2002. Development of variable number tandem repeat typing of *Mycobacterium bovis*: comparison of results with those obtained by using existing exact tandem repeats and Spoligotyping. J. Clin. Microbiol. 40(6): 2116-2133.

Roring S., N. S. Alistair, R. G. Hewinson, S. D. Neill and A. S. Robon. 2004. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. Vet. Microbiol. 101: 65-73.

Sabat A., W. Krzyszstan-Russjan, R. Filipek, K. Kosowska, W. Hryniewicz, J. Travis, J. Potempa. 2003. New method for typing staphylococcus aureus strains: multiple locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin Microbiol. 414: 1801-1804.

Saharaoui N., B. Muller, D. Guetarni, F. Boulahdal, D. Yala, R. Ouzrout, S. Berg, N. H. Smith y J. Zinsstag. 2009. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. BMC Vet. Res. Biomed central 5: 4. 1-7.

SAGARPA 1996. (Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación). Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Diario Oficial de la Federación.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2009. Campaña nacional contra la tuberculosis bovina. <http://www.senasica.gob.mx/?id=801>.

Skuce R. A., T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. G. Hewinson and S. D. Neill. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiol (148): 519-528.

Supply P., C. Allix, S. Lesjean et al., 2006. Proposal for standardization of optimized *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. J. Clin Microbiol. 44: 4498-4510.

Talbot E. A, Williams D. L y R. frothingham. 1997. PCR identification of *M. bovis* BCG. J Clin Microbiol; **35**: 566-569.

Thoen O. C., H. J. Steele, and J. M. Gilsdorf. 2006. *Mycobacterium bovis* infection in animals and Humans. Blackwell Publishing. 2do Ed. Iowa, EUA.

Tizard I. R. 2004. Veterinary Immunology; inmulo. EUA. P248-249.

Zumarraga M, M. E. Cicuta, C. Martin, A. Cataldi, A. Alito, F. Bigi, E. Roxo, S. Sakamoto, M. I. Romano. 1998. Epidemiologia molecular de aislamientos de *Mycobacterium bovis* Del Nordeste Argentino y de Brasil utilizando la técnica de Spoligotyping. Revista veterinária, Buenos Aires, Argentina P. 2-4.