

01674

23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL.

CARACTERIZACION GENETICA DE LAS SECUENCIAS
POLIMORFICAS RICAS EN GC (PGRS) EN AISLADOS DE
Mycobacterium bovis y *Micobacterium tuberculosis*.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL MICROBIOLOGIA

P R E S E N T A
MARCO ANTONIO SANTILLAN FLORES

COMITE: TUTORAL: CLARA INES ESPITIA PINZON
FRANCISCO SUAREZ GÜEMES
CAMILA ARRIAGA DIAZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.

JUNIO DEL 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Proyecto financiado por :
CONACyT . No. 33580-M
DGPA-UNAM. No. IN-221599
Alumno becario CONACyT.
No. 129570

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

- ✓ A mis padres: Teodoro y María
- ✓ A mis hermanos: Hortensia, Guillermo, Lucina, Agustín, José Antonio, Gustavo, Adrián Enrique y Sandra.
- ✓ A José Miguel, José Enrique, Karla Daniela, América Gabriela, Anna Karen, Anahí, Monserrat, Alberto, Armando y Karina.

Por su gran paciencia , comprensión y por que siempre existirá alguien que nos cuide, apoye y de la confianza para poder llevar a cabo todos nuestros planes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

- ✓ A los compañeros del IIB-UNAM: Javier Flores, Rafael Cervantes, Angélica Amador, Jaime Campuzano, Mariano Reyes, Wendy, Elizabeth y Karina. Por su ayuda y por sus consejos siempre tan atinados y sobretodo por su amistad
- ✓ A la Dra. Clara Espitia Pinzón: por brindarme la oportunidad de trabajar con su grupo.
- ✓ A la Dra. Carolina Ramírez: por todas las facilidades otorgadas para realizar los estudios de Posgrado y por sus valiosos comentarios y sugerencias en la redacción del trabajo de tesis.
- ✓ A los compañeros y amigos del Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM, por las facilidades otorgadas para utilizar el analizador de imágenes.
- ✓ A la MVZ Irasema Yela y a la MVZ Graciela Méndez por su valiosa colaboración para obtener los cultivos bacteriológicos.
- ✓ Al Comité Tutorial: Dra. Clara Esptia, Dra. Camila Arriaga y Dr. Francisco Suárez, por todas sus aportaciones y sugerencias para poder llevar a cabo el proyecto.
- ✓ Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y al Dr. Feliciano Milián Suazo por todos sus comentarios y sugerencias para el trabajo de tesis.
- ✓ A los compañeros del CENID-MICROBIOLOGÍA-INIFAP: por todos sus consejos y apoyo.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"TEN LA SUFICIENTE FELICIDAD QUE TE HAGA DULCE
LOS SUFICIENTES TROPIEZOS QUE TE HAGAN FUERTE
LA SUFICIENTE TRISTEZA QUE TE HAGA HUMANO
LA SUFICIENTE FE Y ESPERANZA QUE
TE LLEVEN A BUSCAR SIEMPRE UN NUEVO DÍA Y
CON EL UNA OPORTUNIDAD PARA SER MEJOR".

ÍNDICE

	PÁGINA.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 GENERALIDADES	3
1.2 SALUD PÚBLICA	5
1.3 DIAGNÓSTICO Y CONTROL	7
1.4 LA SECUENCIA DE INSERCIÓN 6110 (IS6110)	8
1.5 SECUENCIAS POLIMÓRFICAS RICAS EN GC (PGRS)	9
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVO GENERAL	12
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	12
4. MATERIAL Y MÉTODOS	13
4.1 BACTERIAS	13
4.2 EXTRACCIÓN DEL DNA MICOBACTERIANO	13
4.3 DIGESTIÓN DEL DNA MICOBACTERIANO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	14
4.4 SOUTHERN BLOTTING	15
4.4.1 Prehibridación e hibridación de las membranas	15
4.4.2 Lavados y revelado	15

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

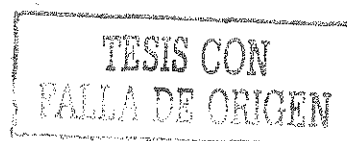
4.5	SONDAS	16
5.	RESULTADOS	17
5.1	EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS: Rv1759c DE 3.9 Kb, Rv1759c DE 647 pb Y PE- PGRS81 DE 235 pb	17
5.1.1	Aislados de <i>M. tuberculosis</i> . DNA digerido con <i>PvuII</i> , <i>SmaI</i> Y <i>AluI</i>	17
5.1.2	Aislados de <i>M. bovis</i> . DNA digerido con <i>PvuII</i> , <i>SmaI</i> Y <i>AluI</i>	18
5.2	CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>M. tuberculosis</i>	19
5.2.1	Patrón polimórfico presentado con el marcador PE- PGRS81 de 235 pb / DNA digerido con <i>SmaI</i>	19
5.3	CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>M. bovis</i> DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DE LA REPÚBLICA MEXICANA	19
5.3.1	Patrón polimórfico presentado con el marcador IS6110 / DNA digerido con <i>PvuII</i>	19
5.3.2	Patrón polimórfico presentado con el marcador PE-PGRS81 de 235 pb/ DNA digerido con <i>SmaI</i>	20
6.	DISCUSIÓN	21
7.	CONCLUSIONES	26
8.	CUADROS Y FIGURAS	27
9.	LITERATURA CITADA	51
10.	ANEXO	58

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

PÁGINA

CUADRO 1	Cepas de Referencia y aislados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> empleadas en el estudio.	27
CUADRO 2	Cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> empleadas en el estudio.	28
Figura 1	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> digeridas con <i>PvuII</i> : Rv1759c de 3.9 Kb y 647 pb.	29
Figura 2	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> digeridas con <i>PvuII</i> : PE-PGRS81 de 235 pb.	30
Figura 3	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> digeridas con <i>Sma</i> I: Rv1759c de 3.9 Kb y 647 pb.	31
Figura 4	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> digeridas con <i>Sma</i> I: PE-PGRS81 de 235 pb.	32
Figura 5	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> digeridas con <i>Alu</i> I: Rv1759c 3.9 Kb y 647 pb.	33
Figura 6	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> digeridas con <i>Alu</i> I: PE-PGRS81 de 235 pb.	34
Figura 7	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> digeridas con <i>PvuII</i> : Rv1759c 3.9 Kb y 647 pb.	35
Figura 8	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> digeridas con <i>PvuII</i> : PE-PGRS81 de 235 pb.	36
Figura 9	RFLP del DNA de las cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> digeridas con <i>Sma</i> I: Rv1759c 3.9 Kb y 647 pb.	37

- Figura 10 RFLP del DNA de las cepas de *Mycobacterium bovis* digeridas con **Sma** I: PE-PGRS81 de 235 pb. 38
- Figura 11 RFLP del DNA de las cepas de *Mycobacterium bovis* digeridas con **Alu** I: Rv1759c 3.9 Kb y 647 pb. 39
- Figura 12 RFLP del DNA de las cepas de *Mycobacterium bovis* digeridas con **Alu** I: PE-PGRS81 de 235 pb. 40
- Figura 13 Patrones Polimórficos del RFLP DNA/**Sma** I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. tuberculosis*. 41
- Figura 14 Integración de los Patrones Polimórficos de DNA/ **Sma** I / PE-PGRS81 de las cepas de *M. tuberculosis* en un dendrograma. 42
- Figura 15 Patrones Polimórficos del RFLP DNA/ **Pvu** II / IS6110 de las cepas de *M. bovis* de Veracruz. 43
- Figura 16 Patrones Polimórficos del RFLP DNA/ **Pvu** II / IS6110 de las cepas de *M. bovis* del Estado de México. 44
- Figura 17 Patrones Polimórficos del RFLP DNA/ **Pvu** II / IS6110 de las cepas de *M. bovis* de Jalisco y Sonora. 45
- Figura 18 Integración de los Patrones Polimórficos de DNA/ **Pvu** II / IS6110 de las cepas de *M. bovis* en un dendrograma. 46
- Figura 19 Patrones Polimórficos del RFLP DNA/**Sma** I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* de Veracruz. 47
- Figura 20 Patrones Polimórficos del RFLP DNA/**Sma** I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* del Estado de México. 48
- Figura 21 Patrones Polimórficos del RFLP DNA/**Sma** I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* de Jalisco y Sonora. 49
- Figura 22 Integración de los Patrones Polimórficos de DNA/ **Sma** I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* en un dendrograma 50



RESUMEN

Santillán Flores Marco Antonio. Caracterización genética de las Secuencias Polimórficas Repetidas Ricas en GC (PGRS) en aislados de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*. Bajo la dirección de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón y el Dr. Francisco Suárez Güemes.

La tuberculosis humana ha cumplido más de 100 años de estar presente y ser considerada como uno de los principales problemas de salud en el mundo. De igual manera la tuberculosis en los bovinos se ha convertido en un serio problema, ya que la alta incidencia y prevalencia de la enfermedad en el ganado lechero se ha traducido en pérdidas económicas para la industria pecuaria.

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar los marcadores genéticos IS6110 y la región conservada de las Secuencias Polimórficas Repetidas Ricas en GC (PGRS): PE-PGRS81 de 235 pb y Rv1759c 647 pb como marcadores de polimorfismo genético en el DNA de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de establecer diferencias entre los aislados y agrupar las cepas con base al marcador genético que presentara mayores diferencias. Se analizaron por medio de la técnica del Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP): 17 aislados de *M. tuberculosis*, y 51 cepas de *M. bovis*. El DNA fue digerido con las enzimas de restricción *AluI*, *PvuII* y *SmaI*.

Las diferencias más importantes en el patrón de reconocimiento entre las PGRS estudiadas se observó al utilizar el DNA digerido con *SmaI* y la hibridación con la sonda PE-PGRS81 de 235 pb, con esta secuencia se observaron 13 patrones polimórficos en los aislados de *M. tuberculosis*, los cuales fueron clasificados en cuatro clusters. En las cepas de *M. bovis* se reconocieron 36 patrones polimórficos, los cuales fueron agrupados en 12 clusters. 57% de las cepas de *M. bovis* analizadas con la secuencia IS6110 y digeridas con *PvuII*, presentaron una banda de 1.9 Kb, 25.5% presentaron una banda en distinta posición y el 17.5% de las cepas presentaron de 2 a 6 bandas, se reconocieron nueve patrones polimórficos. Los resultados del presente trabajo muestran que la secuencia de 235 pb de la PGRS81 utilizada como marcador de polimorfismo genético en combinación con el DNA digerido con la enzima *SmaI* pueden ser un sistema alternativo para el análisis de los aislados de *M. tuberculosis* que presentan un bajo número de copias de IS6110 así como las cepas de *M. bovis*.

Palabras Clave: tuberculosis humana, tuberculosis bovina, RFLPS, PGRS, *M. tuberculosis*, *M. bovis*.

ABSTRACT

Santillán Flores Marco Antonio. Genetic characterization of the Polimorphic Rich GC Sequences (PGRS) from *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* isolates . Under supervision of Dra. Clara Inés Espitia Pinzón and Dr. Francisco Suárez Güemes.

Human tuberculosis has more than 100 years to be considered as the main health problem in the world. Bovine tuberculosis has become a serious problem for livestock due to high incidence and prevalence of disease in dairy cattle.

The objectives of this work were to evaluate the IS6110 and the conserved region of the Polymorphic GC-Rich Sequences (PGRS): PE-PGRS81 of 235 pb and Rv1759c of 647 pb as genetic polymorphic markers in the DNA of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* isolates. With the aim to establish differences among the isolates and classify strains on basis of the major differences generated by the genetic markers .

Seventeen isolates of *M. tuberculosis* and 51 strains of *M. bovis* were analyzed by Restriction Fragments Length Polymorphism (RFLP): The DNA was digested with the restriction enzymes *AluI*, *PvuII* *SmaI*.

The major differences were observed when the DNA was digested with *SmaI* and when PE-PGRS81 of 235 pb was used as a probe. With this combination 13 polimorphic patterns were detected in *M. tuberculosis*, which were classified in four clusters. *M. bovis* showed 36 polimorphic patterns, which were contained in 12 clusters.

With IS6110 /*PvuII* the *M. bovis* strains showed 9 polimorphic patterns, which vary from 1 to 6 bands. The majority of isolates (29 of 51) exhibited a single copy of IS6110. The results showed that the better genetic differentiation among the isolates were obtained when the *SmaI* enzyme was used with the PE-PGRS81 of 235 pb as probe. These results allow us to suggest this genetic marker for molecular epidemiology studies related with *M. bovis* and *M. tuberculosis*.

KEY WORDS: human tuberculosis, bovine tuberculosis, PGRS, RFLPS, *M. bovis*, *M. tuberculosis* .

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La tuberculosis bovina es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, no sólo por que representa un riesgo para la salud animal y potencialmente para la salud pública, sino que también se traduce en pérdidas económicas. Aunado a esto, la presencia de la enfermedad se convierte en uno de los principales obstáculos para la movilización y comercialización nacional e internacional del ganado (Milián-Suazo et al 2000, Luna-Martínez *et al* 1996).

El agente causal de la tuberculosis en el ganado bovino es *Mycobacterium bovis*, que es un bacilo ácido alcohol resistente, de crecimiento lento, que no forma esporas pero tiene resistencia moderada al calor, a la desecación y a varios desinfectantes (Balandrano *et al* 1996, Farga 1995). Estas características se deben a que la micobacteria posee una pared celular rica en lípidos. A la luz directa del sol el bacilo puede ser destruido fácilmente, en los ambientes húmedos puede permanecer viable durante periodos prolongados (Balandrano *et al* 1996, Farga 1995). La infección con el bacilo se caracteriza por producir lesiones de tipo granulomatoso principalmente en el pulmón y linfonódulos, lo que lleva a que los animales infectados pierdan progresivamente su condición corporal (Balandrano *et al* 1996, Milián-Suazo et al 2000, Estrada 1995, Farga 1995).

La presencia de la enfermedad en los hatos bovinos ocasiona pérdidas en la producción de carne y leche debidas a la disminución en el desarrollo. Estas pérdidas consisten en: retención de canales en los rastros, pérdidas en la producción láctea (17%), en la producción de terneras (15%), en la disminución del número de lactancias (10%) y en la disminución de un 10-20% de la duración de cada lactancia con respecto a los animales sanos (Luna-Martínez *et al* 1996, Valdespino 1993).

En los establos lecheros de México, la vida productiva de las vacas es muy corta y los desechos anuales por establo fluctúan entre el 25 y 35%. Se considera que las principales causas de deshecho son debidos a trastornos reproductivos, digestivos y problemas de tipo respiratorio. La tuberculosis se considera como una de las principales causas de deshecho de ganado, lo que ocasiona desembolsos importantes para la empresa agropecuaria al aumentar los costos de depreciación de vientres en el establo y disminuir la disponibilidad de animales de reemplazo en el país. Se estima que en México existen alrededor de 35 millones de cabezas de ganado bovino, de las cuales 4.4 millones son de ganado lechero; siendo la prevalencia de la enfermedad para este tipo de ganado del 10-12% y para el ganado productor de carne de 0.5-1% (Estrada 1995). La producción lechera en México se lleva a cabo básicamente dentro de los siguientes sistemas de explotación: la producción lechera especializada, la semiestabulada o familiar y la ordeña estacional. Las pérdidas ocasionadas por la tuberculosis en el sistema de producción lechero ascienden a más de 55 mil millones de pesos anuales y de estos el 60% recae en la ganadería especializada (Valdespino 1993). Los Estados de la República con mayores problemas de tuberculosis son aquellos en los que existen cuencas lecheras como: Baja California, Hidalgo, Querétaro, Chihuahua, Jalisco y la Comarca Lagunera en Coahuila. Entre los factores que afectan a la industria lechera, es de particular importancia mencionar la alta incidencia de enfermedades de tipo crónico como es el caso de la tuberculosis (Estrada 1995, Valdespino 1993).

1.2 SALUD PÚBLICA

La tuberculosis humana ha cumplido más de 100 años de estar presente y ser considerada como uno de los principales problemas de salud en el mundo (Olvera *et al* 1998). Los factores que tradicionalmente se han asociado con la adquisición, desarrollo y mortalidad de la infección son complejos, ya que están influenciados por aspectos sociales, económicos, culturales, biológicos, etc. Los factores que con mayor frecuencia se mencionan son la pobreza, la desnutrición, el hacinamiento, la ventilación, la iluminación deficiente de las viviendas, el alcoholismo, el uso de drogas, los tratamientos prolongados con corticoesteroides, el embarazo, la falta de acceso a los servicios de salud, los fenómenos migratorios y la presencia de otros padecimientos asociados como la Diabetes mellitus. Recientemente la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha sumado a la larga lista de factores de riesgo y en la actualidad constituye el factor de mayor asociación con el desarrollo de la tuberculosis. Además, debido al abandono o a la mala aplicación del tratamiento antituberculoso, han surgido cepas del bacilo resistentes a los medicamentos, por lo que se considera necesario establecer nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de la enfermedad (Olvera *et al* 1998, Valdespino-Gómez *et al* 1995, Figueroa *et al* 2000, Ostrosky-Zeichner *et al* 2000). En 1993 la Organización mundial de la Salud (OMS) declaró a la tuberculosis como una emergencia mundial, ya que las estadísticas indican que una tercera parte de la población está infectada con el bacilo tuberculoso (Dye *et al* 1999, Enarson *et al* 1999, Bloom *et al* 1992, Miller *et al* 1998). La OMS pronostica que en los próximos 10 años, alrededor de 300 millones de personas contraerán la infección, 90 millones de personas tendrán la tuberculosis en forma activa y alrededor de 30 millones morirán a causa de la enfermedad (Enarson *et al* 1999, Cosivi *et al* 1998). En México de acuerdo a los datos de Valdespino-Gómez de 1998, donde analizan las tendencias de morbilidad por tuberculosis indican que a partir de 1991 la tasa de morbilidad notificada para la enfermedad es de 17.1 casos por 100 000 habitantes. Se estima que en los últimos 10 años han ocurrido más de 27 000 casos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El agente causal de la enfermedad en humanos es *Mycobacterium tuberculosis*, pero también *M. bovis* puede producir la enfermedad principalmente en los países donde la tuberculosis bovina no ha sido erradicada. *M. bovis* se transmite al hombre a través de leche no pasteurizada proveniente de animales infectados o por contacto directo con estos, ya que el bacilo es eliminado por medio de aerosoles (Enarson *et al* 1999, Cosivi *et al* 1998). La Organización Panamericana de la Salud (OPS) informó que en 1990 en América del Sur se presentaron aproximadamente 7,000 casos de tuberculosis en humanos causada por *M. bovis*, se considera que esta cifra puede ser ocho veces mayor. Entre 1980 y 1991 en San Diego California se llevo acabo un estudio en el que se identificaron 73 casos de personas de origen latino infectados por *M. bovis*, los cuales representan el 3% de los casos de tuberculosis humana notificada durante ese período (Danker *et al* 1993). Otro estudio realizado en Argentina de 1986 a 1989 reveló que de una muestra de 679 personas enfermas de tuberculosis; 26 (3.8%) estaban infectadas con *M. bovis*, en este estudio también se menciona que los individuos infectados desarrollaban actividades directamente con el ganado (OPS 1994).

En México se debe considerar a la tuberculosis bovina como un serio problema en salud pública, ya que del total de la leche que se produce en el territorio nacional , solo el 23% se pasteuriza, el 40% se destina a la industrialización y el 37% restante se comercializa libremente (Luna-Martínez *et al* 1996).

1.3 DIAGNÓSTICO Y CONTROL

En México el control de la enfermedad en el ganado bovino se basa en la aplicación de la prueba intradérmica de la tuberculina y el sacrificio de los animales reactivos (Santillán *et al* 1999). El diagnóstico definitivo se lleva a cabo mediante histopatología, aislamiento y tipificación bioquímica del bacilo a partir del cultivo bacteriológico de muestras de órganos con lesiones sospechosas a tuberculosis (Santillán *et al* 1999, Corner 1994, Payeur *et al* 1993).

Con los avances que ha tenido la Biología Molecular se han generado nuevas herramientas para el diagnóstico y la epidemiología. Estas técnicas tienen la característica de ser muy sensibles y específicas, además de que proporcionan información más exacta a nivel epidemiológico de lo que sucede con la infección. El diagnóstico molecular basado en la detección de los genes del agente etiológico, con las técnicas apropiadas permite que este se detecte de manera más precisa así como también permite el rastreo y el seguimiento de las cepas del agente patógeno en una población. La aplicación de estas técnicas a la tuberculosis bovina, permite comprender mejor la dinámica de la transmisión del bacilo, la identificación de brotes y la relación de estos con focos de infección comunes así como la identificación de diferentes especies involucradas en la cadena epidemiológica (Milián 1998, Ross *et al* 1992, Collins *et al* 1994).

Las técnicas de tipificación del Ácido Desoxiribo-Nucléico (DNA) son empleadas actualmente para estudios de investigación epidemiológica de varias enfermedades infecciosas (Collins *et al* 1994). Se considera que la técnica de identificación del Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) es una herramienta muy valiosa para llevar a cabo estudios epidemiológicos. Esta técnica identifica diferencias genéticas entre cepas por el patrón que forman los fragmentos del DNA en geles de agarosa o poliacrilamida después de que el DNA ha sido digerido con enzimas de restricción y detectado con sondas marcadas en un análisis de Southern blot. Además de ser sensible en la identificación del agente etiológico, la técnica permite asociar aislados obtenidos en el laboratorio con posibles focos de infección. Las sondas que más se han

empleado para el estudio de la tuberculosis por RFLP son la Secuencia de Inserción 6110 (IS6110) y las Secuencias Polimórficas Ricas en GC (PGRS) (Van-Soolingen *et al* 1991, Hatfull *et al* 2000, Ratledge 1999, Milián 1998)

1.4 LA SECUENCIA DE INSERCIÓN 6110 (IS6110)

Existen principalmente dos formas de secuencias repetidas de DNA en el genoma bacteriano: las secuencias repetidas dispersas y las secuencias repetidas en tandem (Hatfull *et al* 2000, Ratledge 1999).

Las secuencias repetidas dispersas pueden corresponder a genes duplicados o a elementos genéticos móviles presentes en varias copias, a este tipo de elementos pertenecen las Secuencias de Inserción (IS). Se considera que el 3.4% del genoma de *M. tuberculosis* esta constituido por secuencias de inserción y por profagos; se tienen bien definidos 56 elementos IS en el genoma micobacteriano (Cole *et al* 1998, Young 1998). La movilidad potencial que tienen los elementos de inserción constituyen una fuente de plasticidad genómica, con lo que podrían participar en una gran variedad de rearreglos cromosomales. Una de las secuencias de inserción que ha sido más ampliamente estudiada, es el elemento de inserción 6110, que es un elemento funcional transposable de 1.358 kilobases (Kb). Este elemento esta flanqueado por secuencias repetidas invertidas de 30 pb y contiene un frente de lectura que presenta una gran homología con las transposasas de la familia IS3 de las enterobacterias. La IS6110 únicamente está presente en las especies que integran al complejo tuberculosis: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*. Los aislados de *M. tuberculosis* presentan de cero a 25 copias y las cepas de *M. bovis* de una a dos copias. Con este marcador se pueden establecer diferencias entre cepas de *M. tuberculosis*, debido a que los elementos IS están presentes en diferente número de copias y están integrados en varios sitios del cromosoma, por lo que fragmentos de restricción que portan IS son altamente polimórficos. Los estudios epidemiológicos en los que se ha empleado este marcador

genético, han permitido identificar brotes de infección, rutas de transmisión y diseminación de cepas. Una limitante que presenta este marcador es que tiene poco poder de discriminación para diferenciar entre cepas de *M. tuberculosis* que portan menos de cinco copias del elemento y de las cepas de *M. bovis* que sólo portan una a dos copias. (Ross *et al* 1992, Collins *et al* 1994, Van-Soolingen *et al* 1991, Plikaytais *et al* 1991, Hatfull *et al* 2000, Ratledge 1999).

1.5 SECUENCIAS POLIMÓRFICAS RICAS EN GC (PGRS)

Dentro del análisis de la recientemente concluida secuencia del genoma de *M. tuberculosis* se estableció que está constituido por 4'411,529 pb, con un contenido de Guanina + Citosina (G+C) del 66%. Además también se encontró que en el genoma existen genes que codifican para familias de proteínas ricas en glicina con estructuras repetitivas denominadas PE (Pro-Glu) y PPE (Pro-Pro-Glu) por la presencia de estos residuos de aminoácidos en la región amino-terminal en la mayoría de ellas (Cole *et al* 1998, Young 1998). Cerca del 10% de la capacidad codificadora del genoma está dedicado a estas dos familias de proteínas. Miembros de estas familias son los denominados PGRS (Polimorphic GC rich sequences), estas a su vez forman una familia que está constituida por 61 genes, los cuales se caracterizan por presentar una secuencia consenso repetida de 9 pb CGGCGGCAA. Las proteínas PGRS presentan diferentes tamaños que van de 100 a 1900 aminoácidos y tienen un alto contenido de glicina. Algunas de las secuencias PGRS que han sido descritas y caracterizadas por diferentes laboratorios son: pBNT12 (Ross *et al* 1992), pMBA2 (Bigi *et al* 1995), MBHRD (Doran *et al* 1992), orf3' (Paulet 1995), Rv 1759c (Aboud-Zeid *et al* 1991) y más recientemente la PGRS81 (Espitia *et al* 1999). De estas la pBNT12 y la pMBA2 han sido ampliamente usados como marcadores de polimorfismo en estudios epidemiológicos de tipificación de aislados de *M. tuberculosis* y *M. bovis* (Bigi *et al* 1995, Doran *et al* 1992, Thierry *et al* 1990, Hermans *et al* 1991, Collins *et al* 1993, Van-Soolingen *et al* 1993).

La comparación de la secuencia PE-PGRS81 con la reportada en el genoma de *M. tuberculosis* mostró que esta presenta una homología alta con miembros de la familia de las PE-PGRS. La variabilidad a nivel genético de las PE-PGRS y la presencia de frentes de lectura abiertos en la gran mayoría de las PGRS que codifican para proteínas potencialmente ricas en glicina podrían ser una fuente potencial de variación antigénica por lo que se considera que pudieran tener relación en la modulación de la respuesta inmune del huésped y la virulencia de las cepas (Espitia *et al* 1999). Recientemente se demostró que al menos un miembro de esta familia, la secuencia Rv1759c que fue expresada como un péptido recombinante, fue reconocido por los sueros de humanos y bovinos enfermos con tuberculosis (Espitia *et al* 1999). Esta observación junto con la de Cataldi (comunicación personal), quien clono un gen de una biblioteca de expresión de *M. bovis* usando un suero de un bovino tuberculoso, cuya secuencia presentó homología con un miembro de la PE-PGRS, constituyen una de las primeras evidencias de la expresión de estas secuencias.

Se considera que la variación antigénica podría estar relacionada con las PGRS y establecerse por diferentes mecanismos tales como:

- A) Todos los aislamientos tienen el mismo repertorio de proteínas PGRS; por lo que, la variación antigénica podría darse por la expresión diferencial de las secuencias entre los diferentes aislados.
- B) Las diferentes cepas poseen un repertorio de proteínas PGRS diferente.

Evidencias experimentales favorecen este último mecanismo:

1. Las secuencias PGRS sirven para diferenciar aislamientos, indicando polimorfismo entre cepas.
2. Cole *et al* 1998, demostraron diferentes número de repeticiones PGRS en la misma proteína entre *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG (Espitia *et al* 1999).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el presente estudio se plantea la evaluación de dos secuencias de PGRS: la PE-PGRS81 de 235 pb y la Rv1759c de 647 pb en sus regiones conservadas como marcadores genéticos para establecer un método que permita clasificar y agrupar diferentes cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

Esta información será útil para tratar de comprender mejor la dinámica de la transmisión del bacilo, así como la identificación de brotes y la relación de estos con focos de infección comunes, para de esta manera tratar de definir estrategias para el control de la enfermedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. HIPÓTESIS

El genoma de *Mycobacterium spp.* contiene secuencias repetidas polimórficas de DNA, de las cuales las PGRS son las más abundantes y presentan una gran variabilidad genética. Por lo que el empleo de las regiones conservadas de PE-PGRS81 y Rv1759c, como marcadores genéticos permitirá agrupar y clasificar diferentes cepas de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*

3. OBJETIVO GENERAL

Establecer diferencias y agrupar las cepas de *Mycobacterium bovis* de distintas áreas geográficas del país a partir de la presencia de la secuencia IS6110 /PvuII y con base al marcador genético PGRS.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer diferencias y agrupar las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con base al marcador genético PGRS.
- Evaluar los marcadores genéticos PE-PGRS81 y Rv1759c en sus regiones conservadas para detectar Secuencias Polimórficas Repetidas Ricas en GC (PGRS) en el DNA de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*.
- Evaluar la digestión enzimática que genere más diferencias entre las cepas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. HIPÓTESIS

El genoma de *Mycobacterium spp.* contiene secuencias repetidas polimórficas de DNA, de las cuales las PGRS son las más abundantes y presentan una gran variabilidad genética. Por lo que el empleo de las regiones conservadas de PE-PGRS81 y Rv1759c, como marcadores genéticos permitirá agrupar y clasificar diferentes cepas de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*

3. OBJETIVO GENERAL

Establecer diferencias y agrupar las cepas de *Mycobacterium bovis* de distintas áreas geográficas del país a partir de la presencia de la secuencia IS6110 /PvuII y con base al marcador genético PGRS.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer diferencias y agrupar las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* con base al marcador genético PGRS.
- Evaluar los marcadores genéticos PE-PGRS81 y Rv1759c en sus regiones conservadas para detectar Secuencias Polimórficas Repetidas Ricas en GC (PGRS) en el DNA de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*.
- Evaluar la digestión enzimática que genere más diferencias entre las cepas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 BACTERIAS

Cepas de referencia : *M. tuberculosis* H37Rv , *M. vaccae*. (cepario Instituto de Investigaciones Biomédicas) bacilo Calmette & Guerin *M. bovis*-BCG cepa Danesa.

Se analizaron 17 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* procedentes del banco de cepas de RIVM (Instituto Nacional de Salud Pública de Holanda). Los aislados están clasificados en clades , esta clasificación esta realizada con base al polimorfismo que presentan los aislados al ser hibridados con la sonda IS6110. (Cuadro 1)

Se estudiaron 51 cepas de *Mycobacterium bovis* procedentes de cuatro Estados de la República Mexicana: 20 de Veracruz, 10 del Estado de México, 17 de Jalisco y 4 de Sonora (Cuadro 2).

Las cepas se sembraron por triplicado en el medio Middlebrook 7H11 agar (Difco Lab.) suplementado con ácido oléico, albúmina, dextrosa catalasa (OADC) (Difco Lab.) e incubadas a 37°C durante cuatro semanas (Payeur *et al* 1993).

4.2 EXTRACCIÓN DEL DNA MICOBACTERIANO

A la masa bacteriana transferida a un tubo de microcentrifuga se le adicionó 400 µl de TE 1x (0.01 M HCl-tris , 0.001 M EDTA pH 8.0) y se inactivó a 80°C durante 20 minutos. Posteriormente, se le agregó 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó a 37°C durante una hora. Al cabo de la cual se le agregó 70 µl de sulfato dodecyl de sodio al 10% (SDS), 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml) y se

incubó a 65°C durante 10 minutos. Después de lo cual se le adicionó 100 µl de NaCl 5 M y 100 µl de CTABNaCl (N-cetyl-N,N,N-trimethyl bromuro de amonio) precalentados a 65°C, los tubos se incubaron en agitación a 65°C por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 750 µl de cloroformo-alcohol isoamílico, y después de agitar durante 10 segundos, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm, durante 5 minutos, la fase acuosa fue transferida a otro tubo de microcentrifuga. El DNA se precipitó con 0.6 vol. (450 µl) de isopropanol durante 30 minutos a -20°C. La muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 minutos. Al pellet se le agregó 1ml de etanol frío al 70%, después centrifugar durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó dejando aproximadamente 20 µl de este con el pellet se centrifugó nuevamente durante 1 minuto, asegurandose de eliminar todo el sobrenadante para evitar que quedaran trazas de etanol. El pellet se secó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se resuspendió en 80 µl de agua milliQ estéril y se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

El DNA se visualizó en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, a partir del gel se determinó la concentración de DNA de cada muestra (Van-Soolingen *et al* 1991).

4.3 DIGESTIÓN DEL DNA MICOBACTERIANO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

3 µg de DNA de cada muestra fueron digeridos durante 1 hora a 37°C con 10 U/µl de la enzima *AluI*, *PvuII* y *SmaI*. Los fragmentos de DNA se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, durante 10 minutos a 3.2 V/cm (60 V) y 11 horas a 0.8 V/cm (25 V).

4.4 SOUTHERN BLOTTING

Los fragmentos de DNA se transfirieron a una membrana de nylon por capilaridad, mediante la técnica de Southern blotting. En esta técnica los fragmentos de DNA son transferidos del gel a una membrana de soporte por la fluidez de la solución de transferencia. El liquido corre a través del gel por capilaridad, la cual se establece por el hacinamiento de toallas de papel absorbentes. Antes de llevarse a cabo la técnica de Southern blot, el gel de agarosa con los fragmentos de DNA, se desnaturalizó exponiéndolo durante 5 minutos a la luz ultravioleta y tratándolo con HCl 0.25 M durante 10 minutos, seguido de la aplicación de una solución NaOH 0.4 M durante 20 minutos (anexo).

4.4.1 Prehibridación e hibridación de las membranas

Las membranas se prehibridaron e hibridaron con ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (Amersham Pharmacia Biotech). Las membranas fueron prehibridadas durante 2 horas a 42°C e hibridadas a 42°C durante toda la noche con la sonda, la cual se marco empleando el sistema de marcaje directo con la enzima peroxidasa de rabano HRP (anexo).

4.4.2 Lavados y revelado

Después de la hibridación la membrana se lavó en solución 5x SCC durante 5 minutos a 42°C, y se lavó por 10 minutos a 54°C dos veces mas por 5 minutos en la misma solución y a la misma temperatura. El revelado de la placa se llevó a cabo por la técnica manual de revelado fotográfico (anexo).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.5 SONDAS

Sonda IS6110: Se obtuvo a partir de la amplificación del DNA de *M. tuberculosis* H37Rv por PCR, con los iniciadores INS1 e INS2, que amplifican una región de 250 pb, de la secuencia de inserción IS6110 (anexo).

Sonda PE-PGRS81: Se obtuvo a partir de la amplificación del DNA de *M. tuberculosis* H37Rv por PCR, con los iniciadores PGRS1V y PGRS2RU, que amplifican una región de 235 pb de la secuencia PE-PGRS81 que corresponde a la región conservada (anexo).

Sonda Rv1759c (647 pb): se obtuvo a partir de la secuencia que está clonada en el plásmido pUC19. El DNA del plásmido se digirió con las enzimas de restricción *PvuII* y *BamHI* con lo que se obtuvo un producto de 647 pb que corresponde a la región conservada de la secuencia de la Rv1759c (anexo).

La sonda Rv1759c (3.9 Kb): se obtuvo a partir de la secuencia que está clonada en el plásmido pUC19. El DNA del plásmido se digirió con la enzima *Sall*, con lo que se obtiene un producto de 3.9 Kb, que corresponde a la secuencia Rv1759c (anexo).

Los productos de amplificación de IS6110 (250 pb), PGRS81 (235 pb) y los productos de la digestión enzimática de la Rv1759c (647pb) y Rv1759c (3.9Kb), se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % (anexo).

Los productos se cortaron del gel de agarosa y fueron purificados con el sistema QIAquick gel extraction kit (QIAGEN).

Los resultados se analizaron de la siguiente forma: para la evaluación de los marcadores genéticos el análisis se llevó a cabo de manera visual con el empleo de un negatoscopio y un lente de aumento. Para agrupar y clasificar los aislados por su patrón polimórfico, los datos se analizaron con el programa Diversity Database (BIO-RAD).

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS: Rv1759c DE 3.9 Kb, Rv1759c DE 647 pb Y PE-PGRS81 DE 235 pb

5.1.1 Aislados de *M. tuberculosis*

DNA digerido con *PvuII*.

Con la secuencia Rv1759c de 3.9 Kb y la PE-PGRS81 de 235 pb se observó un patrón complejo polimórfico en el que se reconocieron alrededor de 26 bandas (Figuras 1 y 2). La secuencia Rv1759c de 647 pb hibridó preferencialmente con dos fragmentos de 3.5 y de 2.0 Kb. Los patrones generados con esta secuencia permiten establecer diferencias entre las cepas estudiadas (Figura 1).

DNA digerido con *SmaI*.

Con la secuencia RV1759c de 3.9 Kb se observó un patrón complejo polimórfico en el que se reconocieron alrededor de 26 bandas. Al hibridar con la secuencia Rv1759c de 647 pb se observaron diferencias entre los aislados clínicos a nivel de las bandas de 1.9 y 0.950 kb (Figura 3). El patrón observado con la PE-PGRS81 de 235 pb difirió notablemente de los anteriores, ya que se reconocieron 18 bandas. Se observaron diferencias entre los aislados clínicos (Figura 4).

DNA digerido con *AclI*.

Con la secuencia Rv1759c de 3.9 Kb, Rv1759c de 647 pb y PE-PGRS81 de 235 pb se observó un patrón complejo polimórfico en el que se reconocieron alrededor 26 bandas (Figuras 5 y 6).

5.1.2 Aislados de *M. bovis*.

DNA digerido con *PvuII*.

Con la secuencia Rv1759c de 3.9 Kb se observó un patrón complejo polimórfico en el que se reconocieron alrededor de 26 bandas. Se observaron pequeñas diferencias entre los aislados (Figura 7). Al hibridar con la secuencia Rv1759c de 647 pb, se reconocieron dos bandas de 3.5 y 2.0 Kb, que se encontraron en todos los casos (Figura 7). La secuencia PE-PGRS81 de 235 pb mostró un patrón polimórfico muy similar entre los aislados, donde esta secuencia hibridó principalmente con una banda de 3.5 Kb (Figura 8).

DNA digerido con *SmaI*.

La secuencia Rv1759c de 3.9 Kb y Rv1759c de 647 pb mostraron un patrón complejo polimórfico en el que se reconocieron alrededor de 26 bandas (Figura 9). Al hibridar con la secuencia PE-PGRS81 235 pb se encontró un patrón polimórfico de 18 bandas, se observaron diferencias entre los aislados (Figura 10).

DNA digerido con *AluI*.

Las tres secuencias mostraron un patrón polimórfico complejo, donde se reconocieron más de 26 bandas (Figuras 11 y 12).

Con base a los resultados anteriores se seleccionó la digestión del DNA con *SmaI* y como marcador genético a la secuencia conservada de la PE-PGRS81 de 235 pb, para agrupar las cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis*. El análisis de los patrones polimórficos se llevó cabo con el programa Diversity Database.

5.2 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *M. tuberculosis*

5.2.1 Patrón Polimórfico presentado con el marcador PE-PGRS81 de 235 pb -/ DNA digerido con **SmaI**.

Se mostró un patrón formado por 18 bandas, la diferencia entre los aislados se estableció principalmente por la ausencia de cinco a siete bandas en distintas posiciones. Algunas cepas presentaron de 11 a 18 bandas. Las diferencias más notables entre las cepas se observaron en las bandas que se encuentran entre 2.0 y 3.5 Kb, así como también en las bandas 1.5, 1.3 y 0.830 Kb (Figura 13). En tres aislados se observó un patrón de 16 bandas, tres presentaron 18 bandas, dos con 17 bandas, dos con 15 bandas, dos con 14 bandas, dos con 13 bandas, dos con 12 bandas y un aislado presentó 11 bandas. Se distinguieron 13 patrones polimórficos, los cuales al integrarlos dentro de un dendrograma formaron cuatro clusters (Figura 14).

5.3 CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *M. bovis* DE DIFERENTES ÁREAS GEOGRÁFICAS DE LA REPÚBLICA MEXICANA.

5.3.1 Patrón Polimórfico presentado con el marcador IS6110 / DNA digerido con **PvuII**.

Veintinueve de los aislados (57%) mostraron un patrón de una banda de 1.9 Kb, ocho aislados (15.7%) presentaron una banda de 4 Kb, cinco aislados (9.8%) con una banda de 1.7 Kb, tres (5.8%) con dos bandas de 1.9 y 2.5 Kb, dos (3.9%) con 2 bandas 1.9 y 4 Kb. Un aislado (1.9%) con 2 bandas de 1.7 y 1.3 Kb, un aislado (1.9%) con tres bandas de 1.9, 2.5 y 3.5 Kb y dos aislados (3.9%) con 6 bandas que difieren entre sí por la posición entre las bandas. En los aislados pertenecientes al Estado de Veracruz se observaron siete patrones polimórficos, en los de Jalisco cinco, en el Estado de México tres y en

Sonora uno (Figuras 15, 16 y 17). Se distinguieron un total de nueve patrones polimórficos, los cuales al ser integrados en un dendrograma muestran que la mayoría de las cepas quedan agrupadas en el mismo cluster (Figura 18).

5.3.2 Patrón Polimórfico presentado con el marcador PE-PGRS81 235 pb / DNA digerido con **SmaI**.

Se observó un patrón formado por 18 bandas, la diferencia entre los aislados es la ausencia de cinco a siete bandas en distinta posición, existen aislados que presentan de 11 a 16 bandas, las diferencias más notables entre las cepas se observaron en las bandas que se encuentran entre 2.0 y 3.0 Kb, la mayoría de las cepas no presenta una banda de 1.0 Kb, además de que existen cepas que carecen de las bandas menores a 0.947 Kb. En 21 aislados (41.1%) se observó un patrón de 14 bandas, 13 aislados (25.4%) con 13 bandas, en 6 aislados (11.7%) se observaron 15 bandas, 6 (11.7%) con 12 bandas y en 5 (9.8%) con 11 bandas. En los aislados pertenecientes al Estado de Veracruz se observaron 16 patrones polimórficos, en Jalisco 15, en el Estado de México tres y en Sonora dos (Figuras 19,20 y 21). Se distinguieron un total de 36 patrones polimórficos, los cuales al ser agrupados en un dendrograma formaron 12 clusters, lo cual permitió hacer la diferenciación entre las cepas por estados ya que estas quedan integradas en distintos clusters (Figura 22).

6. DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que en el 57% de las cepas de *M. bovis* analizadas por RFLP / IS6110 / *PvuII* portan una banda de 1.9 kb, la cual ha sido descrita por Ross *et al* (1992), Collins *et al* (1994), Van-Soolingen *et al* (1991), Plikaytais *et al* (1991), Hatfull *et al* (2000), Ratledge (1999) y Romano *et al* (1996). Estos autores coinciden en que la mayoría de las cepas de *M. bovis* de origen bovino solo presentan una copia de la IS6110; sin embargo, en este estudio el 17.5% de cepas presentaron de 2 a 6 bandas, lo cual coincide con lo descrito por Liébana *et al* (1997) quienes demostraron que el 50% de las cepas de *M. bovis* de origen bovino en España presentaron hasta cinco copias de la IS6110. De igual manera, en estudios realizados en Irlanda se demostró que las cepas de *M. bovis* de origen bovino presentaron varias copias de este marcador (Collins *et al* 1994). En otro estudio realizado por Perumaalla *et al* (1996) se analizaron las cepas de *M. bovis* de Texas y México por RFLP empleando como marcador la IS6110, sus resultados coinciden con los del presente trabajo, ya que demostraron la existencia del 18 % de cepas de *M. bovis* de origen bovino que presentan copias múltiples de la IS6110, mencionando además que la transmisión de la enfermedad podría estar dada por animales silvestres. Este último punto, aunque no se estudió en este trabajo, se considera de importancia para futuras investigaciones.

Cabe mencionar que las cepas de *M. bovis* con copias múltiples de IS6110 que fueron analizadas por la técnica de Spoligotyping mostraron la ausencia de los espaciadores 39-43 (datos no incluidos), esto es una característica de las cepas de *M. bovis* que nos permite diferenciarlas de las cepas de *M. tuberculosis*, como ha sido mencionado por otros autores (Kamerbeek *et al* 1997, Aranaz *et al* 1996 y Blázquez *et al* 1997). Con estas observaciones se descartó la posibilidad de que las cepas de *M. bovis* correspondieran a *M. tuberculosis* de bajo número de copias de IS6110.

En este estudio se observó además que al emplear un sólo marcador genético (IS6110) no es suficiente para agrupar las cepas, ya que la mayoría presentó una sola banda. Esta observación ha sido también mencionada por Ross *et al* (1992), Collins *et al* (1994), Van-Soolingen *et al* (1991), Plikaytais *et al* (1991), Hatfull *et al* (2000), Ratledge (1999), Romano *et al* (1996) y Cousins *et al* (1993).

Con el fin de buscar nuevas alternativas para la tipificación a nivel molecular de *M. bovis*, se evaluaron los marcadores genéticos derivados de dos secuencias de PGRS: PE-PGRS81 de 235 pb, Rv1759c de 3.9 Kb y de 647 pb, con el DNA de los aislados digeridos con *AluI*, los resultados obtenidos nos permitieron observar un patrón polimórfico complejo de más de 26 bandas. Estos resultados concuerdan con los descritos por Skuce *et al* (1994), Collins *et al* (1993), Cousins *et al* (1993), Van-Sollingen *et al* (1994), Romano *et al* (1996), Ross *et al* (1992) y Bigi *et al* (1995). Estos autores al emplear el RFLP/PGRS (pTBN12, pTB233 y pMBA2)/*AluI*, mencionan que este sistema ofrece un buen grado de diferenciación entre las cepas, por lo que consideran que puede ser el método de elección cuando se requiere de una máxima diferenciación entre las cepas que presentan escaso número de copias de la IS6110.

El genoma de *M. bovis* y *M. tuberculosis* presenta varios sitios de restricción para la enzima *AluI*, por lo que cada vez que se digiera con esta enzima, se generara un gran número de fragmentos, lo que incrementa el potencial de diferenciación entre las cepas, sin embargo uno de los principales problemas que presentó la digestión con la enzima *AluI* fue el gran número de fragmentos generados que son hibridados con distinta intensidad y hacen difícil la interpretación de los datos. El empleo de un programa de computadora para analizar estas imágenes facilitó la interpretación de los resultados obtenidos. Estos resultados remarcaron la importancia de elegir la mejor combinación de marcador genético y enzima, que genere un número de bandas considerable que permita una fácil interpretación de los resultados.

En el presente trabajo se pudo observar que la enzima *SmaI* y la sonda PE-PGRS81 de 235 pb fueron la mejor combinación, ya que se pudieron observar diferencias que permitieron clasificar a las cepas con base al patrón polimórfico

en distintos grupos. El número máximo de bandas que se detectaron fue de 18 y las principales diferencias entre las cepas se visualizaron en las bandas de 2 a 3.5 Kb. Un hallazgo interesante observado con esta combinación fue una banda de diferencia a la altura de 1 Kb que la mayoría de las cepas de *M. bovis* no presentan, en comparación con las cepas de *M. tuberculosis* que sí la portan. Estos resultados pueden deberse a que el genoma micobacteriano, presenta un menor número de sitios de restricción para la enzima *Sma*I. Al analizar el mapa de restricción de la PGRS81, esta secuencia presenta dos sitios de restricción para *Sma*I, por lo que sólo tres fragmentos de la PGRS81 se generaran cada vez que se digiera con esta enzima. Por lo tanto el patrón polimórfico generado es menos complejo y permite tener una mejor diferenciación genética entre los aislados en comparación con el generado con la enzima *Alu*I. También fue importante utilizar un fragmento de 235 pb que corresponde a la región conservada (N-terminal) de la secuencia PGRS81, porque nos permitió establecer que esta región tiene una participación importante en el polimorfismo de los diferentes aislados.

Los aislados de *M. tuberculosis* que se emplearon en el presente estudio, al pertenecer a una colección internacional de cepas ya estaban clasificadas en clades con base al patrón polimórfico presentado con la secuencia IS6110. Por lo que solo se evaluaron con las PGRS, cabe señalar que cuatro de estos aislados presentaban un patrón de menos de cinco bandas de IS6110 por lo que no estaban integrados a ninguna clade y al evaluarlos por RFLP/ PE-PGRS81/*Sma*I, se visualizó un patrón polimórfico de 13 a 15 bandas para estos aislados lo que permitió el poder agruparlos y establecer una relación con los otros aislados de *M. tuberculosis*.

No obstante la utilidad del Spoligotyping para diferenciar entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, su uso en estudios de tipificación se ha visto limitado. Recientemente Milián *et al* (2000) demostraron una amplia diversidad genética entre los aislados de *M. bovis* de diferentes Estados de la República Mexicana con esta técnica, lo cual impidió que las cepas pudieran ser agrupadas por regiones.

En el presente estudio, la utilización de RFLP / PE-PGRS81 de 235 pb / *Sma*I nos permitió conocer el patrón polimórfico de las cepas de estudio provenientes de diferentes áreas de la República. Por otra parte esta secuencia marcó patrones polimórficos que permitieron determinar la relación que tienen entre si las distintas cepas de *M. bovis* por regiones geográficas.

Así mismo, este método confirmó la amplia diversidad genética mencionada por Milián *et al* y respaldo lo descrito por Espitia *et al*, que mencionan que el variado repertorio de PGRS que pueden tener los aislados incrementa la diversidad genética de estos y hace a las secuencias altamente polimórficas.

La hipótesis del presente trabajo se comprobó al utilizar el marcador genético PE-PGRS81 de 235 pb, el cual permitió agrupar y clasificar las diferentes cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* confirmando la variabilidad genética sugerida.

En el presente estudio al evaluar las distintas cepas por RFLP /PE-PGRS81 235 pb / *Sma*I, se establece que este es un sistema que reúne las características descritas por Maslow *et al* (1993), Ratledge *et al* (1999) y Hunter (1990), quienes mencionan que un sistema de tipificación debe ser tipificable, reproducible y discriminativo. Con el empleo de estos dos elementos, fue posible visualizar un número de bandas considerable, en donde las diferencias en la posición de las mismas, permitieron formar diferentes grupos con las cepas. Con esto se demostró el poder de discriminación que posee el sistema. Por otro lado, la reproducibilidad se comprobó con los controles H37Rv, BCG y *M. vaccae*, los cuales fueron probados en siete ocasiones y siempre presentaron el mismo patrón polimórfico. Además, todas las muestras que fueron evaluadas con este marcador siempre tuvieron una interpretación que permitió el poder clasificarlas, lo que hace al sistema tipificable.

Por lo descrito anteriormente se considera que RFLP/PE-PGRS81 235 pb/*Sma*I puede ser un sistema alternativo para el análisis de los aislados de *M. tuberculosis* que presentan menos de cinco copias de IS6110 y para las cepas de *M. bovis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, manifestaron la importancia de la aplicación de la técnica de tipificación molecular RFLP empleando como sonda a la secuencia PE-PGRS81 de 235 pb y a la enzima **SmaI**. Esta técnica, junto con los métodos epidemiológicos convencionales empleados en el estudio de la tuberculosis, tanto en humanos como en el ganado, podría ser una alternativa que permita obtener información sobre aspectos de la transmisión y la dinámica del agente patógeno dentro de una población. En conjunto, esta metodología contribuirá al establecimiento de nuevas estrategias para el control de la enfermedad.

7. CONCLUSIONES

La mayoría de las cepas de *M. bovis* analizadas mostraron el patrón polimórfico descrito para la IS6110, por lo que se necesita otro marcador genético que tenga mayor poder de discriminación.

Las diferencias más importantes entre los aislados se determinaron al emplear como sonda a la PE-PGRS81 de 235 pb y digerir el DNA con la enzima *Sma*I.

Se considera que la PE-PGRS81 de 235 pb y la enzima *Sma*I podrían tener un uso potencial en estudios de epidemiología molecular de *M. tuberculosis* que presentan menos de cinco copias de IS6110 y de las cepas de *M. bovis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8. CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Cepas de referencia y Aislados clínicos de *M. tuberculosis* empleados en el estudio.

Cepas de referencia	Origen	Cepas de <i>M. tuberculosis</i> **	Clade
H37Rv <i>M. tuberculosis</i>	ATCC* ¹ 27294	1911	1
BCG <i>M. bovis</i>	Cepa Danesa	1291	1
<i>M. vaccae</i>	ATCC* ¹ 27290	116	1
	ATCC* ¹ 15483	1000	5
		1377	5
		844	31
		2142	31
		368	31
		1463	12
		1746	12
		1741	57
		1171	15
		229	15
		IN4	S/C***
		046 Cannedi	S/C***
		410	S/C***
	642	S/C***	

1 Cepario del Instituto de Investigaciones Biomedicas- UNAM.

*American Type Culture Collection.

*** Aislados provenientes del Cepario Internacional del Instituto de Salud Pública de Holanda.

*** Sin Clade

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2 Cepas de *M. bovis* utilizadas en el estudio.

VERACRUZ	JALISCO	EDO. DE MÉXICO	SONORA
No. de identif.	Origen	No. de Identif.	Origen
00-35	Minatitlán	00-11	Zapopán
00-43	Panuco	00-12	Zopapán
00-85	Tuxtepec	00-13	Tlaquepaque
00-60	Paso de ovejas	00-14	Zapotlanejo
99-244	Tamalin	00-16	Cocula
99-17	Chinameca	00-17	Tepatitlán
99-242	Tamalin	00-18	Tepatitlán
99-268	Playa Vicente	00-19	Guadalajara
99-264	Playa Vicente	00-20	San Julián
99-251	Tamalin	00-21	San Julián
99-248	Tamalin	00-22	Poncitlán
99-217	Tuxpan	00-23	Tlaquepaque
99-218	Sayula de Alemán	00-24	San Miguel el Alto
99-49	Tres valles	00-25	Etzatlán
99-274	Veracruz	00-26	San Miguel el Alto
99-51	Panuco	00-27	San Juan de los Lagos
99-149	Ahuatepec	00-29	Acatic
00-73	Acayucan		
00-83	Minatitlán		
99-292	Coatzacoalcos		

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PM

A

B

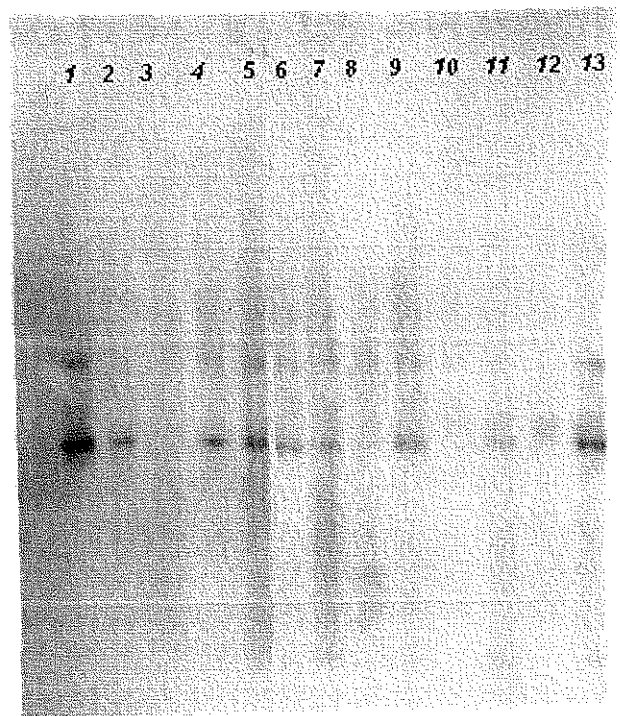
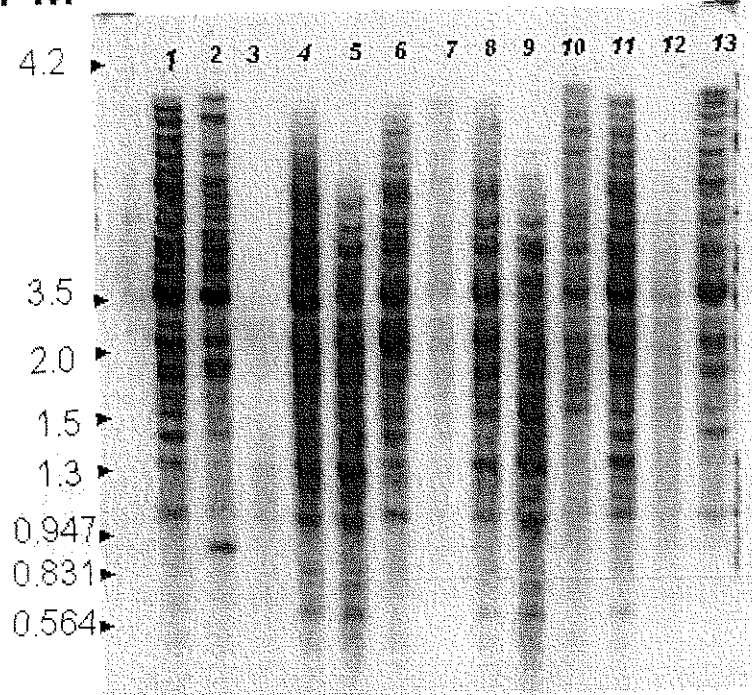


Figura 1: RFLP del DNA de las cepas de *M. tuberculosis* digeridas con *Pvu II*.
PM : DNA Lambda / *EcoRI*-*Hind III*. Sondas A) *Rv1759c* 3.9 Kb B) *Rv1759c* 647 pb.
Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 1463 5) 1764 6) 1377 7) 1000 8) 2142
9) 844 10) 046 11) 116 12) IN4 13) 1171

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PM

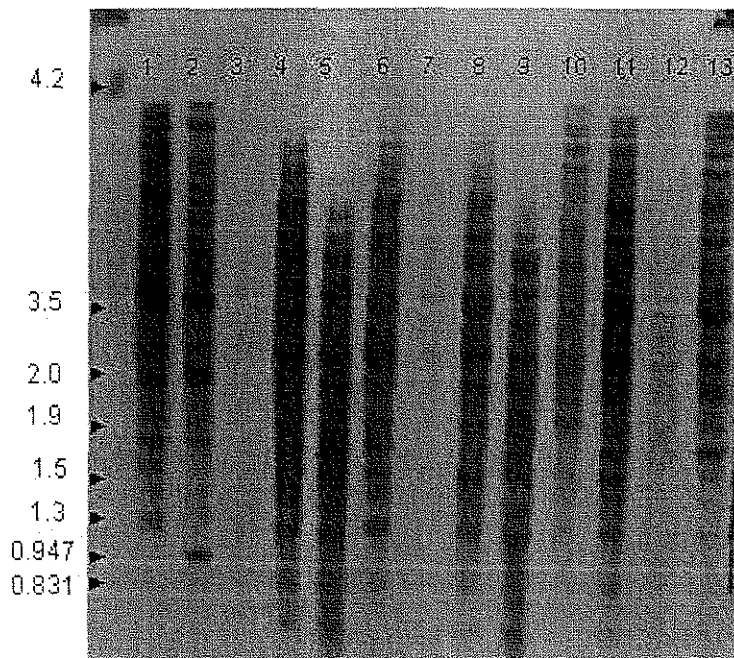


Figura 2: RFLP del DNA de las cepas de *M. tuberculosis* digeridas con *Pvu II*.
PM : DNA Lambda / *EcoRI*--*Hind III*. Sonda PE-PGRS81 235 pb.
Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 1463 5) 1764 6) 1377 7) 1000
8) 2142 9) 844 10) 046 11) 116 12) IN4 13) 1171

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PM

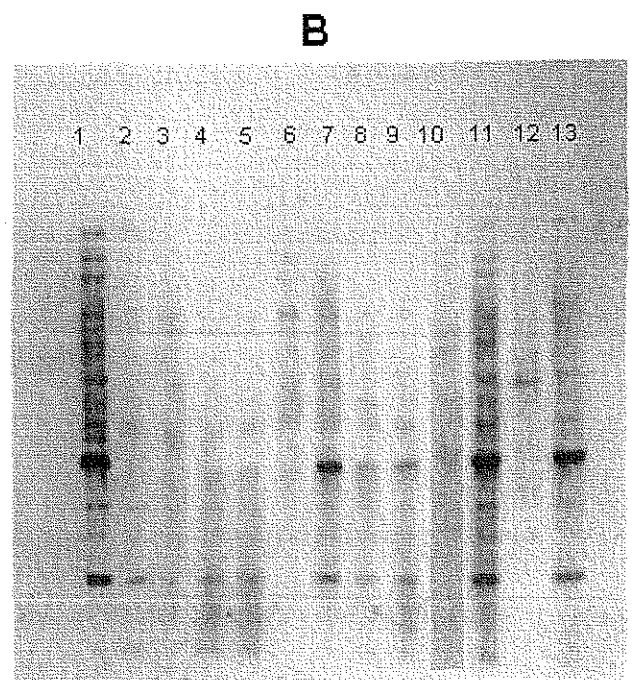
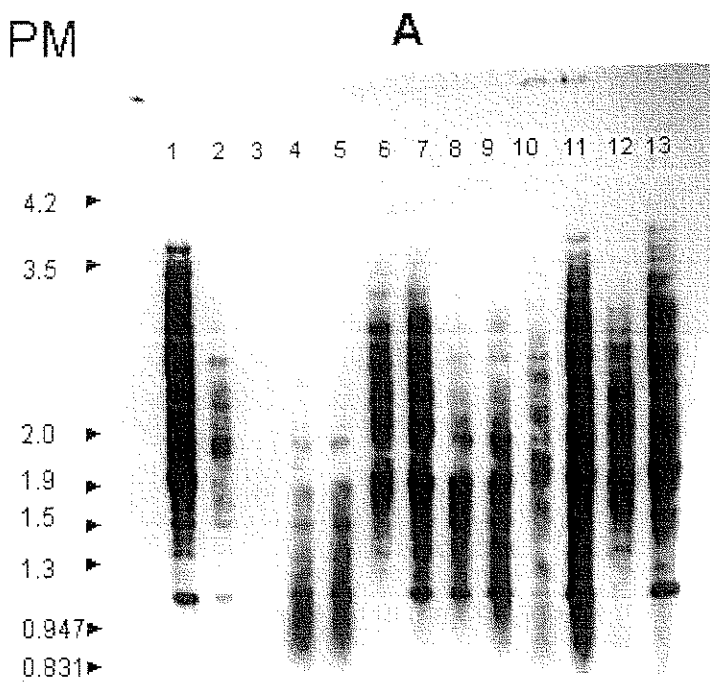


Figura 3: RFLP del DNA de las cepas de *M. tuberculosis* digeridas con *Sma* I.
PM : DNA Lambda / *Eco*RI--*Hind* III. Sondas A) *Rv1759c*. 3.9 Kb B) *Rv1759c* 647 pb.
Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 1463 5) 1764 6) 1377 7) 1000 8) 2142
9) 844 10) 046 11) 116 12) IN4 13) 1171

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

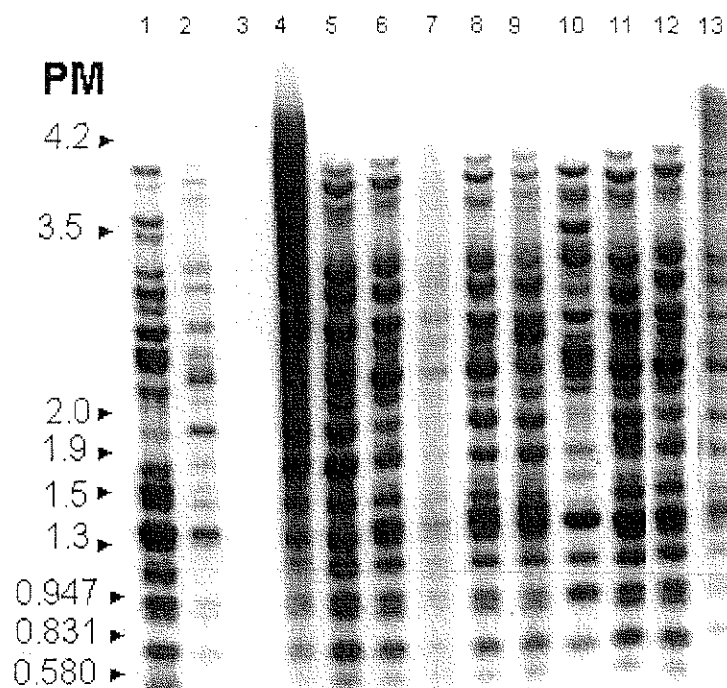


Figura 4: RFLP del DNA de las cepas de *M. tuberculosis* digeridas con *Sma I*
 PM : DNA Lambda / *EcoRI*-*Hind III*. Sonda PE-PGRS81 235 pb.
 Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 1463 5) 1764 6) 1377 7) 1000
 8) 2142 9) 844 10) 046 11) 116 12) IN4 13) 1171

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

PM

A

B

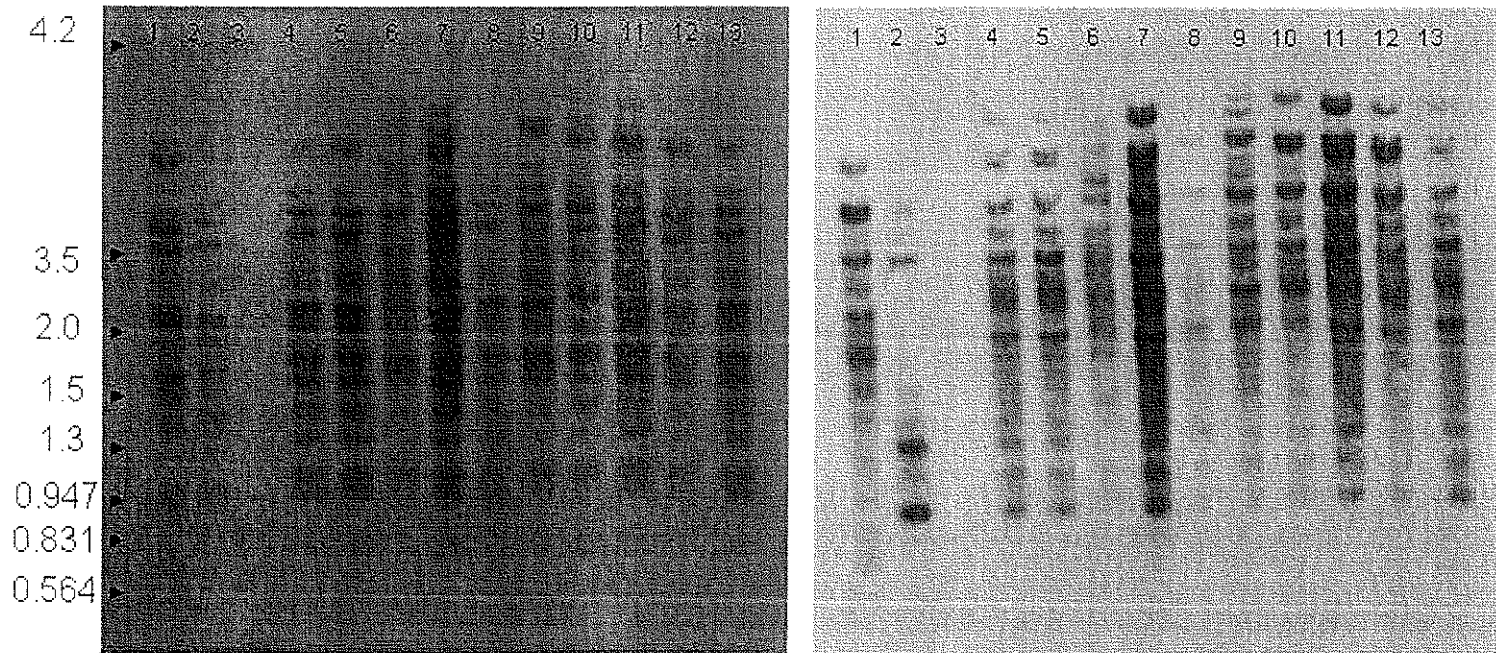


Figura 5: RFLP del DNA de las cepas de *M. tuberculosis* digeridas con *Alu I*.
PM : DNA Lambda / *EcoRI*-*Hind III*. Sondas A) *Rv1759c*. B) *Rv1759c* 647 pb.
Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 1463 5) 1764 6) 1377 7) 1000 8) 2142
9) 844 10) 046 11) 116 12) IN4 13) 1171

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PM

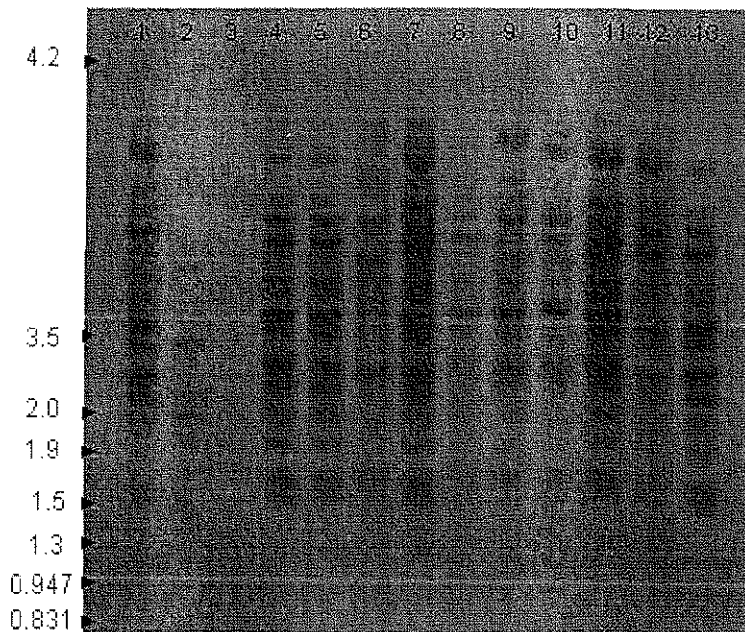


Figura 6: RFLP del DNA de las cepas de *M. tuberculosis* digeridas con *Alu I*.
PM : DNA Lambda / *EcoRI*-*Hind III*. Sonda PE-PGRS81 235 pb.
Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 1463 5) 1764 6) 1377 7) 1000 8) 2142
9) 844 10) 046 11) 116 12) IN4 13) 1171

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

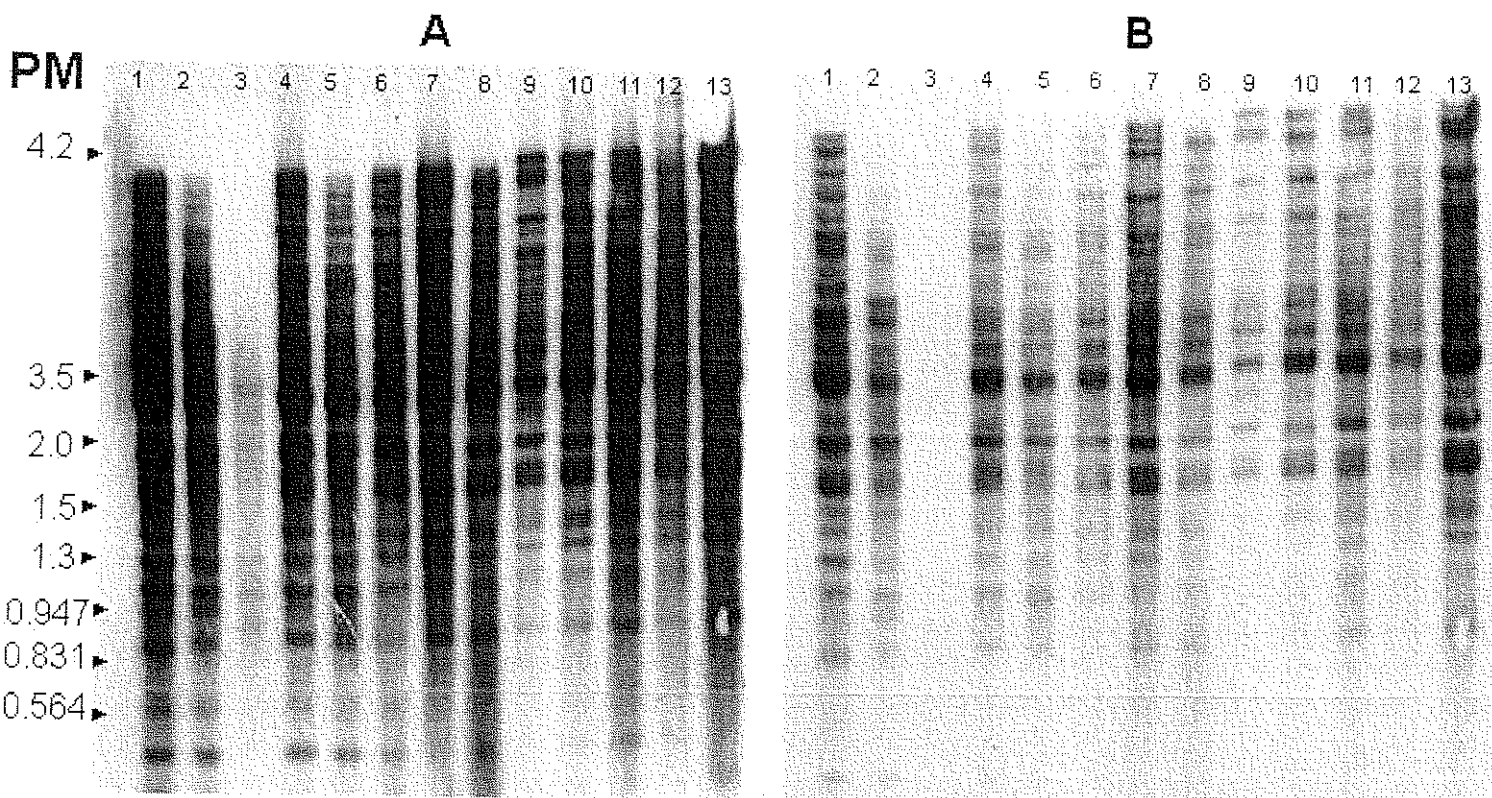


Figura 7: RFLP del DNA de las cepas de *M. bovis* digeridas con *Pvu II*.
 PM : DNA Lambda / *EcoRI*--*Hind III*. Sondas A) *Rv1759c* 3.9 Kb. B) *Rv1759c* 647 pb.
 Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 9-244 5) 9-268 6) 0-60 7) 9-242 8) 0-35
 9) 0-85 10) 9-17 11) 9-251 12) 9-264 13) 9-43

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

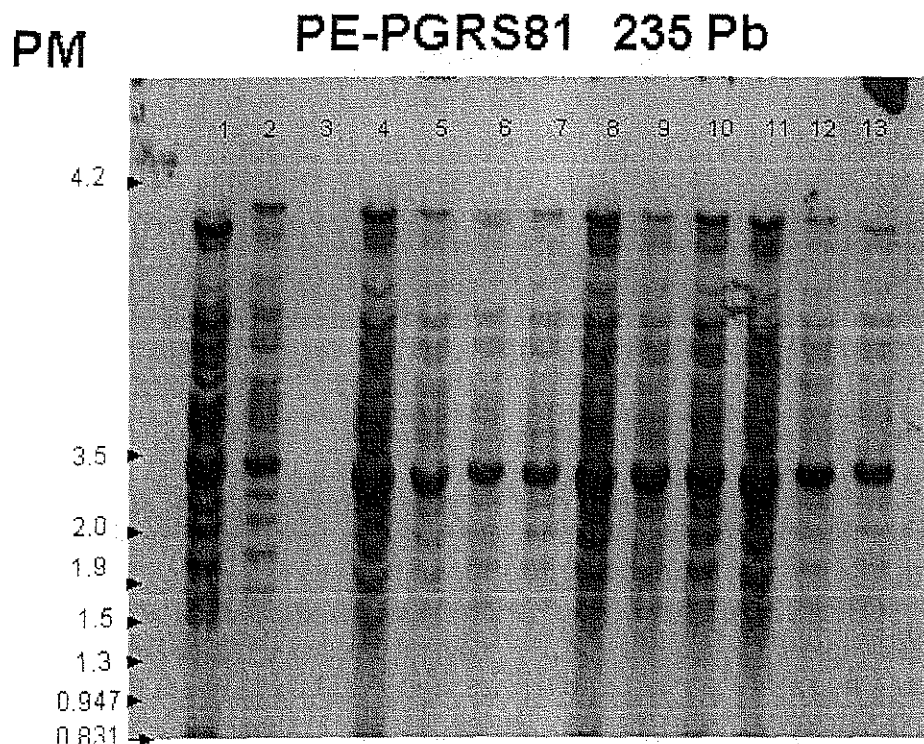


Figura 8: RFLP del DNA de las cepas de *M. bovis* digeridas con *Pvu* II. PM : DNA Lambda / *Eco*RI--*Hind* III. Sonda PE-PGRS81 235 pb. Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 9-244 5) 9-268 6) 0-60 7) 9-242 8) 0-35 9) 0-85 10) 9-17 11) 9-251 12) 9-264 13) 9-43

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

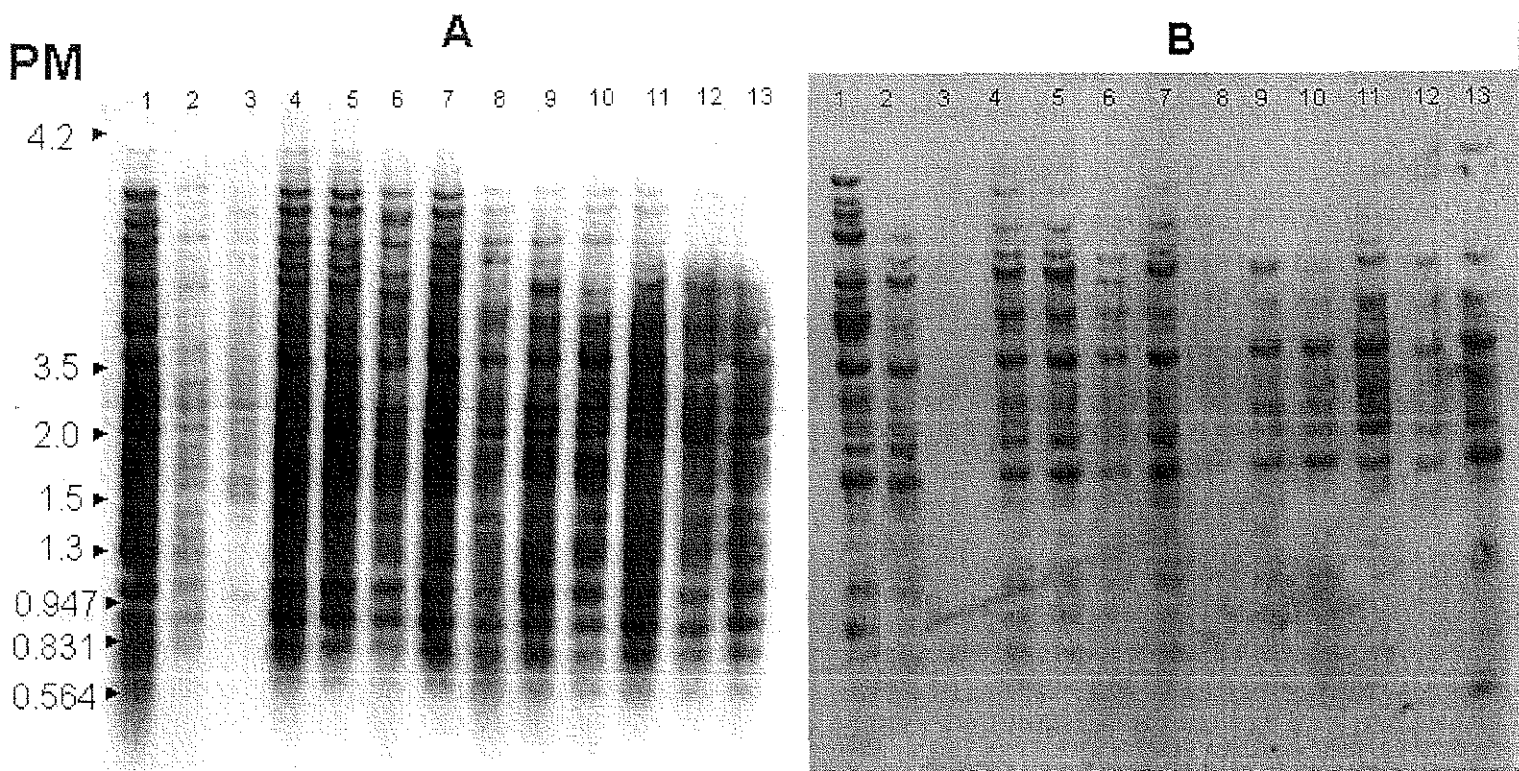


Figura 9: RFLP del DNA de las cepas de *M. bovis* digeridas con *Sma* I.
 PM : DNA Lambda / *Eco*RI--*Hind* III. Sondas A) *Rv1759c* 3.9 Kb. B) *Rv1759c* 647 pb.
 Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 9-244 5) 9-268 6) 0-60 7) 9-242 8) 0-35
 9) 0-85 10) 9-17 11) 9-251 12) 9-264 13) 9-43

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

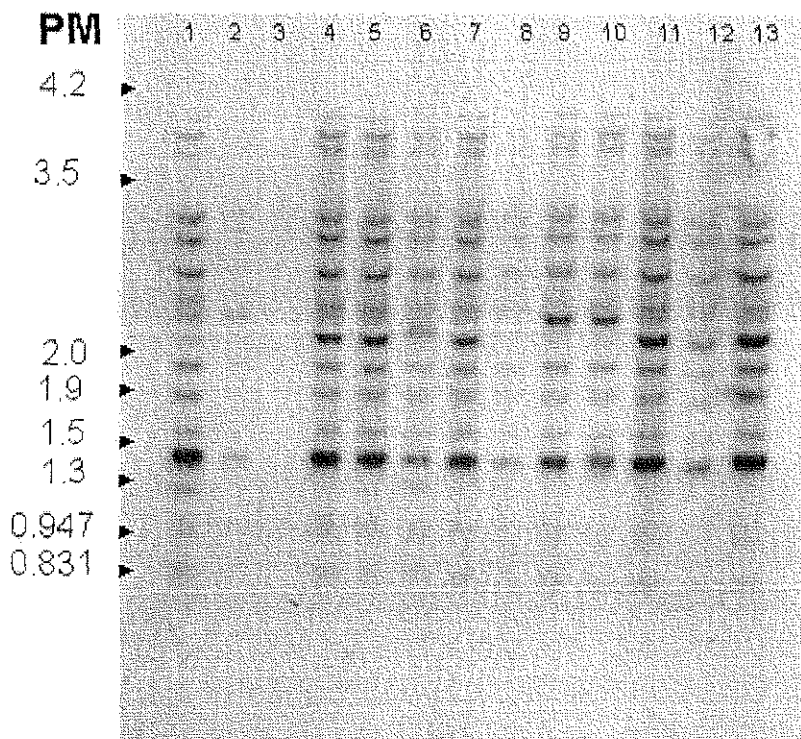


Figura 10: RFLP del DNA de las cepas de *M. bovis* digeridas con *Sma* I. PM : DNA Lambda / *Eco*RI--*Hind* III. Sonda PE-PGRS81 235 pb. Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 9-244 5) 9-268 6) 0-60 7) 9-242 8) 0-35 9) 0-85 10) 9-17 11) 9-251 12) 9-264 13) 9-43

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

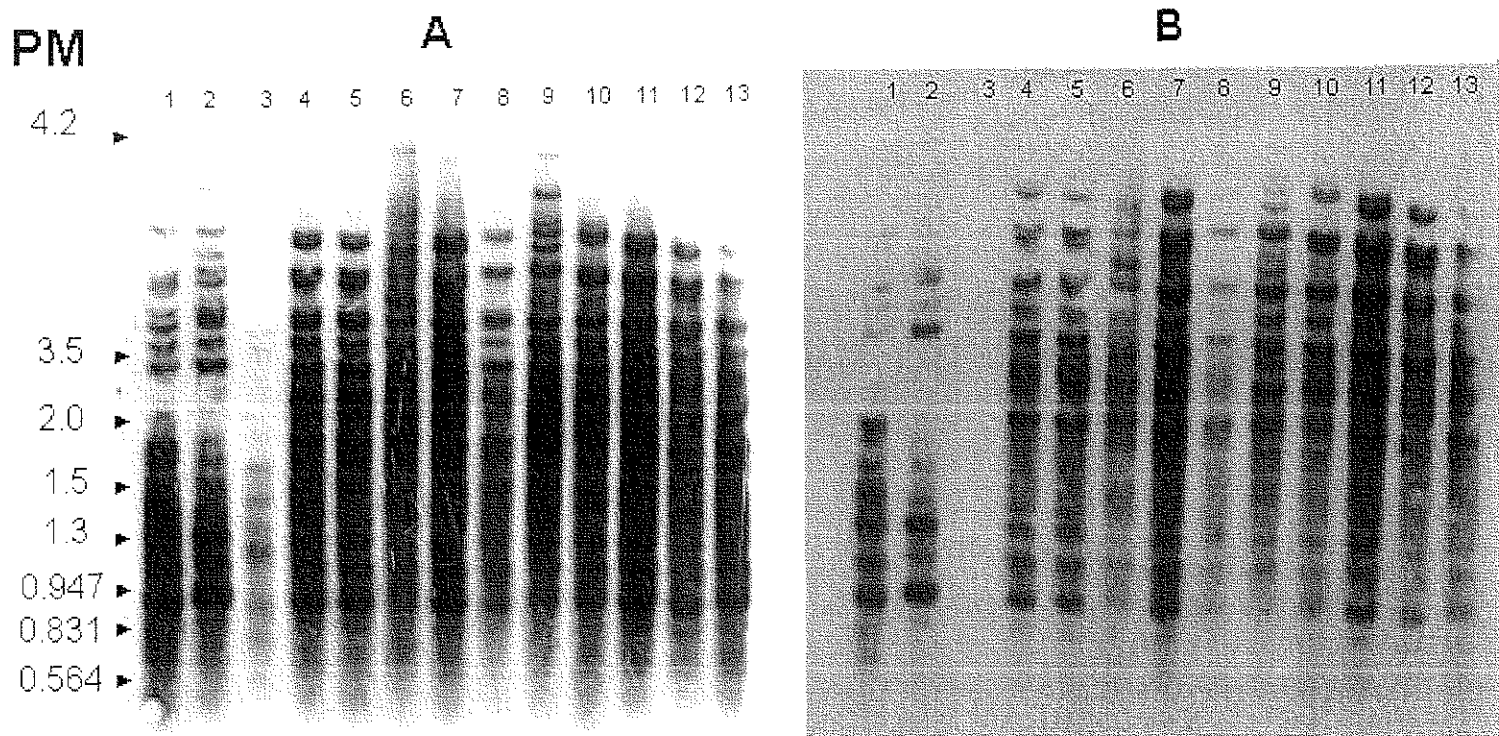


Figura 11: RFLP del DNA de las cepas de *M. bovis* digeridas con *Alu I*.
 PM : DNA Lambda / EcoRI-Hind III. Sondas A) Rv1759c 3.9 Kb. B) Rv1759c 647 pb.
 Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 9-244 5) 9-268 6) 0-60 7) 9-242 8) 0-35
 9) 0-85 10) 9-17 11) 9-251 12) 9-264 13) 9-43

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

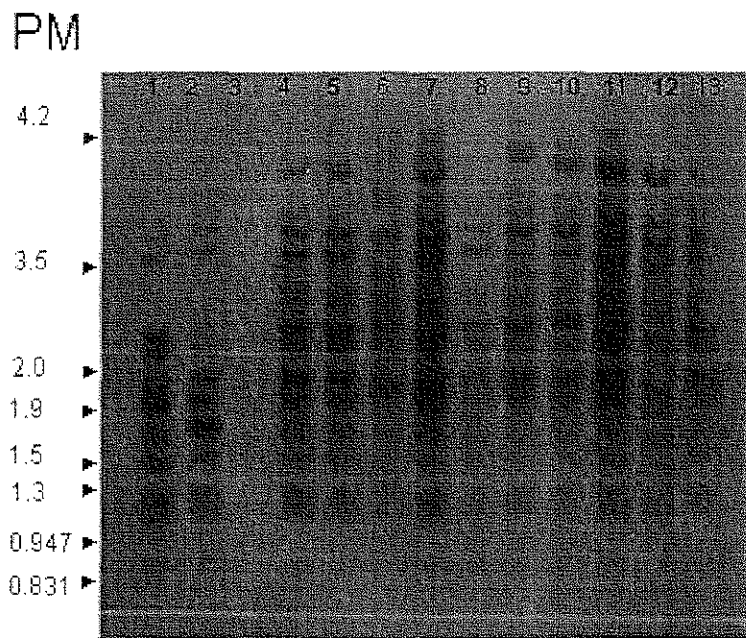


Figura 12: RFLP del DNA de las cepas de *M. bovis* digeridas con *Alu I*. PM : DNA Lambda / *EcoRI*-*Hind III*. Sonda PE-PGRS81 235 pb. Carril 1) H37Rv 2) BCG 3) *M. vaccae* 4) 9-244 5) 9-268 6) 0-60 7) 9-242 8) 0-35 9) 0-85 10) 9-17 11) 9-251 12) 9-264 13) 9-43

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

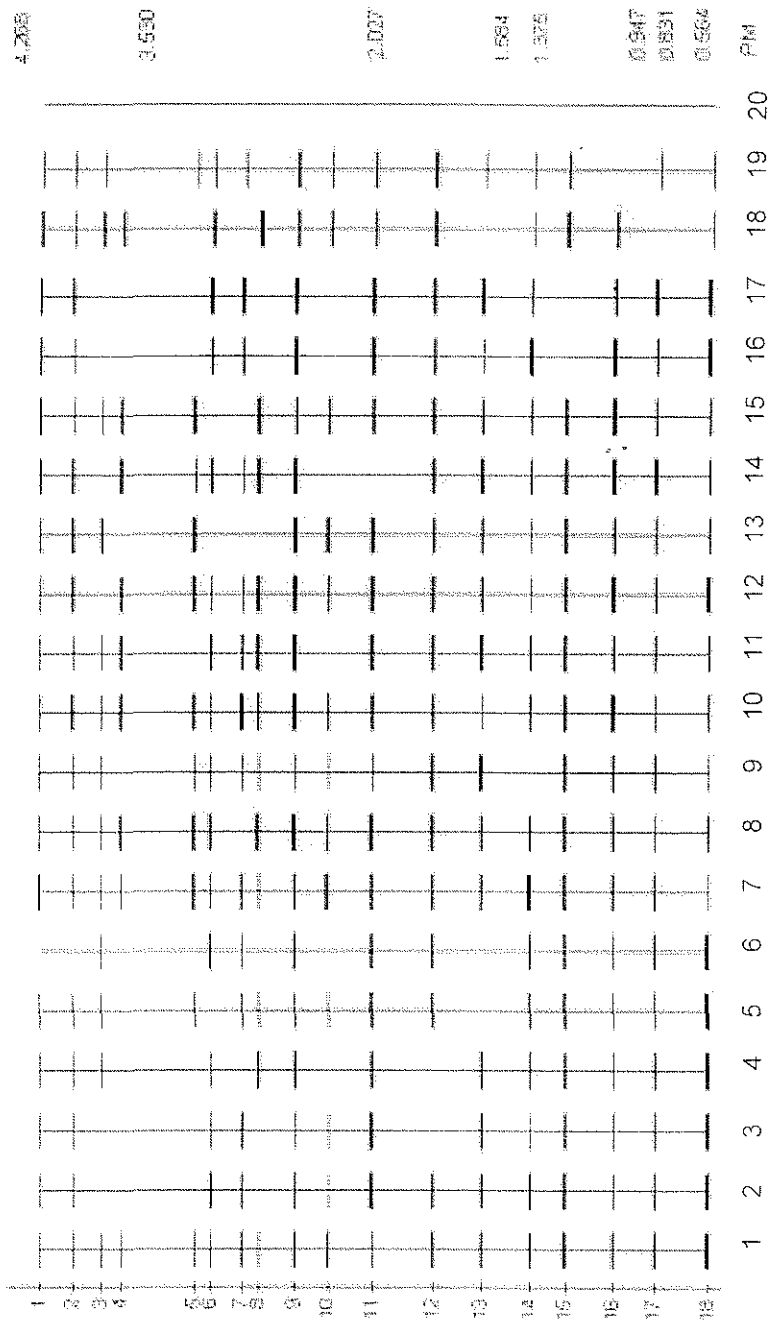


Figura 13 : Patrones polimórficos del RFLP DNA *Sma*I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. tuberculosis*. PM: DNA Lambda *Eco*RI-*Hind* III. Carril: 1) H37Rv 2) 410 3) 1911 4) IN4 5) 1291 6) 642 7) 229 8) 2142 9) 1463 10) 046 11) 116 12) 1377 13) 1000 14) 1764 15) 844 16) 1741 17) 368 18) 1171 19) BCG 20) *M. vaccae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

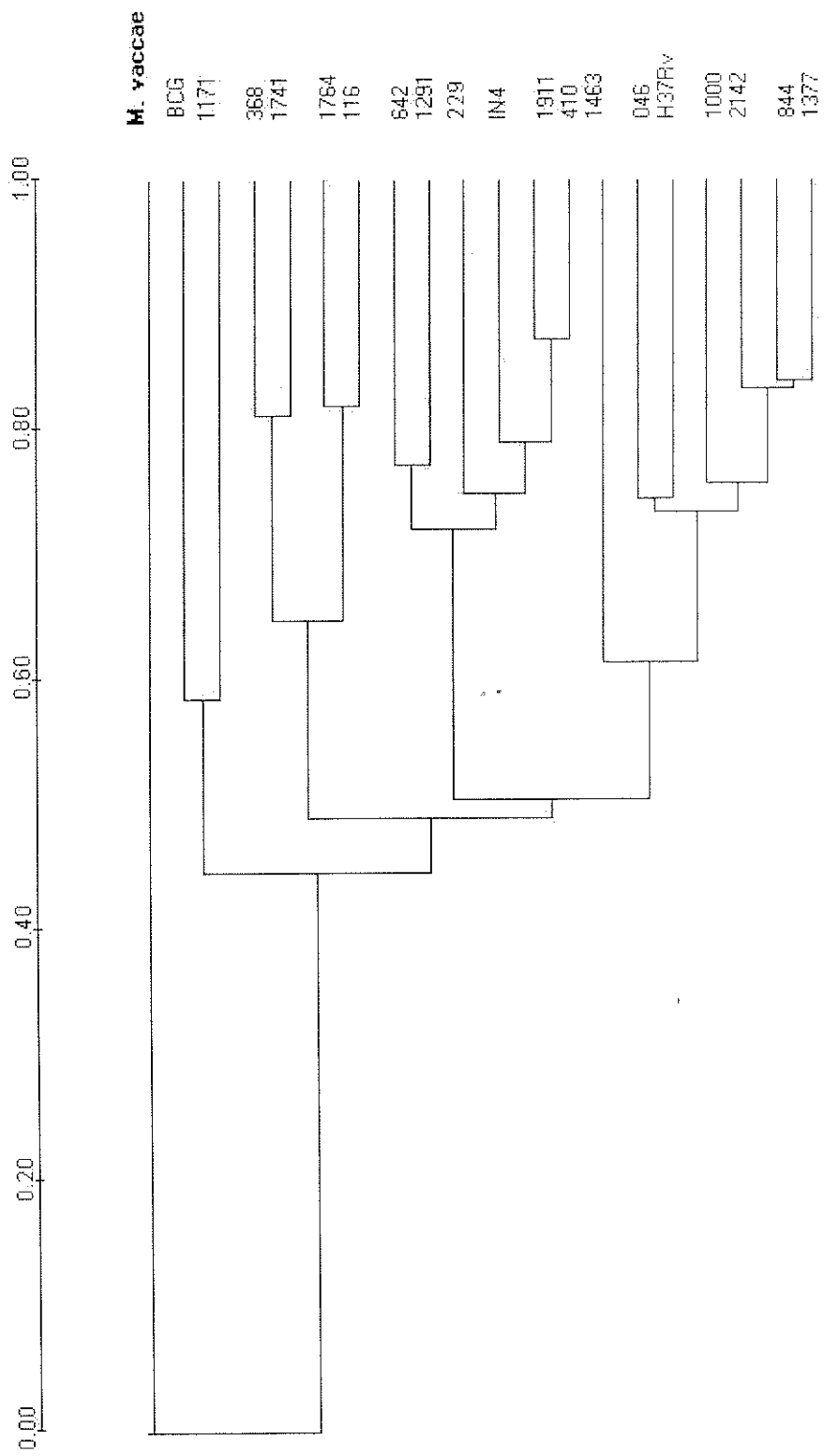


Figura 14 : Integración de los Patrones polimórficos DNA/SmaI/PE-PGRS81 de las cepas de *M. tuberculosis* en un dendrograma.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

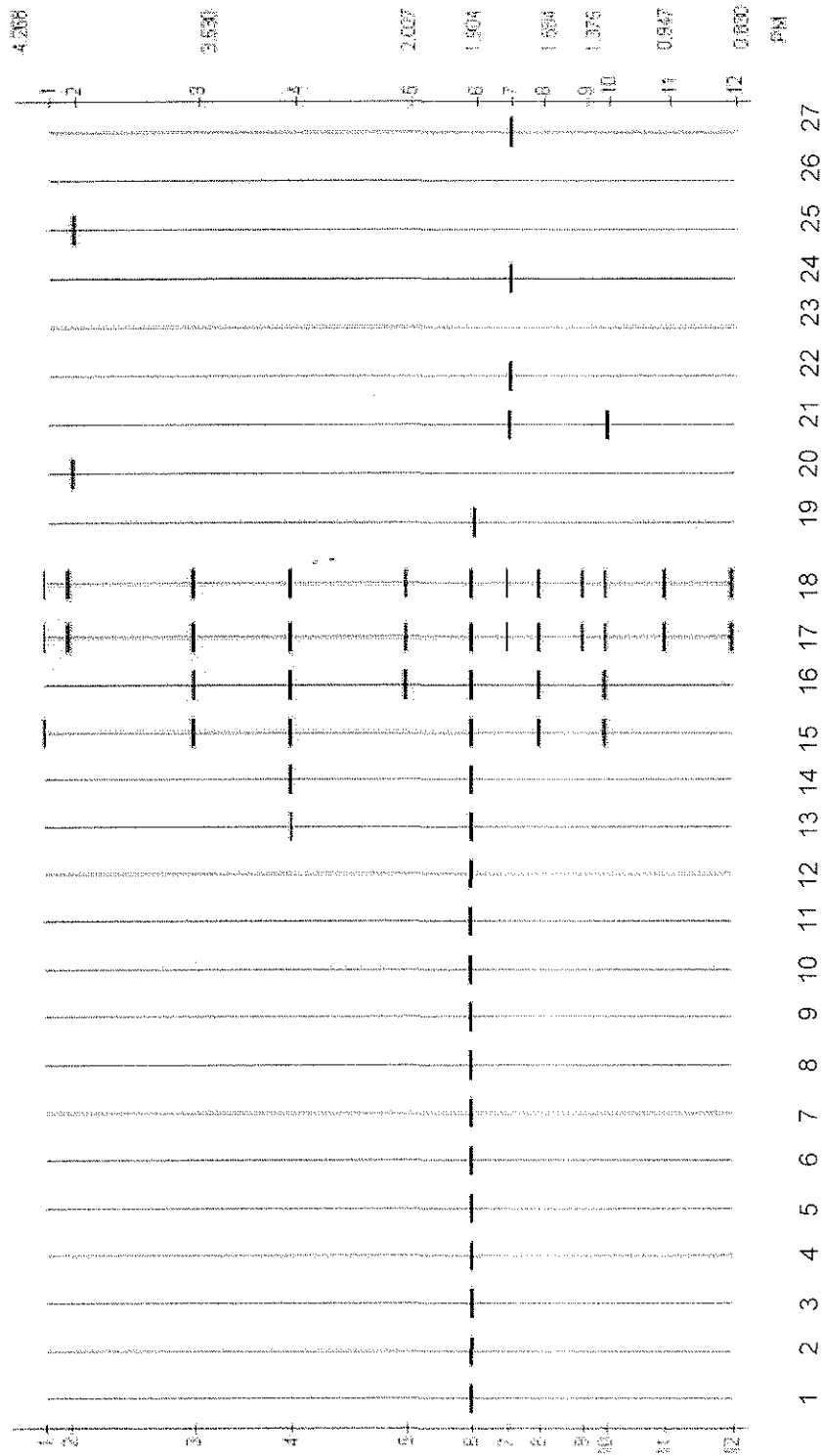


Figura 15: Patrones polimórficos del RFLP DNA / **PvuII** / IS6110 de las cepas de **M. bovis** de Veracruz .
 PM: DNA Lambda *EcoRI-Hind III*. Carril: 1) BCG 2) 9-242 3) 9-149 4) 9-244 5) 9-268 6) BCG 7) 9-43 8) 0-35
 9) 9-248 10) 9-274 11) 9-251 12) 9-264 13) 0-85 14) 0-83 15) 9-49 16) 9-17 17) H37Rv 18) H37Rv19) BCG
 20) 9-51 21) 9-292 22) **M. vaccae** 24) 9-218 25) 0-60 26) **M. vaccae** 27) 0-73

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

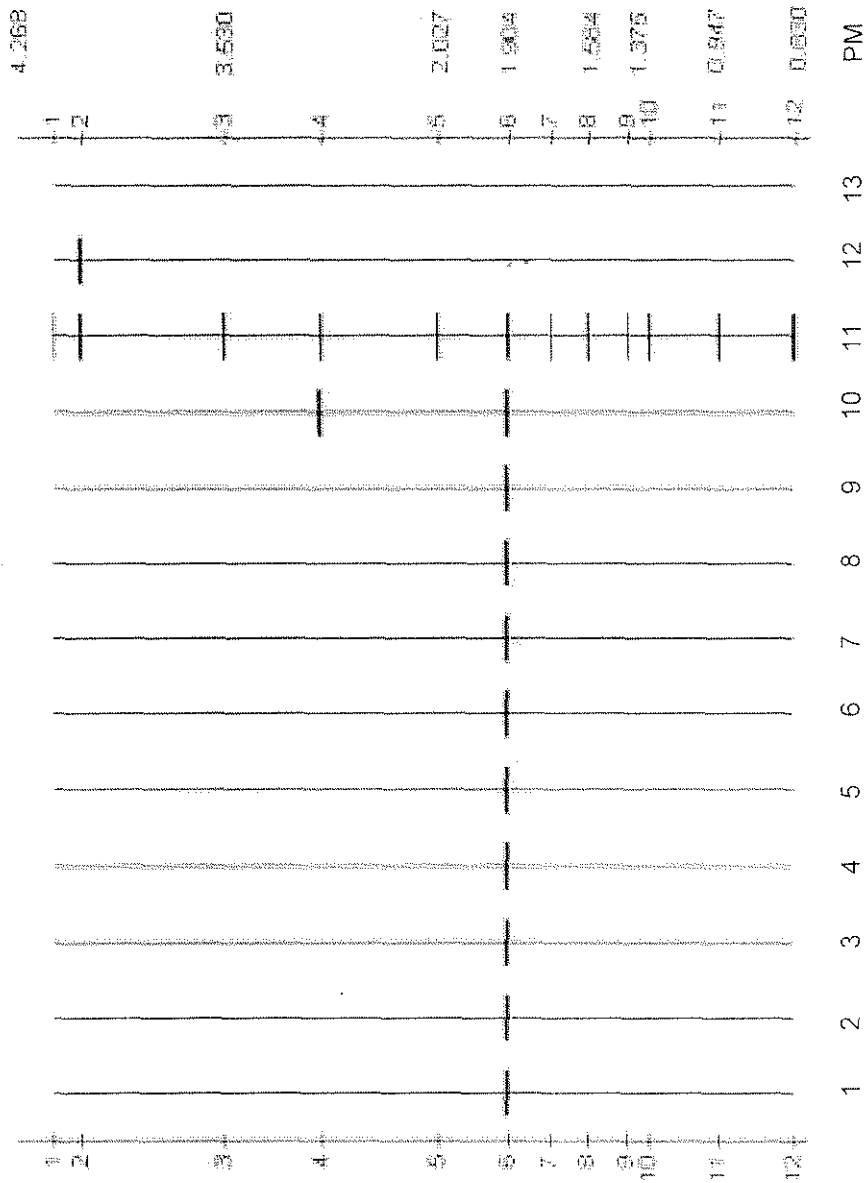


Figura 16: Patrones polimórficos del RFLP DNA PvuII / IS6110 de las cepas de *M. bovis* del Edo. de México. PM: DNA Lambda EcoRI-Hind III. Carril: 1) BCG 2) 95-77 3) 96-23 4) 96-34 5) 95-74 6) 95-87 7) 95-24 8) 95-45 9) 95-67 10) 96-35 11) H37Rv 12) 95-36 13) *M. vaccae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

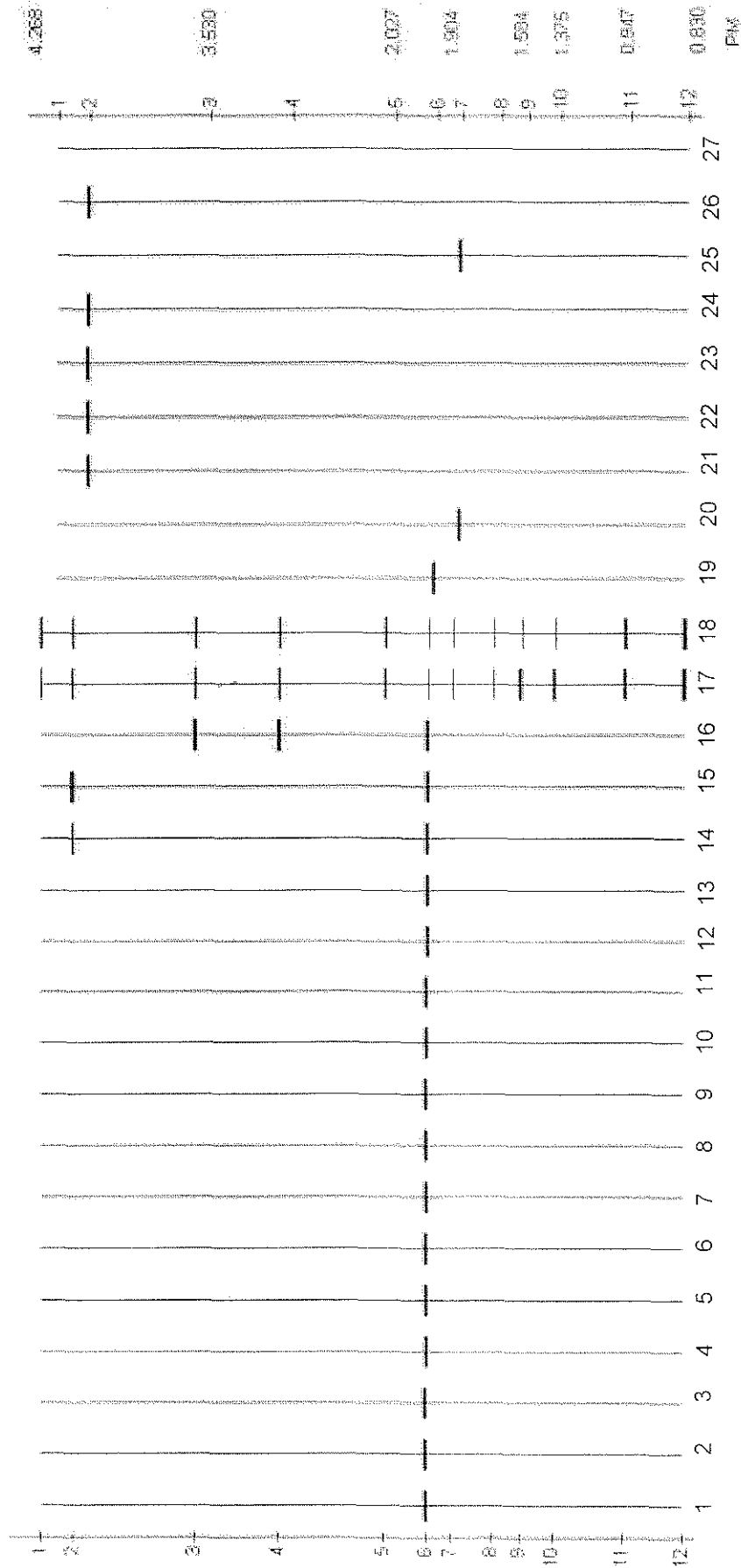


Figura 17: Patrones polimórficos del RFLP DNA/ *PvuII* / IS 6110 de las cepas *M. bovis* de Jalisco y Sonora. PM: DNA Lambda EcoRI-Hind III. Carril: 1) BCG 2) 17 3) 96-159 4) 11 5) 12 6) 13 7) 14 8) 96-156 9) 21 10) 96-135 11) 19 12) 96-17 13) BCG 14) 20 15) 23 16) 29 17) H37Rv 18) H37Rv 19) BCG 20) 25 21) 26 22) 24 23) 27 24) 22 25) 18 26) 16 27) *M. vaccae*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

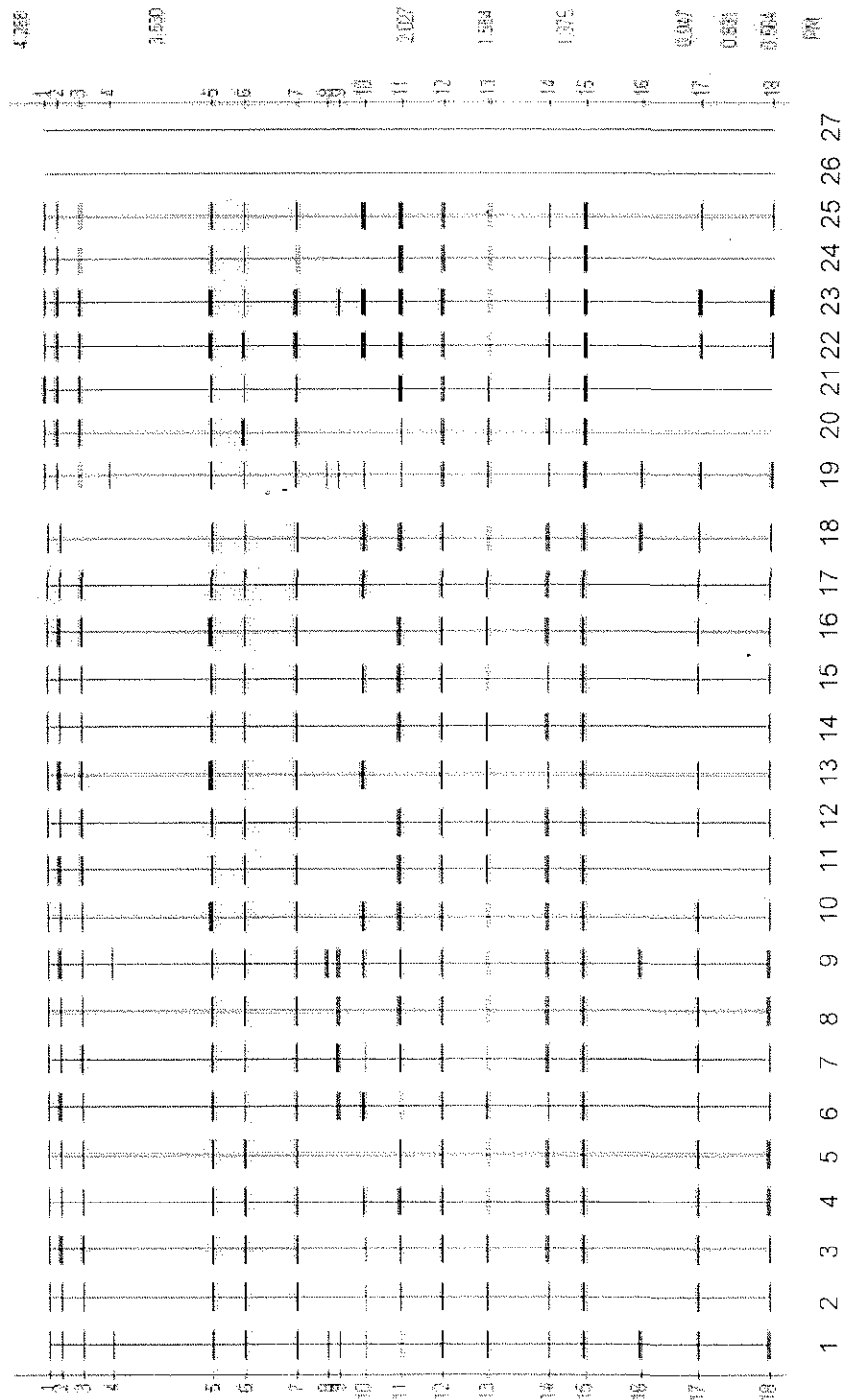


Figura 19: Patrones polimórficos del RFLP DNA/ *Sma*I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* de Veracruz .
 PM: DNA Lambda *Eco*RI-*Hind* III. Carril: 1) H37Rv 2) 9-268 3) 9-244 4) 9-49 5) 9-274 6) BCG 7) BCG 8) 9-217
 9) H37Rv 10) 9-218 11) 9-242 12) 0-60 13) 9-17 14) 9-43 15) 0-83 16) 9-251 17) 0-85 18) 9-51 19) H37Rv
 20) 0-35 21) 9-264 22) 9-248 23) 9-292 24) 9-149 25) 0-73 26) *M. vaccae* 27) *M. vaccae*

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

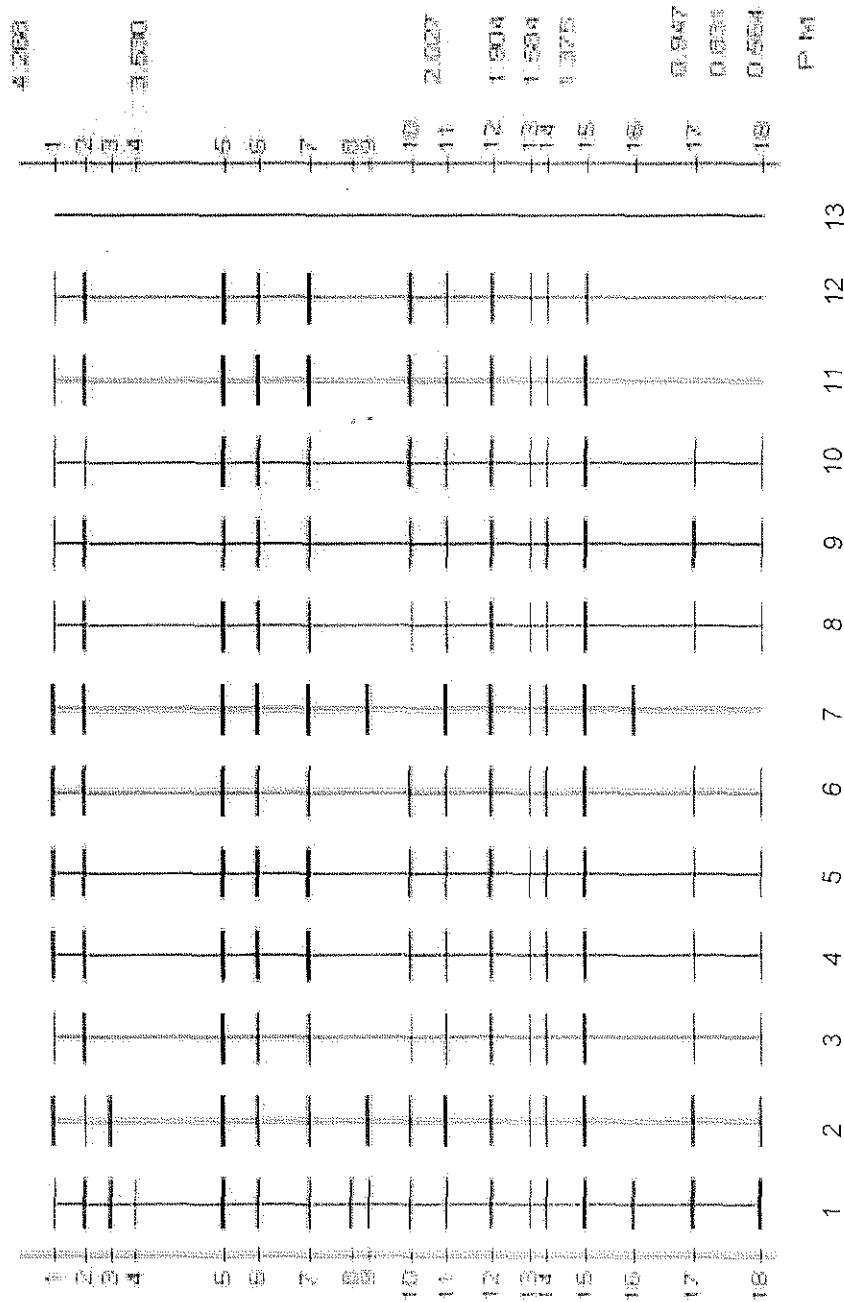


Figura 20: Patrones polimórficos del RFLP DNA/*Sma*I / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* del Edo. de México. PM: DNA Lambda *Eco*RI-*Hind* III. Carril: 1) H37Rv 2) BCG 3) 95-24 4) 95-74 5) 95-77 6) 96-34 7) 95-36 8) 95-45 9) 96-23 10) 96-23 11) 96-67 11) 96-35 12) 95-87 13) *M. vaccae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

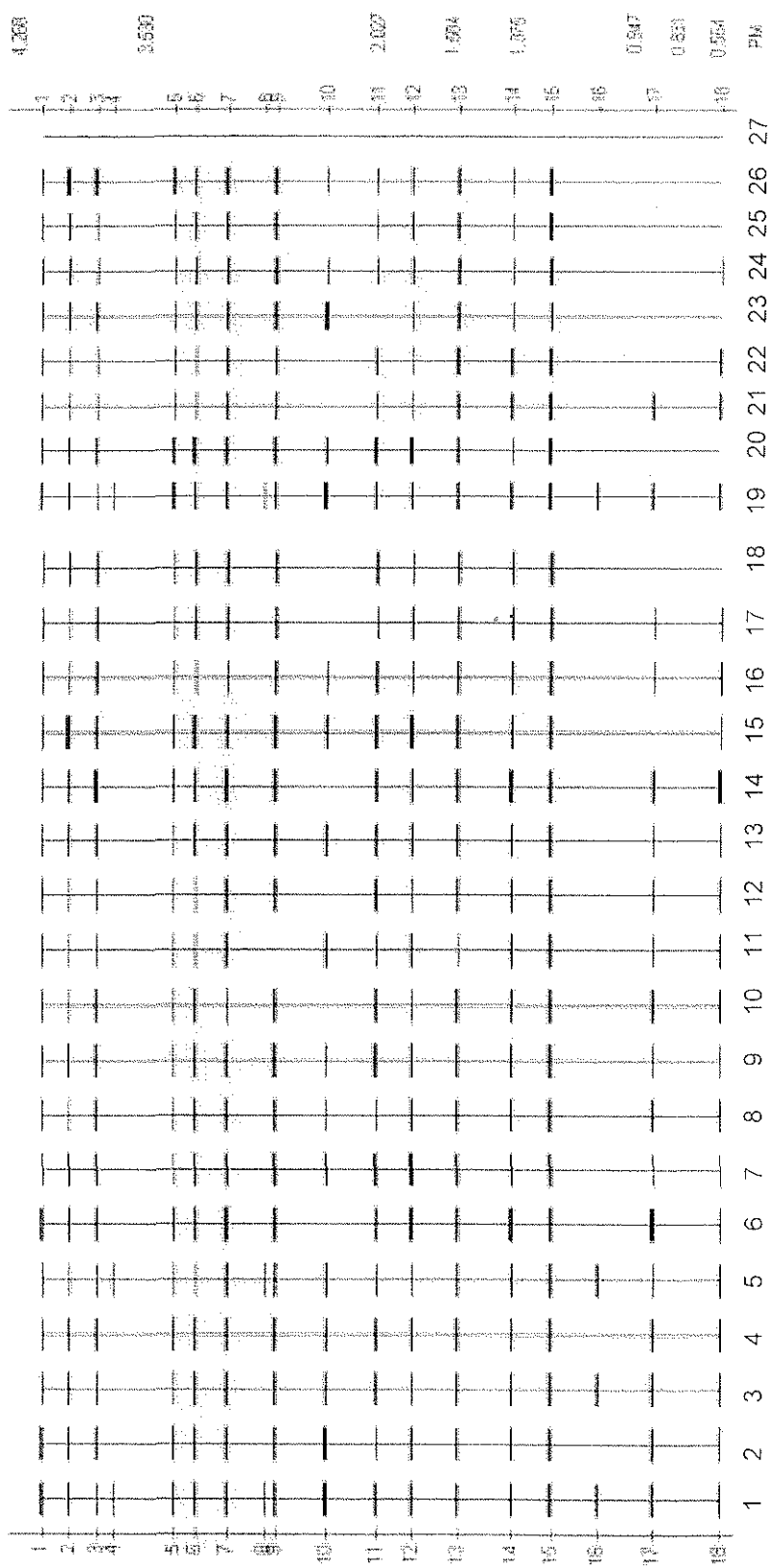
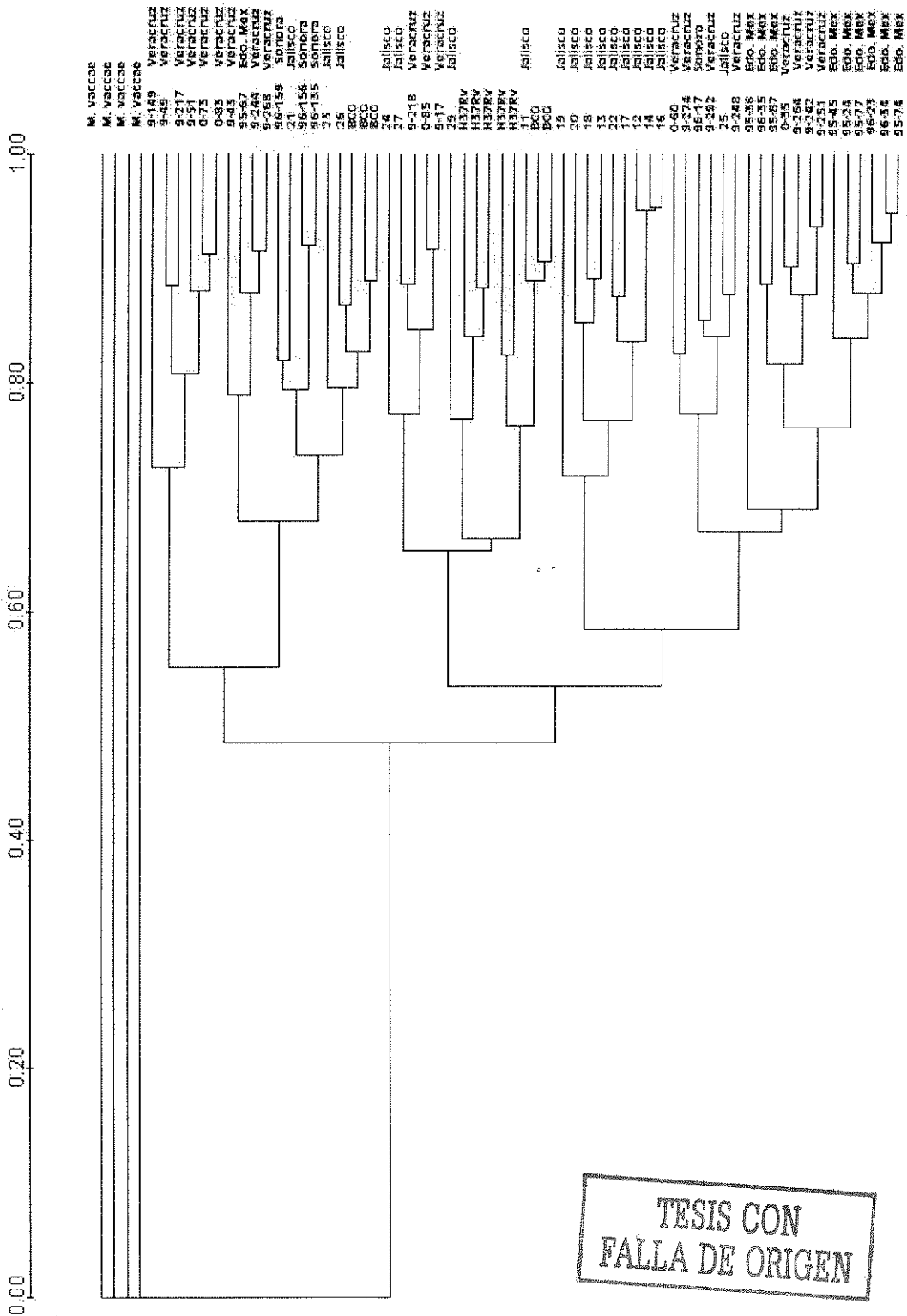


Figura 21: Patrones polimórficos del RFLP DNA *Smal* / PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* de Jalisco y Sonora. PM: DNA Lambda *EcoRI-Hind* III. Carril: 1) H37RV 2) BCG 3) 29 4) 11 5) H37RV 6) 96-17 7) 14 8) 12 9) 12 10) 96-156 11) 27 12) 96-135 13) 16 14) 25 15) 17 16) BCG 17) 26 18) 21 19) H37RV 20) 22 21) 23 22) 96-19 23) 19 24) 13 25) 20 26) 18 27) *M. vaccae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 22 : Integración de los Patrones polimórficos DNA /SmaI /PE-PGRS81 235 pb de las cepas de *M. bovis* en un dendrograma.

9. LITERATURA CITADA

1. Milián-Suazo F, Salman MD, Ramírez C, Payeur JB, Rhyan JC, Santillán F MA. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in México. American Journal of Veterinary Research. 2000. 61, 86-89.
2. Balandrano CS, Anzaldo FG, Peña F GP, Betancourt M X. Tuberculosis. Organización Panamericana de la Salud. 1996, 97.
3. Luna-Martínez E, Mejía TC, Betancourt X, Valera N, M. Mas-Ibáñez T, Peña F G. Secretaría de Ganadería, Agricultura y Desarrollo Rural. Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México A.C. Campañas Nacionales para la Erradicación de la tuberculosis bovina y brucelosis. Programa de Aprobación de Médicos Veterinarios. Manual de Actualización Técnica para la Aprobación del Médico Veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis. 1996. p 92.
4. Farga V. Tuberculosis, 2ª. Edición, 1995. Mediterráneo Santiago de Chile., p. 319.
5. Estrada CH C: Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de Intradermoreacción, Interferon gama y ELISA, basado en la inspección postmortem. 1995. Tesis de Licenciatura, FES-Cuautitlán- UNAM.
6. Valdespino OJR. Pérdidas por desecho prematuro de vacas en un hato lechero en México. Revista Mundial de Zootecnia- FAO. 1993, 74/75: 64.
7. Olvera CR. Tuberculosis: Enfermedad del presente o ¿Tuberculosis enfermedad del siglo XXI?. Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México. 1998, 11:5-6.
8. Valdespino-Gómez JL, Palacios-Martínez M, Mayar-Maya ME, García-Sancho C, Sepulveda -Amor J. Tuberculosis y SIDA en México. Salud Pública en México, 1995, 37:6 539-547.

9. Figueroa C G, Martinez S JC, Gatica T J E. Tuberculosis y embarazo: Presentación de un caso clínico. Salud Pública en México. 2000, 38:6, 459-466.
10. Ostrosky-Zeichner L, Rangel F S M, García R E, Vázquez A, Ibarra M J, Ponce de León R S. Tuberculosis en trabajadores de la salud: importancia de los programas de vigilancia y control. Salud Pública en México, 2000, 42:1, 48-52
11. Dye C. Scheele S. Pathania V. Raviglione MC. Consensus statement, Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. WHO global surveillance and monitoring project. JAMA 1999, 282, 677-686.
12. Enarson DA, Chretien J. Epidemiology of respiratory infectious diseases. Curr. Opin Pulm Med. 1999, 5, 128-35.
13. Bloom BR. Murray CJ. Tuberculosis, commentary on a reemergent Killer. Science 1992, 257, 1055-64.
14. Miller B. Schieffelbein C. Tuberculosis. Bull World Health Organization. 1998, 76, 141-43.
15. Organización Panamericana de la Salud (OMS). Las condiciones de salud en las Americas, 1994, 1:459.
16. Danker WM. Waecker NJ. Essey MA. Moser K. Thompson M. ***Mycobacterium bovis*** in San Diego, A clinicoepidemiological study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. Medicine, 72, 11-37, 1993.
17. Cosivi O, Grange JM, Daborn, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, Kantor I. Zoonotic tuberculosis due to ***Mycobacterium bovis*** in Developing countries. www.medscape.com. 1998.
18. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin MB. Laboratory Methods in Veterinary Mycobacteriology for isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Services Laboratories, AMES, IOWA. 1993.

19. Santillán F MA, Sánchez Z LM, Milián S F, Ramírez C IC. Viabilidad de *Mycobacterium bovis* en solución de tetraborato de sodio. Técnica Pecuaria en México. 1999, 37, 71-74.
20. Corner LA. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Veterinary Microbiology. 1994, 40,53-63.
21. Milián SF. La epidemiología molecular: Generalidades. Memorias 2do. curso de Introducción a la Biología Molecular aplicado a la Medicina Veterinaria, 1998. Cenid-Microbiología INIFAP-SAGAR.
22. Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. J. of Clinical Microbiology. 1992; 30:942 –946.
23. Collins D M, Radford J A, de Lisle W, Bilman-Jacobe. Diagnosis and Epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. Veterinary Microbiology. 1994;40:83-94.
24. Van-Soolingen D, Hermans PW, De Hass PE, Soll DR, Van-Embden JD. Occurrence and Stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion Sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J. of Clinical Microbiology. 1991, 2:2578-2586.
25. Plikaytis BB, Eisenach Kd, Crawford JT, Shinnick TM. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a Polymerase Chain Reaction assay. Molecular and Cellular Probes, 1991, 5:215-219.
26. Cole ST; BroschR, Parhill J, Garnier T, Churcher C. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from complete genome sequence. Nature, 1998, 393:537-544.
27. Hatfull FG, Jacobs WR; Molecular Genetics of Mycobacteria, ASM PRESS, Washington DC, 1ª. Edición , 359 pp. 2000.
28. Ratledge C, Dale J. Mycobacteria : Molecular Biology and Virulence, Blackwell Science . Oxford. 1ª. Edición. 399 pp, 1999.
29. Young Db. Blueprint for the white plague. Nature, 1998; 393:515-516

30. Romano MI, Alito A, Fisanotti JC, Bigi F, Kantor I, Cicuta ME, Cataldi A. Comparation of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 1996,50:59-71.
31. Cousins DV, Williams SN, Ross BC, Ellis TM. Use of repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*, 1993, 37:1-17.
32. Bigi F, Romano M I, Alito A, Cataldi A. Cloning of a novel Polymorphic GC-Rich Repetitive DNA from *Mycobacterium bovis*. *Research of Microbiology*. 1995, 146:341-346.
33. Doran TJ, Hodgson A L M, Davies J K, Radford A J. Characterization of a novel repetitive DNA sequence from *Mycobacterium bovis*. *FEMS Lett.* 1992, 96: 179-186.
34. Paulet S & Cole ST. Characterization of the highly abundant Polimorphic GC-Rich-Repetitive Sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Microbiology*. 1995, 163: 87-95.
35. Aboud-Zeid C. Garbe T. Lathigra R. Wiker GH. Harboe M. Rook GAW. Young D B. Genetic and Immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infection and Immunity*. 1991, 59,8: 2712-2718.
36. Espitia C, Laclette P, Mondragón-Palomino M, Amador A, Campuzano J. Phylogenetic analysis of the PE-PGRS glicine rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. A new family of fibronectin binding proteins?. 1999, *Microbiology*, 145:3487-95
37. Thierry D M, Brissin-Noel a, Frebault V L, Nguyen S, Guesdon J, Gicquel B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990. 28: 2668-2673.

38. Hermans P W M, Van Soolingen D, Bik EM, De haas P E W, Dale J W, Van Embden J D A. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium* complex strains. *Infection and Immunity*. 1991. 59: 2695-2705.
39. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, De Yates GF, Leslie GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by Restriction Fragment Analysis and hibridazation with insertion elements IS6110 and IS1081. *Journal Clinical Microbiology* . 1993, 31: 1143-47.
40. Van-Soolingen D, Hermans PW, De Hass PE, Groenen P M A, Van-Embden JD. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993. 32: 2425-2433.
41. Van-Soolingen D, Hermans PW, De Hass PE, Van-Embden JD: RFLP analysis of mycobacteria. National Institute of Public Health and Enviromental Protection, Bilthoven, The Netherlands. 1991 : 54.
42. Collins DM, De LGW & Gabric DM. Geographic distribution of restriction types of *Mycobacterium bovis* isolates from Brush-tailed possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand. 1986, *J. Hyg.*, 96, 431-438
43. Collins DM, & De Lisle GW. DNA Restriction Endonucleasa Analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *Journal Clinical Microbiology*. 1985 21, 562-564
44. Collins DM, De Lisle GW, Collins JD, Costello E. DNA Restriction Fragment Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and badgers in Ireland. 1994, *Veterinary Record*, 134, 681-682.
45. Liébana E, Aranaz A, Dominguez L, Mateos A, González –Llamazares P, Rodríguez-Ferri EF, Domingo M, Vidal D, Cousins D. The Insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Veterinary Microbiology*. 1997, 54, 223-233.



46. Brosch R, Gordon V.S, Pym A, Eiglemeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Internal Journal of Medical Microbiology*. 2000, 290:143-152.
47. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, 35,907-914.
48. Blázquez J, Espinosa de los Montero L E, Samper S, Martín C, Guerrero A, Cobo J, Van-Embden, Baquero F, Gómez-Mampaso E. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from hospital outbreak involving human immunodeficiency virus positive patients., *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35, 6: 1390-1393.
49. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Vidal D, Domingo M, González O, Rodríguez-Ferri e, Bunschoten A, Van Emben JDA, Cousins D. Spacer Ologonucleotide Typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. 34, 11, 2734-40.
50. World Health Organization : Report of WHO working group on zoonotic tuberculosis with the participation of FAO. Germany 1994, 45 p.
51. Braden C R, Templeton G L, Cave D M, Valway S, Onorato I M, Castro K G, Moers D, Yang Z, Stead W W, Bates J H. Interpretation of Restriction Fragment Length Polimorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with large rural population. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, 175:1446-1452.
52. O'brien R, Flynn O, Costello E, O'grady D, Rogers M. Identification of a novel DNS probe for strain typing *Mycobacterium bovis* by Restriction Fragment Length Polimorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, 38,5: 1723-1730.

53. Collins D M, Erasmuson S K, Stephens D M, Yates g F, De leslie G W. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by RFLPS and hibridization with insertion elements IS1081 and IS6110. Journal of Clinical Microbiology, 1993, 31:1143-1147.
54. Perumaalla S V, Adams GL, Payeur J B, Jarnagin J L, Baca D R, Suárez-Güemes F, Ficht T. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Texas and México. Journal of Clinical Microbiology, 1996, 34,9: 2066-2071.
55. Maslow J N, Mulligan M E, Arbeit R D. Molecular Epidemiology: Aplication of contemporary techniques to the typing of Microorganisms. Clinical Infectious Diseases, 1993, 17: 153-164.
56. Hunter RP. Reproducibility and Indeces of descriminatory power of microbial typing methods. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 1903-1905.
57. Milián SF, Banda RV, Ramírez CC, Arriaga DC: Epidemiologia molecular de *Mycobacterium bovis*: Regionalización de cepas. XXX Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Sonora 2000. Memorias. P49.
58. Durr PA, Hewinson RG & Clifton-Hadley. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis: 1. *Micobacterium bovis* genotyping. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 2000, 19 ,3: 675-688.
59. Van-Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. Journal of Internal Medicine. 2001, 249: 1-26.
60. Kato-Maeda M, Small M P. How molecular epidemiology has changed, what we know about tuberculosis ?. Culture in Medicine, 2000, 172: 256-259.



10. ANEXO

SOLUCIONES

AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO DE MICOBACTERIAS

10x TE buffer : 100 mM tris/HCl pH 8
 10 mM EDTA

disolver en agua destilada, esterilizar, mantener a temperatura ambiente.

Solución 1x TE : agregar a un volumen de buffer 10x TE, nueve volúmenes de agua destilada esterilizada.

Lizosima: 10 mg de lizosima / ml de agua destilada

Almacenar en aliquotas de 1 ml a -20°C .

SDS al 10%: 10 gr de SDS / 100 ml agua destilada

Disolver a 65°C durante 20 minutos, no esterilizar

Proteinasa K: 10 mg proteinasa K / ml agua destilada

Disolver y almacenar en aliquotas a -20°C .

SDS / proteinasa K: mezclar 5 μl de proteinasa K 10 mg / ml
 en 70 μl de SDS al 10%.

Almacenar a -20°C .

NaCl al 5%: disolver 29.2 gr NaCl / 100 ml de agua destilada

Esterilizar, almacenar a temperatura ambiente.

CTAB / NaCl: disolver 4.1 gr de NaCl / 80 ml de agua destilada

Agregar 10 gr de CTAB (N-cetyl-N,N,N.-trimethyl ammonium bromide)

Disolver a 65°C , ajustar el volumen a 100 ml, almacenar a temperatura ambiente, no esterilizar.

Cloroformo-alcohol isoamílico: 24:1

Mezclar 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

Etanol al 70%: 70 ml de etanol/30 ml de agua

Almacenar a temperatura ambiente

Isopropanol Absoluto.

ELECTROFORESIS

50X TAE buffer: Tris base 2M (242 gr)
EDTA 0.05 M (18.6 gr)
Ácido acético glacial 57 ml

Mezclar en un litro de agua. Ajustar a pH 8

1x TAE bufer: un volumen de TAE 50x agregar 49 volúmenes de agua destilada.

Gel de agarosa al 1%: 1 gr de agarosa / 100 ml de 1x TAE buffer

Disolver por calentamiento.

Buffer de carga: azul de bromofenol 0.05 gr
Xyalene cyanol 0.05 gr
Glicerol 5.00 ml
EDTA 0.186 gr

Mezclar en 10 ml de 1x TAE buffer.

Bromuro de ethidio 1000x 50 mg / 100 ml de agua destilada.

Almacenar en frasco color ambar a 4°C Utilizar guantes, es un agente mutagénico.

Hacer dilución 1:1000 obtener concentración de 0.5 µg / ml.

ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA

SOUTHERN BLOTTING

HCl 1 M: 85.5 ml de HCl concentrado / 914.5 ml de agua

HCl 0.25 M: 125 ml HCl 1M / 375 ml de agua

Almacenar a temperatura ambiente.

NaOH 4 M: 160 gr de NaOH / 800 ml de agua

Ajustar a un litro, almacenar a temperatura ambiente.

NaOH 0.4 M. 100 ml de NaOH 4 M / 900 ml de agua.

20x SSC: 3 M NaCl 175.3 gr / litro de agua

0.3 M citrato de sodio 88.2 gr / litro de agua

Ajustar a pH 7.0 con NaOH 5 M, esterilizar, almacenar a temperatura ambiente.

2x SSC: a un volumen de 20x SSC agregar 9 volúmenes de agua.

5x SSC: a un volumen de 20x SSC agregar 3 volúmenes de agua.

HIBRIDACIÓN

ECL GOLD BUFFER: 20 ml ECL GOLD BUFFER

0.58 gr de NaOH

1 gr blocking reagent.

Disolver a 42°C durante 2 horas.

PROGRAMA TERMOCICLADOR

3 min	94°C	1 ciclo
1 min	94°C	
1 min	65°C	25 ciclos
2 min	72°C	
4 min	72°C	1 ciclo

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PCR.

Para la obtención del fragmento de 235 pb que corresponde a la región conservada de la secuencia PE-PGRS81.

Iniciadores :

PGRS1V 5' ATG TCG TTT GTG ATC GCG GC 3'
PGRS2RU 5'AGG CCT GCA CGA ACT GGT CAT 3'

Reacción de PCR (25 µl)

PCR buffer	10x	2.5µl
dNTPs	200µM	1µl
MgCl ₂	1.0mM	1 µl
Iniciador 1V	10pmoles	1µl
Iniciador 2RU	10pmoles	1µl
DNA	40 ng	2µl
H ₂ O		16.25µl
Taq pol	1.25 U	0.25µl

PROGRAMA TERMOCICLADOR

1:30 min	94°C	1 ciclo
1 min	94°C	
1:30 min	50°C	35 Ciclos
1:30 min	72°C	
7 min	72°C	1 ciclo

Digestión enzimática para la obtención del fragmento 647 pb que corresponde a la región conservada de la secuencia Rv1759c.

20 µl DNA plásmido

5 µl buffer 10x universal

1 µl de cada enzima *PvuII*, *BamHI*

24 µl H₂O

50 µl reacción

Incubar a 37°C, toda la noche

Digestión Enzimática para la obtención del fragmento 3.9 Kb que corresponde a la secuencia Rv1759c.

20 µl DNA plásmido

5 µl buffer 10x universal

1 µl enzima

24 µl H₂O

50 µl reacción

incubar a 37°C, toda la noche

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Digestión enzimática de las muestras de DNA de **M. bovis** y **M. tuberculosis**

30 μ l DNA genómico (100 ng/ μ l)

5 μ l buffer 10x universal

1 μ l enzima

14 μ l H₂O

50 μ l reacción

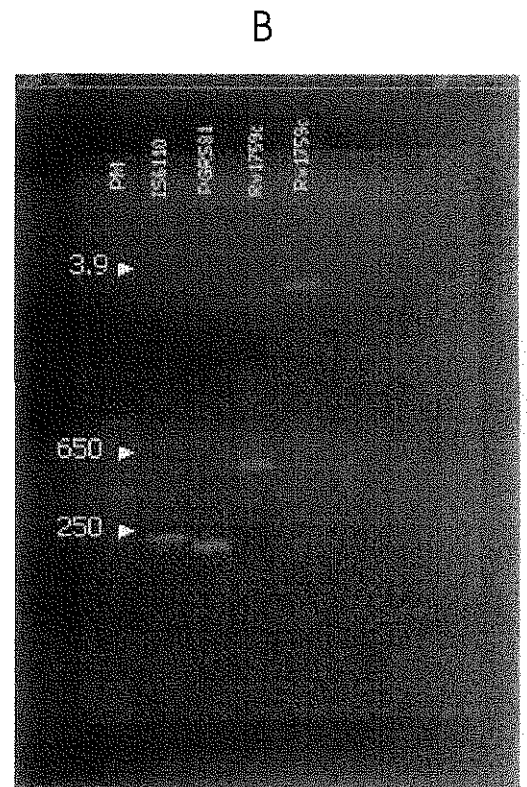
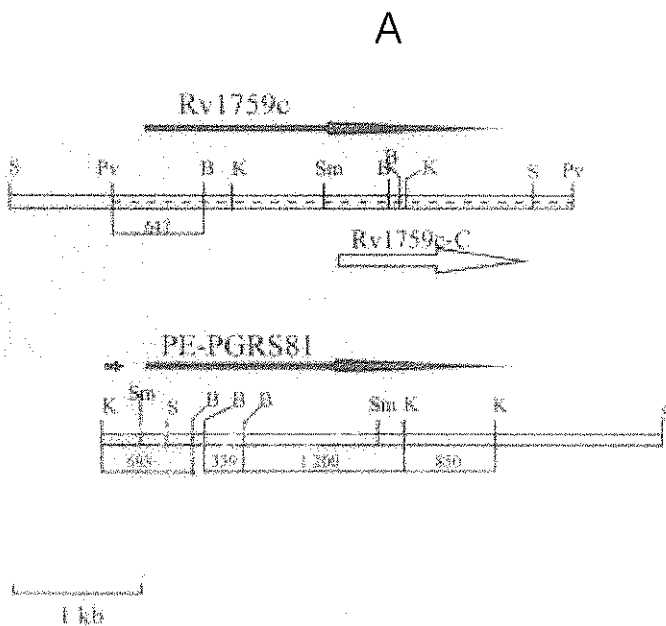
Incubar a 37°C, toda la noche

Sitios de corte enzimático:

***Pvu*II** :
CAG | CTG
GTC | GAC

***Sma*I**:
CCC | GGG
GGG | CCC

***Alu*I**:
AG | CT
TC | GA



- A) Mapa de restricción de las secuencias Rv1759c y PE-PGRS81.
- B) Gel de agarosa al 1.5% con el DNA de los marcadores genéticos empleados en el estudio.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN