



01674  
33

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD  
ANIMAL

## IDENTIFICACION Y TIPIFICACION MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis* EN TEJIDOS CONSERVADOS

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
P R E S E N T A :  
MARGARITA ROBLEDO SALINAS

TUTOR: DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ  
COMITE TUTORAL: DR. JOSE ANGEL GUTIERREZ PABELLO  
DR. FELICIANO MILIAN SUAZO

MEXICO, D.F.

2003.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**

**DECLARACION.**

La autora da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



---

**MVZ. MARGARITA ROBLEDO SALINAS**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## DEDICATORIA

A mi familia, su armazón ha sido una gran base en mi formación como ser humano. Es un orgullo pertenecer a ella.

A Ma. Luisa Salinas Peña, una mamá muy especial, gracias por heredarme lo mejor de ti, con ello he podido caminar a través del tiempo.

A Julio M. Robledo Candellero, porque con tu sabiduría adquirida a lo largo de tu vida has logrado ser un papá ejemplar. Me falta mucho por aprender de ti.

A mis hermanas Ma. Luisa, Alejandra y Rocío, su diversidad me ha enseñado a convivir con los demás, gracias por compartir la misma sangre.

A esos extraordinarios seres a los que llamamos animales, gracias por existir, me han enseñado que cada uno es esencial para vivir en armonía.

A mis pequeños y peludos amigos que han estado a mi lado en diferentes etapas de mi desarrollo: Muñeca, Pocha, Mishu, Pinto, Blume y Taz. Siempre estaremos juntos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de enriquecer mis conocimientos.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana, por ser la responsable de mi formación profesional.

A mi tutora: Dra. Camila Arriaga Díaz, por su gran apoyo en el transcurso de la maestría y en la realización de este proyecto.

A mi respetable Comité Tutorial: Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y Dr. Feliciano Milián Suazo, por sus críticas constructivas y buenos consejos que me brindaron para la realización de este trabajo.

A mi honorable Jurado: Dr. Gilberto Chávez Gris, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Dra. Clara Espitia Pinzon, Dra. Camila Arriaga Díaz y Dr. Feliciano Milián Suazo, por sus apreciables contribuciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología), por todas las facilidades otorgadas para desarrollar la parte experimental de la tesis.

A la MVZ M. A. Georgina Robles Pesina del laboratorio de Micobacterias del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), por su valiosa contribución al proveer el material biológico utilizado en esta tesis.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales y a la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez por abrirme las puertas del laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM y brindarme los conocimientos del extraordinario mundo de la biología molecular.

A los compañeros y amigos del laboratorio de Diagnóstico del CENID-Microbiología por ser parte esencial en el procesamiento del material biológico utilizado en la tesis.

Al los compañeros del Proyecto "Enfermedades de los Cerdos" del CENID-Microbiología por mantener siempre las puertas abiertas del laboratorio.

Al laboratorio de Alteraciones funcionales de la Unidad de Diagnóstico de la Posta Zootécnica Torreón del Molino de la FMVZ-UV, por brindarme la oportunidad de desarrollar parte del trabajo experimental.

A las MMVVZZ Luisa Pamela Ibarra y Estela Flores Velázquez, por su valiosa contribución de la información sobre la situación actual de la Campaña Nacional para el Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina.

Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, por su apoyo íntegro hasta el final.

A la Dra. Refugio Cortés Fernández, por ser una gran asesora durante mi proceso de aprendizaje en el laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ UNAM.

Dr. Victor M. Banda Ruiz, por su amistad y valiosos conocimientos que fueron de gran ayuda para desarrollar este trabajo.

Dr. Ciro Estrada Chávez, por brindarme sus ideas y observaciones durante el desarrollo de la tesis.

A las familias Arango Rosado, Rodríguez Cortes y Romero Tejeda, por hacerme sentir parte de ustedes.

A mis amigas y amigos que siempre me han brindado su amistad y apoyo incondicional desde el momento en que nos conocimos. Sigamos cultivando esta amistad: Ana L. Arango Rosado, Isabel Estevez Denaives, Ivonne Granados, Cynthia A. González Hernández, Rosa Luz Mondragón Vargas, J. Ramón Páez Manrique, Gabriela Palomares, Francisco Pérez Hernández, Ezequiel E. Rebolledo Hernández, Silvia Reyes Maya, Ana D. Rodríguez Cortes, Agustín M. Rosiles Vázquez, Aurora Romero Tejeda, Luis A. Ruiz Juárez, Cecilia Romero Torres, Martha Torres Moreno, Felicitas Vázquez Flores.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto G-34799 "Control Integral de la Tuberculosis Bovina", por brindarme una beca para la redacción de tesis de Maestría.

## RESUMEN

**Robledo Salinas Margarita.** "Identificación y tipificación molecular de *Mycobacterium bovis* en tejidos conservados". Bajo la dirección de la Dra. Camila Arriaga Díaz, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, Dr. Feliciano Millán Suazo.

La prueba definitiva para el diagnóstico de la tuberculosis bovina es el aislamiento e identificación bacteriológica de *Mycobacterium bovis*, lo cual requiere por lo menos 8 semanas; sin embargo con las pruebas de diagnóstico moleculares es posible identificar y tipificar a distintas especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) en muestras clínicas de bovinos en corto tiempo, considerándose además pruebas sensibles y específicas. En el presente estudio se utilizaron 42 tejidos (nódulos linfáticos) fijados en formol y embebidos en parafina (TEP) de origen bovino seleccionados con base en resultados de pruebas oficiales de laboratorio, como histopatología y bacteriología, realizadas entre los años de 1999 al 2002. El ADN obtenido de los distintos TEPs mediante ciclos de ebullición-congelación se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como control interno para el análisis por PCR, se amplificó un fragmento de 375 pares de bases (pb) de la región conservada del locus del citocromo b (cit b). Para identificar a miembros del CMTB, se amplificó una región de 123 pb de la secuencia de inserción 6110 (IS6110). Finalmente se amplificó la región DR y se obtuvieron los patrones de hibridación utilizando el método de Spoligotyping. La obtención mediante PCR del producto de amplificación esperado del gen del cit b en todas las muestras, demostró que el ADN obtenido de estas muestras podía ser amplificado utilizando los iniciadores específicos. De las 21 muestras cultivo positivas 16 se analizaron por PCR, siendo todas positivas. Diez muestras negativas a cultivo pero positivas en histopatología fueron también positivas en PCR. De las seis muestras negativas por histopatología (tinciones ZN, HE negativas), 4 fueron cultivo negativas para micobacteria y 2 no se trabajaron. Por PCR 4 fueron positivas (2 cultivo negativas y 2 no trabajadas) y las 2 restantes fueron negativas en PCR para el CMTB. Treinta y seis TEPs fueron analizados por spoligotyping. Aunque los patrones obtenidos con los TEPs muestran similitud con los de *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG, en muchos de ellos se observó también reconocimiento de espaciadores que son característicos de *M. tuberculosis*. Las técnicas de laboratorio estandarizadas para el diagnóstico definitivo de la TB bovina, dará una gran ventaja a la Campaña Nacional contra dicha enfermedad ya que permitirá corroborar la infección con *M. bovis* en corto tiempo e iniciar el seguimiento epidemiológico de los animales infectados.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, *M. bovis*, tejidos conservados, diagnóstico, Tipificación, PCR, Spoligotyping

## SUMMARY

**Robledo-Salinas Margarita.** "Molecular identification and typing of *Mycobacterium bovis* in conserved tissues". Under the supervision of Camila Arriaga-Diaz PhD, Jose Angel Gutierrez-Pabello PhD and Feliciano Milian-Suazo PhD.

The definitive test for the diagnosis of bovine tuberculosis is isolation and bacteriological identification of *Mycobacterium bovis*, which requires at least eight weeks; however, with molecular diagnostic tests it is possible to identify and type the distinct species of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) in clinical bovine samples in a relatively short amount of time, considering that these molecular tests are both sensitive and specific. In the present study, 42 tissue samples of bovine origin (lymphatic nodules), formalin-fixed and embedded in paraffin (PET), were chosen based on previous results of positive official laboratory tests (histopathology and bacteriology) that were conducted between 1999 and 2002. The DNA samples obtained from the distinct PETs during several cycles of boiling and freezing were amplified by the polymerase chain reaction (PCR). As an internal control for the PCR analysis, a fragment of the conserved locus, cytochrome b (cyt b) containing 375 base pairs (bp), was amplified. To identify the members of MTBC, a region of 123 bp of the insertion sequence 6110 (IS6110) was amplified. Finally, the direct repeat region (DR) was amplified and the hybridization patterns were obtained using the spoligotyping method. The yield by PCR of the expected amplification product of the cyt b gene in each sample proved that the technique for DNA amplification using specific DNA primers of the sample was feasible. Of the 21 positive culture samples, 16 were analyzed with PCR and were determined to be positive. Ten samples that were determined to be culture-negative but positive histopathologically were also positive based on the PCR test. Of the six samples that were negative in histopathological tests (HE and ZN stained samples), four were culture-negative based on bacteriological tests and the remaining two were not tested. However, with PCR testing, four were determined to be positive (2 of the negative culture samples and the two samples that were not tested bacteriologically), and the remaining two were PCR negative for the MTBC. Thirty-six PETs were analyzed with the spoligotyping method. Although the patterns obtained with the PETs showed similarity with those of *M. bovis* AN5 and *M. bovis* BCG, in many of these patterns recognition of spacers that are characteristic of *M. tuberculosis* was also observed. The standardized laboratory techniques for the definitive tests, PCR and spoligotyping, for bovine tuberculosis will give a great advantage to the National Campaign for this disease since these tests will also permit the corroboration of *M. bovis* infection in a short amount of time and thus the beginning of epidemiological follow-up studies for infected animals.

Keywords: Bovine tuberculosis, *M. bovis*, conserved tissues, diagnosis, typing, PCR, Spoligotyping.

## ÍNDICE GENERAL

|  | Página      |
|--|-------------|
| <b>DECLARACIÓN</b>   | <b>I</b>    |
| <b>DEDICATORIA</b>   | <b>II</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>   | <b>III</b>  |
| <b>RESUMEN</b>   | <b>VI</b>   |
| <b>SUMMARY</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>ÍNDICE</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>                                | <b>X</b>    |
| <b>INTRODUCCION</b>  | <b>1</b>    |
| 1.1 Definición de la enfermedad                                  | 1           |
| 1.2 Importancia de la tuberculosis                               | 1           |
| 1.3 Etiología  | 3           |
| 1.4 Vías de infección  | 4           |
| 1.5 Patogenia de la tuberculosis                                 | 5           |
| 1.6 Situación actual de la tuberculosis bovina en México         | 7           |
| 1.7 Diagnóstico  | 9           |
| 1.7.1 Aislamiento bacteriológico                                 | 9           |
| 1.7.2 Pruebas basadas en la respuesta inmune mediada por células | 10          |
| 1.7.2.1 Intradermoreacción (Prueba de hipersensibilidad tipo IV) | 10          |
| 1.7.2.2 Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ )                        | 11          |
| 1.7.3. Prueba basada en la respuesta inmune humoral              | 12          |
| 1.7.3.1 Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)                     | 12          |
| 1.7.4 Pruebas basadas en la detección de lesiones                | 13          |
| 1.7.4.1 Inspección <i>postmortem</i> (macroscópico)              | 13          |
| 1.7.4.2 Histopatología (microscópico)                            | 14          |
| 1.7.5 Pruebas basadas en la amplificación de ADN micobacteriano  | 15          |
| <b>2. JUSTIFICACION</b>  | <b>22</b>   |
| <b>3. OBJETIVOS</b>  | <b>23</b>   |
| <b>4. MATERIAL Y METODOS</b>                                     | <b>24</b>   |

|  |    |
|--|----|
| 4.1 Tejido fijado en formol y embebido en parafina (TEP)   | 24 |
| 4.2 Extracción del ADN micobacteriano  | 25 |
| 4.2.1 Método 1 (M1)  | 25 |
| 4.2.2 Método 2 (M2)  | 25 |
| 4.2.3 Método 3 (M3)  | 26 |
| 4.2.4 Método 4 (M4)  | 27 |
| 4.2.5 Método 5 (M5)  | 27 |
| 4.2.6 Cuantificación del ADN micobacteriano y electroforesis   | 28 |
| 4.3 Amplificación del locus del citocromo b (cit b)  | 28 |
| 4.4 Identificación molecular del complejo<br><i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante PCR          | 29 |
| 4.5 Detección y tipificación molecular de miembros<br>del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 30 |
| 4.5.1 Amplificación del ADN por PCR  | 30 |
| 4.5.2 Hibridación de los productos de amplificación  | 31 |
| 4.5.3 Análisis molecular de los patrones de hibridación  | 32 |
| <b>5. RESULTADOS</b>   | 33 |
| 5.1 Extracción de ADN micobacteriano   | 33 |
| 5.2 Amplificación del locus del cit b  | 34 |
| 5.3 Identificación molecular del complejo<br><i>Mycobacterium tuberculosis</i> mediante PCR          | 36 |
| 5.4 Detección y tipificación molecular de miembros<br>del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 39 |
| <b>6. DISCUSION</b>  | 43 |
| <b>7. CONCLUSIONES</b>   | 49 |
| <b>8. PERSPECTIVAS</b>   | 50 |
| <b>9. LITERATURA CITADA</b>  | 51 |

## LISTA DE CUADROS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Cuadro 1</b> Características de los 42 TEPs seleccionados de acuerdo a pruebas oficiales de laboratorio.  | 24     |
| <b>Cuadro 2</b> Resultados de los TEPs por Histopatología, Cultivo, PCR, Spoligotyping.  | 38     |
| <b>Cuadro 3</b> Reconocimiento de los espaciadores 39 al 43 de la región DR obtenidos por Spoligotyping de los 36 TEPs evaluados por esta técnica. | 42     |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Fig. 1</b> Programa de Tuberculosis Bovina actualizado a Enero 2002. Clasificación de los Estados Mexicanos de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995.      | 8  |
| <b>Fig. 2</b> Patrones subespecie-específicos dentro de varios miembros del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , definidos por spoligotyping. | 21 |
| <b>Fig. 3</b> Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de amplificación del cit b con 375 pb.   | 35 |
| <b>Fig. 4</b> Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación de 123 pb de la IS6110 para el CMTB.                           | 37 |
| <b>Fig. 5</b> Patrones genéticos de diferentes TEPs obtenidos por spoligotyping.  | 40 |
| <b>Fig. 6</b> Dendrograma que muestra los grupos genéticos formados por los distintos TEPs.   | 41 |

## **1. INTRODUCCION**

### **1.1 Definición de la enfermedad**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa, causada por especies del género *Mycobacterium*, que afecta al hombre y a los animales y se caracteriza por la presencia de tubérculos y necrosis caseosa de los tejidos (OIE, 2001).

### **1.2 Importancia de la tuberculosis**

La TB en humanos es considerada la principal causa de muerte debida a un solo agente infeccioso. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud por lo menos 2 millones de personas mueren cada año debido a esta enfermedad lo que ha llevado a que sea declarada una emergencia global; se ha estimado que entre el año 2000 y 2020, cerca de mil millones de personas serán nuevamente infectadas, 200 millones de personas se enfermarán, y 35 millones morirán de TB (OMS, 2000). Los factores que tradicionalmente se han asociado con la adquisición de la infección, desarrollo del padecimiento y mortalidad son complejos, ya que para su presentación influyen aspectos sociales, económicos, culturales, biológicos, médicos, etcétera. Los factores que con mayor frecuencia se mencionan se refieren a tópicos tales como pobreza, desnutrición, hacinamiento, ventilación e iluminación deficiente de la vivienda, abuso de alcohol, tabaco y otras drogas, el embarazo, el tratamiento prolongado con corticosteroides, falta de acceso a los servicios de salud y la presencia de otros padecimientos asociados como la diabetes mellitus (García-García *et al.*, 1995). En muchos países en desarrollo, la TB es la enfermedad oportunista más frecuentemente asociada con la infección VIH/SIDA; los casos se manifiestan como una enfermedad pulmonar, linfadenopatía, o cuando la inmunosupresión es severa, como una enfermedad diseminada (Cosivi *et al.*, 1998). En México la TB ha sido reportada como problema emergente de salud pública, la cual ha

incrementado su incidencia en 28 Estados de la República, hasta en un 100% en algunos de ellos (Milián y Gallegos 2001).

La TB bovina, causada por *Mycobacterium bovis*, es una enfermedad zoonótica bien conocida que afecta al ganado vacuno de todo el mundo. La TB bovina figura entre las enfermedades de la Lista B de la Oficina Internacional de Epizootias, lo que quiere decir que está considerada una enfermedad importante por sus repercusiones socioeconómicas o de salud pública dentro de los países y también por su incidencia en el comercio internacional de animales o productos de origen animal (Cousins, 2001). En países en desarrollo, la TB bovina esta extensamente distribuida, las medidas de control no son aplicadas o son aplicadas esporádicamente, además, la información epidemiológica disponible sobre esta zoonosis es limitada. Una de las principales razones de interés en la TB bovina es la susceptibilidad del hombre a la enfermedad debido al mismo agente causal, *M. bovis*, siendo a nivel clínico, radiológico y patológico indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*, agente etiológico de la TB en humanos (Grange y Yates 1994; Cosivi *et al.*, 1998).

En general, se considera, pero no se ha demostrado, que *M. bovis* es menos virulento que *M. tuberculosis* para los seres humanos. La enfermedad debido a *M. bovis* puede ser tan severa y extensiva como la debida a *M. tuberculosis* aunque en la mayoría de los casos se presenta como una infección extrapulmonar. En América Latina, se estima un promedio del 2% de casos de TB pulmonar en humanos, y 8% de la no-pulmonar, causadas por *M. bovis*, siendo los porcentajes más altos en regiones donde hay una industria intensiva de ganado lechero (Grange, 2001). En México se calcula que por lo menos un 8% de los casos de TB humana que ocurren en el país pueden ser atribuidos a *M. bovis*. La identificación bacteriológica de *M. bovis* en humanos con TB pulmonar, al igual que la detección en bovinos de *M. tuberculosis*, ratifica la necesidad de mantener

estrecha relación entre los servicios de salud pública y de salud animal en el trabajo de vigilancia y control de la TB (PANAFTOSA/OPS/OMS, 2000).

### 1.3 Etiología

Las micobacterias se adscriben taxonómicamente al género *Mycobacterium*, único de la familia *Micobacteriaceae*, perteneciente al orden Actinomycetales. Las micobacterias son definidas como bacilos delgados en forma de "barra", aeróbicas, inmóviles, que no esporulan, contienen arabinosa, galactosa, y meso-diaminopimelico en la pared celular. Aunque históricamente han sido definidos como organismos no encapsulados, ahora es sabido que poseen una estructura similar a una cápsula (Rastogi *et al.*, 2001). Se tiñen con facilidad con la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) (fucsina fenicada con calor) y su decoloración no es fácil, aun con alcohol acidificado (ácido-alcohol resistencia). Esta última es su principal característica y se debe a la composición de su pared celular, rica en lípidos de alto peso molecular. Todos los microorganismos que se tiñen con la técnica de ZN son llamados bacilos ácido-alcohol resistentes" o BAAR. El género *Mycobacterium* incluye organismos parásitos, saprófitos y formas intermedias. La mayoría de las especies pueden cultivarse *in vitro*. Los microorganismos del género son de crecimiento muy lento comparados con otras bacterias porque los tiempos de división celular son largos y muy variables, y pueden transcurrir varias semanas antes de que sus colonias sean visibles. Es importante confirmar la especie micobacteriana aislada y para ello se puede recurrir a varias pruebas bioquímicas. *M. tuberculosis* tiene la capacidad de producir niacina y carece parcial o totalmente de actividad de catalasa a 68 °C, *M. bovis* es fisiológicamente muy similar a *M. tuberculosis*, pero no produce niacina. Las micobacterias son procariotes cuya pared celular está compuesta esencialmente por dos tipos de polímero, el arabino galactano micolato y el peptidoglicano. Aproximadamente 20 a 40% del peso seco de las micobacterias son lípidos de la pared celular. Los ácidos micólicos (ácidos grasos ramificados hidroxilados) existen también en

bacterias como *Nocardia* y *Corynebacterium*. El llamado factor cordón o de acordonamiento, identificado en la mayoría de las micobacterias, es el 6,6-dimicolato de trehalosa y funciona como tóxico, por lo que tiene que ver con la virulencia de las cepas. Por este factor algunas cepas de *M. tuberculosis* crecen como “cuerdas” o “trenzas” en algunos medios (Balandrano *et al.*, 1996).

*M. bovis*, es un bacilo moderadamente resistente al calor, la desecación y muchos desinfectantes y es fácilmente destruido por la luz solar directa, a menos que esté en un ambiente húmedo; forma parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), el cuál incluye además a *M. tuberculosis*, causante de la TB en humanos, *M africanum*, que también causa TB en humanos y es esencialmente limitado a Africa, *M. microti*, el cual es un patógeno de los pequeños roedores, la cepa vacunal *M. bovis* BCG, y la especie descrita recientemente *M. canetti* (Pfyffer *et al*, 1998). *M. bovis* tiene uno de los más amplios rangos de hospedadores de todos los patógenos conocidos. Se ha conocido la infección en primates, incluido el hombre, ungulados y carnívoros, tanto domésticos como silvestres (Morris *et al.*, 1994; O’Reilly y Daborn 1995).

#### **1.4 Vías de infección**

Existen numerosas rutas de infección mediante las cuales la TB se disemina al ganado, estas se encuentran influenciadas por factores tales como la edad, el ambiente y clima, y las prácticas de manejo que prevalecen en las granjas (Neill *et al.*, 1994; Goodchild y Clifton-Hadley 2001; Pollock y Neill 2002). Los hallazgos epidemiológicos, *postmortem* y experimentales indican que la TB en animales es principalmente una enfermedad respiratoria (Fiallo *et al.*, 1992; O’Reilly y Daborn 1995), probablemente iniciada en el tracto respiratorio superior (Morrison *et al.*, 2000). La inhalación de *M. bovis* es, por lo tanto, la ruta más probable e importante de infección en bovinos, y la ingestión de pastos, agua o fomites contaminados es considerada secundaria a la diseminación respiratoria.

También se ha citado la infección cutánea que requiere la contaminación a partir de otra lesión primaria y en casos de la infección congénita la transmisión es a través de los vasos sanguíneos hacia el feto desde la infección presente en el útero de la madre; en raras ocasiones, la transmisión congénita ocurre en el ganado si los órganos sexuales están infectados. La transmisión iatrogénica a la glándula mamaria ha resultado del uso de infusiones contaminadas (Neill *et al.*, 1994, 2001; Pollock y Neill 2002). Otra fuente de posible infección ocasional es la introducción mecánica del germen por instrumentos quirúrgicos (Luna-Martínez *et al.*, 1996).

La infección en humanos con *M. bovis* casi siempre ocurre por inhalación de aerosoles o por consumo de leche que contiene al bacilo. Los aerosoles generados durante el manejo de canales en rastros también poseen un riesgo de infección. Una tercera, y menos común, ruta de infección es por inoculación traumática dentro de la piel. El ganado no es la única fuente de infección de *M. bovis*. Los seres humanos con TB abierta debido a *M. bovis* pueden infectar al ganado, principalmente por la ruta respiratoria, o los trabajadores con TB genitourinaria debido a *M. bovis* infectan al ganado al orinar en los establos bovinos. De este modo, un ciclo completo de transmisión de ganado a seres humanos y de regreso al ganado puede llegar a ser establecido, con consecuencias a la salud pública y a la economía (Grange, 2001).

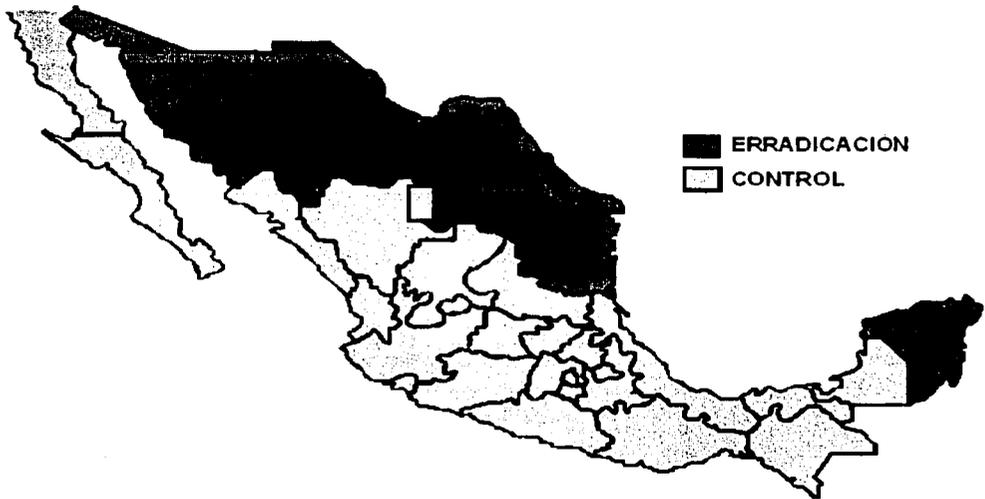
### **1.5 Patogenia de la Tuberculosis**

La infección con *M. bovis* comienza con la formación de un foco primario el cual se establece siguiendo la interacción del hospedador y el patógeno. Dentro del foco de infección, los macrófagos frecuentemente asumen una apariencia distinta (células epitelioides) y se forman células gigantes del tipo Langhan debido a una fusión de macrófagos. Una mezcla de células epitelioides y gigantes forman el centro de un tubérculo joven, rodeado por una zona de linfocitos, células

plasmáticas y monocitos y, a medida que la lesión progresa, el tubérculo desarrolla fibroplasia periférica y necrosis caseosa central; la mineralización puede ser observada en esta área de necrosis caseosa. La necrosis caseosa es el resultado de una reacción de hipersensibilidad retardada. La apariencia engrosada del tubérculo es usualmente de un nódulo firme blanco o amarillento. La calcificación en áreas de necrosis caseosa es común. Esta lesión primaria, junto con la lesión en el nódulo linfático (NL) regional es denominado el "complejo primario". Las rutas por las cuales el ganado es infectado, la respuesta inmune del hospedador y la virulencia del organismo determinan principalmente la manifestación de la enfermedad (Neill *et al.*, 1994). Las lesiones pueden persistir en el ganado, con o sin progresión, o pueden sanar completamente. El desarrollo de las lesiones puede comprometer ambos pulmones y puede ser unilateral o bilateral, ocurriendo predominantemente en el lóbulo caudal y frecuentemente en el tercio distal de los lóbulos. Las lesiones en pulmón son menos comunes y la frecuencia con que se observan en la inspección en rastro es significativamente menor que la que se observa en NL torácicos. Estas lesiones generalmente se presentan aisladas y son extremadamente pequeñas en tamaño (diámetro <1 cm), por lo tanto se requiere un examen extremadamente cuidadoso para encontrarlas. También se han reportado lesiones en tonsilas, o únicamente en NL mesentéricos, mientras que la TB generalizada se caracteriza por lesiones en órganos tales como el hígado, riñones y ubre, o en las meninges y cavidades serosas (Neill *et al.*, 2001). La susceptibilidad del ganado a TB depende de la dosis y la ruta de infección, con poca influencia de otros factores tales como la genética del hospedador o el estatus nutricional (Pollock y Neill 2002).

## 1.6 Situación actual de la Tuberculosis bovina en México

En México, el problema de la TB bovina es grave, la prevalencia en el ganado lechero es cercana al 16%, aunque en algunos establos puede ser mayor. La prevalencia de la TB bovina en la parte norte de México, se ha estimado en 2.1% para el ganado lechero y en un 0.1% para el ganado de carne. En la zona centro y sur de México, los valores de la TB bovina son mayores, en estas regiones se han detectado establos lecheros con prevalencias mayores al 25% de TB. Una alta proporción de establos no participan en ninguna campaña de control, y se estima que del 30% al 40% de la leche que se produce se vende como leche cruda. En el sector pecuario la TB bovina causa cuantiosas pérdidas por bajas en la producción, desecho prematuro o muerte de los animales. Además, representa una barrera no arancelaria para la comercialización de bovinos para engorda con los Estados Unidos de Norteamérica (Milián y Gallegos 2001). Por esta razón, las autoridades sanitarias de México implementaron una Campaña Nacional para el Control y Erradicación de la Tuberculosis Bovina (CANETB), iniciada en 1991, basada en la estrategia de "prueba y sacrificio", y que ha logrado reducir la prevalencia de esta enfermedad en el norte del país, considerándose ya 7 Estados en etapa de erradicación (**Figura 1**). De las 3 293 995 cabezas de ganado a las que se les aplicó la prueba de tuberculina en el año 2002, pertenecientes a 75 126 hatos bovinos, 3 259 964 fueron negativas a esta prueba y las restantes 34 031 fueron reactivos, representando el 1.03% del total de cabezas evaluadas; de estas, 1 058 839 fueron ganado de carne, 458 981 ganado de leche, 752 171 ganado de doble propósito, 755 268 ganado para movilización y 268 736 fue ganado para exportación<sup>1</sup>.



**Figura 1.** Programa de Tuberculosis Bovina actualizado a Enero 2002. Clasificación de los Estados Mexicanos de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995.

De 1996 a julio de 2001, se reportaron en los laboratorios que constituyen la Red de Diagnóstico de Tuberculosis, 13 135 animales sospechosos de TB, de los cuales se obtuvieron 2626 (20%) aislamientos de micobacterias, 2216 fueron tipificadas como *M. bovis*, 37 como micobacterias atípicas, y 95 como *M. spp.* Se trabajaron en los laboratorios 27 muestras de origen porcino de los cuales 3 fueron positivos a TB causada por *M. bovis*. Se recibieron también 3 animales provenientes de un Zoológico, de estos, en una llama se aisló el *M. bovis*, el animal presentaba lesiones características de TB. Esta cifra habla de muy pocos aislamientos, tomando como base que la mayoría de las muestras actualmente son envíos procedentes de los rastros que sacrifican reactores y animales que a la inspección durante la matanza regular presentan lesiones sospechosas de TB, de lo que varios autores señalan que en un alto porcentaje de las mismas son por TB. Existe aún subnotificación por parte de los Laboratorios de Diagnóstico, esto se ve reflejado en la poca cantidad de muestras que se reportan y en el reducido número de aislamientos de micobacterias (Betancourt *et al.*, 2001).

## **1.7 Diagnóstico**

El control y erradicación de la TB depende de la detección oportuna y remoción de la fuente potencial de infección tanto dentro como fuera del establo. Es por ello que la rápida identificación y eliminación de los animales infectados es un requisito en el control de la enfermedad.

### **1.7.1 Aislamiento bacteriológico.**

El diagnóstico bacteriológico de *M. bovis* se realiza a partir de muestras sospechosas de animales reactores a la prueba cervical comparativa o de lesiones sugestivas de TB de animales no probados, con el fin de determinar la infección en un hato (INIFAP/CENID-Microbiología, 1997b), siendo la prueba definitiva para el diagnóstico de la enfermedad. Esta puede tomar de 6 a 8 semanas y aún más si

se aplican pruebas bioquímicas para la identificación especial de *M. bovis*, debido a que otras micobacterias pueden causar lesiones similares a las de TB. El procedimiento de descontaminación del tejido puede afectar significativamente la recuperación de la micobacteria, siendo el cloruro de hexadecilpiridinium menos tóxico a la concentración de 0.075% sin efectos adversos para *M. bovis*. También requiere de un medio enriquecido para crecer en un aislamiento primario, como son los basados en huevo (Stonebrink y Lowenstein Jensen con piruvato) o basado en agar y enriquecido con suero y/o sangre (Middlebrook 7H11 enriquecido), y agar sangre (B83). La identificación de los aislados de *M. bovis* tradicionalmente está basada en la morfología de la colonia y características de tinción, seguido por pruebas bioquímicas. En el medio basado en huevo la colonia típica es pequeña, redonda, amarilla, con orillas irregulares y superficie granular; en agar son blancas, delgadas, rugosas y planas con un centro en montículo. Existen varias pruebas bioquímicas para la identificación de *M. bovis*, pero la más utilizada es la susceptibilidad al ácido carboxílico 2-thiopheno hidrazina e isoniazida (Corner 1994; Adams 2001).

### **1.7.2 Pruebas basadas en la respuesta inmune mediada por células:**

**1.7.2.1 Intradermoreacción (Prueba de hipersensibilidad tipo IV).** Es la principal prueba diagnóstica utilizada en México por la CANETB. Ha sido usada para el diagnóstico *in vivo* de la TB en el ganado por más de 100 años, siendo el procedimiento clave en pruebas nacionales y programas de sacrificio de TB bovina lo que ha facilitado la erradicación de la enfermedad en muchas partes del mundo. La prueba esta basada en la respuesta de hipersensibilidad retardada del animal a la inyección intradérmica de la tuberculina, seguida por la medición del sitio por la presencia de inflamación a las 72 hr postinyección. El antígeno de elección es el derivado proteico purificado (PPD) que se obtiene de la cepa AN5 de *M. bovis* (PPD bovino), para la realización de la prueba simple caudal o bien junto con el

PPD de la cepa D4 de *M. avium* (PPD aviar) para la prueba doble comparativa. El rango de sensibilidad estimada de esta prueba va del 70% al 90%, mientras que la especificidad varía de 75% a 99.8%. La prueba caudal tiene una sensibilidad del 72% con una especificidad del 98.8%, y la doble comparativa tiene una sensibilidad del 68.6%-95% con una especificidad de 88.8%-99.9% (Adams, 2001). Aunque las tuberculinas PPD han sido descritas como "puras", están constituidas por una mezcla compleja de proteínas, lípidos, azúcares y ácidos nucleicos que incluyen una gran variedad de antígenos, muchos de los cuales son comunes a varias especies de micobacterias lo que puede ocasionar que se presenten reacciones cruzadas. También ha sido reconocido que algunos animales, incluyendo muchos con enfermedad severa generalizada, pueden no reaccionar a la tuberculina, este estado es referido frecuentemente como anérgico (Monaghan *et al.*, 1994). El rango de falsos negativos está influenciado por el tiempo de exposición a la cepa, regulación supresiva/anérgica de la respuesta inmune, inyección de insuficiente tuberculina, uso de tuberculinas de reducida potencia, inmunosupresión durante el postparto temprano, desensibilización seguida de la prueba de tuberculina y variabilidad entre los observadores (Adams, 2001); mientras que la restricción en la dieta no está relacionada con los resultados falsos negativos (Doherty *et al.*, 1996).

**1.7.2.2 Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ).** Esta prueba se basa en la estimulación *in vitro* de sangre heparinizada, usando como antígeno el PPD de micobacterias. Como resultado de la estimulación antigénica, los linfocitos T circulantes presentes en la muestra de sangre secretan IFN- $\gamma$  (Domingo *et al.*, 1995). La sangre completa es incubada toda la noche con PPD bovino, PPD aviar o antígenos como controles negativos, y el IFN- $\gamma$  producido en el sobrenadante del plasma es medido por medio de un ensayo inmunoenzimático. Una respuesta de IFN- $\gamma$  predominante hacia el PPD bovino es indicativo de la infección de TB. La sensibilidad varía de 81.8% y 100% para TB bovina confirmada por cultivo y la especificidad varía entre 94% y 100%. La prueba de IFN- $\gamma$  detecta infecciones más

tempranas de *M. bovis* que la prueba intradérmica. El ganado es evaluado de 7 a 30 días después de la prueba simple caudal positiva, y los resultados no se ven afectados por una pobre nutrición y son parcialmente afectados por el tratamiento con dexametasona y pariciones (Wood y Jones 2001). Esta prueba es ideal donde la prevalencia de TB es alta o donde esta enfermedad se disemina rápidamente. Ha sido de gran valor para el diagnóstico de otras enfermedades en rumiantes, al igual que de la TB en humanos (Wood y Rothel 1994; Wood y Jones 2001). Sin embargo, no detecta animales anérgicos y además es costosa.

### **1.7.3 Pruebas basadas en la respuesta inmune humoral:**

**1.7.3.1 Inmunoensayo ligada a enzima (ELISA, Enzyme-linked immunosorbent assay).** Los ensayos inmunoenzimáticos son muy útiles para determinar la presencia de anticuerpos contra *M. bovis* en el suero de animales infectados, especialmente en estados avanzados de la infección. Diversos estudios han mostrado que hay una relación inmune celular y humoral en la TB (Ritacco, 1990) y por lo tanto animales anérgicos que dan una pobre respuesta a la tuberculina pueden ser detectados por esta prueba (Plackett, 1989). El ELISA ha demostrado ser una de las pruebas más específicas para el diagnóstico de la TB bovina, aun empleando un antígeno como el PPD bovino (Díaz *et al.*, 2003), o utilizando proteínas recombinantes, purificadas del CMTB (Amadori *et al.*, 2002). El ELISA ha sido capaz de detectar la infección por *M. bovis* en diferentes situaciones de prevalencia, demostrando su eficiencia en identificar hatos infectados, con una especificidad entre el 92 y 99% (Silva, 2001). La principal ventaja del ELISA es que identifica animales infectados no reactores a la tuberculina e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, debido a su baja sensibilidad (60%  $\pm$  10) no identifica a todos los animales infectados, por lo cual no se recomienda su empleo como prueba única para el diagnóstico de la TB bovina (Díaz *et al.*, 2003), también

es de ayuda para elucidar el estatus de la infección en la granjas dudosas, y con intradermoreacciones inconclusas (Amadori *et al.*, 2002).

#### **1.7.4 Pruebas basadas en la detección de lesiones:**

**1.7.4.1 Inspección *postmortem* (macroscópico).** La inspección *postmortem* en los rastros constituye una de las actividades más importantes en la vigilancia de la TB bovina. Su principal misión es detectar, registrar y comunicar a las unidades receptoras del sistema los datos de los animales con lesiones macroscópicas de TB identificando el origen o procedencia, de esta manera, la información puede generar el inicio del rastreo epidemiológico. Para que la inspección *postmortem* garantice la vigilancia efectiva de la TB, el examen de las regiones cefálica y abdominal debe ser minucioso, evitándose así que animales con lesiones macroscópicas poco notorias pasen inadvertidos en la inspección. En México, la tasa por 10,000 bovinos sacrificados bajo inspección oficial con lesiones macroscópicas fue de 10 durante el período 1994-1998 (PANAFTOSA/OPS/OMS, 2000). Se ha sugerido que en las etapas tempranas de los programas de control de la TB bovina, cuando la prevalencia de la enfermedad es alta, un gran avance puede llevarse a cabo en el diagnóstico de la TB bovina basado en la identificación de lesiones macroscópicas típicas durante la inspección *postmortem*. La mayoría de las infecciones de TB en el ganado son adquiridas por inhalación. Entre el 70% y el 90% de las lesiones son localizadas en los NL de la cabeza o en la cavidad torácica (Corner, 1994), con mayor frecuencia en los NL retrofaríngeos, mediastínicos, traqueobronquiales, mesentéricos o la combinación de estos, y en menor proporción en los NL mandibulares, parotídeos, mesentéricos y hepáticos, y en pulmón, hígado, ubre y cartilago del esternón (Corner 1994; Milian-Suazo *et al.*, 2000). La falta de lesiones visibles puede ser debido a una variedad de razones, por ejemplo, las lesiones visibles pueden estar presentes y no observadas, el animal puede estar

en las etapas tempranas de la infección cuando las lesiones son muy pequeñas para visualizarlas o la sensibilidad a la tuberculina puede ser debida a la infección con otras micobacterias diferentes a *M. bovis*. Se ha concluido que la inspección en rastro tiene baja sensibilidad aunque es un método efectivo, y de bajo costo, que permite el monitoreo de un gran número de animales con lesiones de TB (Corner, 1994), y que por lo tanto puede proveer de un diagnóstico más rápido, y evita retrasos en la intervención de la enfermedad mientras se esperan los resultados del aislamiento bacteriológico del laboratorio (Milian-Suazo *et al.*, 2000).

**1.7.4.2 Histopatológico (microscópico).** En el laboratorio y para efectos de campaña, el hallazgo de lesiones típicas de TB y del BAAR por análisis histopatológico es considerado el método de diagnóstico presuntivo más rápido de la enfermedad. El objetivo es realizar en bovinos el diagnóstico histológico diferencial de la TB en lesiones granulomatosas presentes en NL y otros órganos, para la identificación de organismos ácido-alcohol resistentes con las pruebas confirmatorias mediante coloración de hematoxilina-eosina contrastada, ZN y/o nueva fucsina o auramina en reactores positivos durante el estudio *postmortem* (INIFAP/CENID-Microbiología, 1997a), pero carece de suficiente sensibilidad y especificidad para identificar el bacilo. La prueba microscópica más eficiente para identificar lesiones de infecciones micobacterianas es la tinción de hematoxilina-eosina. Las lesiones típicas causadas por *M. bovis* en el ganado son descritas como centros de necrosis caseosa, usualmente con cierta calcificación, con un borde de células epiteliales, alguna de las cuales forman células gigantes multinucleadas, y de pocos a numerosos linfocitos y neutrófilos. Usualmente esta presente un borde externo de tejido conectivo fibroso, dando a la lesión una apariencia focal y encapsulada; más de un foco de infección puede ser visto en diferentes estados de desarrollo, y el proceso dinámico del desarrollo puede mostrar lesiones que coalescen, siendo las lesiones focales o granulomas multifocales las más comúnmente encontradas en TB bovina (Thoen *et al.*, 1995).

### 1.7.5 Pruebas basadas en la amplificación de ADN micobacteriano:

Las enfermedades micobacterianas han sido siempre difíciles de estudiar, particularmente en el diagnóstico y en investigaciones epidemiológicas de TB bovina, debido a que las técnicas clásicas para diferenciar a los miembros del CMTB recaen en metodologías fenotípicas (aquellas que detectan las características expresadas por el microorganismo) (Maslow *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1994; Olive y Bean 1999). Actualmente, las pruebas de diagnóstico se han enriquecido con el desarrollo de la biología molecular. Así, los métodos basados en la amplificación del ADN de las micobacterias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la identificación de secuencias de ADN específicas dentro del genoma de *Mycobacterium*, las técnicas de purificación de ADN y el establecimiento de mapas de restricción, permiten identificar a las distintas especies de este género bacteriano en muestras clínicas, tanto en humanos como en bovinos, considerándose pruebas sensibles y específicas (Eisenach *et al.*, 1990; Cousins *et al.*, 1991; Liébana *et al.*, 1995; Wards *et al.*, 1995; Cousins *et al.*, 1998).

Eisenach *et al.*, (1990), secuenciaron un segmento de ADN repetitivo en el cromosoma de *M. tuberculosis* y lo usaron como blanco para amplificar una secuencia de 123 pares de bases (pb) usando el PCR en diferentes cepas. Después de 30 ciclos de amplificación, el producto fue detectado con 1 fg de ADN, lo que es equivalente a una copia del cromosoma de *M. tuberculosis*, demostrando que la secuencia es específica para miembros del CMTB, proporcionando las bases para detectar a *M. tuberculosis* directamente en material clínico. También se ha descrito una PCR anidada (PCRa) desarrollada para usarse a partir de frotis de esputo usando la secuencia de inserción (IS) 6110, presente en todos los miembros del CMTB. El uso de 30 ciclos en cada período de amplificación, permite obtener productos de 580 y 181 pb, y detecta tan poco como 2 genomas de ADN (Wilson *et al.*, 1993). Otro método fue utilizado por Kogagöz *et al.*, (1993) a partir de muestras de esputo, para el diagnóstico de TB pulmonar, identificando

por PCR a *M. tuberculosis* tanto en casos ZN-cultivo positivas, como en ZN-negativo-cultivo positivo, y también en 4 de 9 casos con diagnóstico ZN-cultivo negativo pero clínicamente sospechosos de TB. En este caso se utilizó la secuencia de iniciadores desarrollado por Eisenach *et al.*, (1990), detectando menos de 10 organismos con 35 ciclos de amplificación. Los miembros del CMTB han sido identificados en el ganado usando leche, aspirados de NL, e hisopos nasales, en animales reactivos y no reactivos a la tuberculina, demostrando que 52% de estos últimos eran falsos negativos al utilizar el PCR, amplificando un fragmento de 580 pb de la IS6110 (Vitale *et al.*, 1998).

Para la identificación de *M. bovis* se ha amplificado el gen que codifica para la proteína MPB70 que por PCR produce un fragmento de 372 pb utilizando ADN de aislamientos de *M. bovis* y de miembros del CMTB; la sensibilidad fue tal que se pudo detectar en la reacción una sola micobacteria (Cousins *et al.*, 1991). A partir de muestras de tejidos colectadas al sacrificio se ha podido amplificar una región de 317 pb de la IS6110, con 30 ciclos de amplificación; este procedimiento se consideró útil para la identificación de *M. bovis* y otros miembros del CMTB directamente de este tipo de muestras, aunque no fue tan sensible como el cultivo, ya que solo detectó el 71.4% de las muestras ratificadas como *M. bovis* por cultivo (Liébana *et al.*, 1995). Wards *et al.*, (1995) también utilizaron este tipo de muestras de una variedad de animales para amplificar un segmento de 248 pb de la IS1081, presente en seis copias en cepas de *M. bovis* y otros miembros del CMTB; la PCR fue capaz de detectar 1 fg de ADN purificado, o equivalente a 0.2 genomas, pero también tan solo pudo detectar 10 organismos de cultivos puros y entre 200-500 organismos de tejidos inoculados con organismos cultivados. En general, es posible la identificación de *M. bovis*, sin requerir del aislamiento previo, prácticamente a partir de cualquier muestra biológica.

Para las evaluaciones histopatológicas, la mayoría de los tejidos animales son fijados en formol y embebidos en parafina (TEP), esta técnica de

almacenamiento ha sido comúnmente utilizada por los patólogos en los laboratorios veterinarios (Bascuñana y Belák 1996), siendo el único material disponible cuando no existe acceso a cultivos bacterianos. Esto ocurre cuando no se colecta la muestra clínica al no estar presentes las lesiones típicas de TB, o por no contar con suficiente material clínico para el cultivo bacteriológico, o porque el microorganismo no crece en dicho cultivo. Debido a esto, se han tratado de aplicar las técnicas de biología molecular a los TEPs en el diagnóstico de rutina de infecciones micobacterianas. Fiallo *et al.*, (1992) analizaron los efectos de diferentes fijadores (formalina buferada neutra al 10%, etanol y basados en mercurio) y tiempos de fijación en la detección de ADN de *M. leprae* por PCR, para ello amplificaron una región de 360 pb del gen de la proteína de 18-kDa a partir de TEPs en tejido de biopsias de piel, demostrando que el tejido adecuadamente fijado con dos fijadores estándares (formalina buferada neutra al 10% y etanol al 50 o 70%) puede ser analizado por PCR para la presencia de *M. leprae* sin la pérdida en la especificidad y solo una mínima disminución en la sensibilidad comparada con las especificidades y sensibilidades obtenidas al usar muestras frescas y no fijadas. Una PCR para la evaluación especie-específico de micobacterias en muestras histológicas (TEPs) fue desarrollado para amplificar un fragmento del ADN que codifica para el ribosoma 16 ARN ribosomal (rARN) de la micobacteria, siendo valioso para el diagnóstico de esta infección y para la evaluación de aquellas micobacterias que no pueden estar disponibles por cultivo, como *M. leprae* (Richter *et al.*, 1995).

En la necesidad de detectar en forma rápida y sensible a *M. tuberculosis* en muestras de tejido, se ha evaluado la PCR en TEPs, siendo el blanco de amplificación un segmento de la IS6110 de 123 pb del CMTB, mostrando una sensibilidad del 100% y especificidad del 93%, con un valor predictivo positivo (VP+) de 76.9% y un valor predictivo negativo (VP-) del 100% cuando se comparó con el cultivo positivo a *M. tuberculosis*; al compararlo con el diagnóstico clínico de TB la sensibilidad fue de 73.6% y 100% de especificidad, con un VP+ de 100% y

un VP- de 88.6% (Salian *et al.*, 1998). También han comparado la sensibilidad y especificidad de cuatro PCRa a partir de este tipo de material. Los blancos fueron tres secuencias genómicas (*mtp40*, el gen que codifica para el antígeno de 65-kDa, y la IS6110) con diferentes masas moleculares y número de repeticiones dentro del genoma de *M. tuberculosis*, la más alta sensibilidad se obtuvo al amplificar la IS6110, entre 80 a 87%, con el gen del antígeno de 65-kDa se obtuvo una sensibilidad pobre, de 47 a 60%, y todos los PCRs, a excepción de esta última secuencia, mostraron una especificidad del 100% (Marchetti *et al.*, 1998). Frevel *et al.*, (1999) del mismo modo combinaron tres PCRs diferentes (con el gen del antígeno de superficie 65-kDa y con la IS6110) para evaluar el impacto de esta técnica en la identificación de infecciones micobacterianas al realizar un estudio retrospectivo en TEPs comparando los resultados con las características histológicas y datos clínicos. Usando el cultivo como el método de referencia, la sensibilidad para la detección de las micobacterias del CMTB fue del 90%, la especificidad del 92%, el VP+ de 81% y el VP- fue de 96%. La sensibilidad para detectar micobacterias no tuberculosas fue del 100% y la especificidad del 78%, el VP+ fue de 26% y el VP fue del 100%. Otros autores solo han usado la IS6110 en PCRa para diagnosticar *M. tuberculosis* a partir de ADN obtenido de tejido congelado y TEPs (Caldarelli-Stefano *et al.*, 1999), y en muestras teñidas para citología de pacientes con TB extrapulmonar (Vago *et al.*, 2000), amplificando exitosamente dicha región.

La PCR combinada con un control interno de amplificación y análisis de restricción enzimática de los amplicones proporcionó un método rápido, sensible y fiable para el diagnóstico de laboratorio de rutina, para detectar e identificar *M. bovis* y especies de *M. avium-M. intracellulare* en TEPs, al amplificar un segmento de 424 pb del gen que codifica para el antígeno de superficie de la micobacteria de 65-kDa (Bascuñana y Belák 1996). Usando como blancos de amplificación al gen de la proteína MPB64, la IS6110, la IS1110 y rARN16S, se ha podido diferenciar 1) al CMTB, 2) a *M. bovis* y *M. tuberculosis*, y 3) *M. avium*, *M.*

*intracellulare* y *M. paratuberculosis*, respectivamente, en TEPs de pacientes con TB, sarcoidosis, o enfermedad de Crohn, permitiendo diferenciar a las micobacterias relacionadas genéticamente en más detalle que en otros métodos moleculares (Ikonomopoulos *et al.*, 2000). Así también se ha identificado con esta técnica a las micobacterias del complejo *M. avium* (CMA), en TEPs con resultado positivo al cultivo de casos con infecciones por el CMA, evaluando cada muestra con 5 grupos de iniciadores (rARN16S, IS900, IS901, IS1245, y el gen que codifica para una proteína de choque térmico, que detecta 1 o ambas subespecies de *M. avium*) indicando que los iniciadores para la rARN16S fueron los más útiles para la identificación por PCR de *M. avium* en TEPs de especies no rumiantes (Miller *et al.*, 1999). Miller *et al.*, (2002) también han identificado por PCR al CMTB (IS6110 o 16SrARN) y *M. avium* (IS900) en TEPs de rumiantes con lesiones macroscópicas sospechosas y cultivo negativo, demostrando que la evaluación de este tipo de muestras por PCR, en combinación con el cultivo bacteriológico, puede incrementar la eficiencia del diagnóstico de laboratorio para detectar e identificar las infecciones micobacterianas más comunes en rumiantes. Igualmente, se ha podido detectar la micobacteria en TEPs de tejidos no descalcificados de casos de TB en el ganado y ciervo (*Cervus elaphus*) con lesiones características y organismos ácido-alcohol resistentes al amplificar el fragmento de 123 pb de la IS6110 específico para organismos del CMTB (Miller *et al.*, 1997). Tomando juntas estas observaciones, es claro que la detección del microorganismo en TEPs sería una prueba útil en investigaciones epidemiológicas para rastrear los animales infectados al hato de origen. Actualmente algunos países utilizan esta prueba como uno de los métodos oficiales para confirmar la presencia de *M. bovis* en TEPs de animales con lesiones compatibles de TB (USAHA, 2001). En México, se ha evaluado la prueba de PCR a partir de muestras de tejidos (NL) de animales positivos a la prueba de tuberculina del Noreste de México, y los resultados se compararon con las pruebas oficiales de laboratorio, histopatología y aislamiento bacteriológico, indicando que del 100% de

las pruebas positivas a histopatología y cultivo, lo fueron también para PCR (Morales *et al.*, 2001).

Otro método basado en la PCR que ha demostrado ser útil en la tipificación de las micobacterias es el conocido como tipificación de oligonucleótidos espaciadores o spoligotyping (Kamerbeek *et al.*, 1997). Este método está basado en la detección de polimorfismo del ADN en un locus cromosomal en particular, la región de "Repetición Directa" (DR, por sus siglas en inglés), las cuáles únicamente están presentes en el CMTB. La región DR en *M. bovis* BCG, primera en ser descrita, consiste en secuencias de repeticiones de 36 pares de base (pb) las cuáles están separadas por segmentos de DNA no repetitivo (espaciadores) de 35 a 41 pb. El número de copias de la secuencia DR en *M. bovis* BCG es de 49, en otras especies del CMT el número de elementos DR se encontró que varía significativamente. Algunos de estos segmentos, 37 de *M. tuberculosis* y 6 de *M. bovis* han sido secuenciados y fijados a membranas de nitrocelulosa y la diferenciación entre cepas se hace basados en la presencia o ausencia de algunos de estos espaciadores, los cuales están presentes solamente una vez en la región DR, pero ocasionalmente algunos son encontrados por duplicado, separados por uno o varios DR y otros espaciadores. Cuando las regiones DR de varias cepas son comparadas, se observa que el orden de los espaciadores es casi igual en todas las cepas, pero ocurren las deleciones o inserciones de espaciadores de DRs.

Aunque generalmente esta técnica se ha utilizado en aislados del CMTB, se ha mencionado que una gran variedad de material clínico, como esputo, tejido, o lavados broncoalveolares, puede ser sujeto al spoligotyping, para detectar y diferenciar simultáneamente a las micobacterias del CMTB. Ofrece la posibilidad de detectar rápidamente focos de infección de TB, sin necesidad de cambiar los métodos tradicionalmente usados en el laboratorio para el manejo y preparación de muestras clínicas. El Spoligotyping es una herramienta valiosa y sensible que

puede permitir el análisis retrospectivo de muestras almacenadas (tejido pulmonar) como lo han demostrado Qian *et al.*, (1996) para el genotipo "Beijing" de *M. tuberculosis*, que ha sido prevalente en el sureste asiático desde mediados de 1950s; se ha utilizado con éxito para tipificar a *M. tuberculosis* en preparaciones microscópicas de ZN y auramina (Kamerbeek *et al.*, 1997; van der Zanden *et al.*, 1998). También permite, a partir de TEPs, distinguir los miembros con características propias del CMTB (van Soolingen *et al.*, 1997, 1998), cuando existe sospecha de TB y el cultivo microbiológico no esta disponible (van der Zanden *et al.*, 2001) lo que nos daría algunas ideas de la dinámica de cepas de TB dentro y entre poblaciones en el pasado (Qian *et al.*, 1999). Recientemente se ha descrito la utilización de spoligotyping directamente en muestras de tejido (Roring *et al.*, 1998, 2000) para la detección y caracterización de *M. bovis* de exudado nasal (Díaz *et al.*, 2003). Una ventaja adicional de este método es que permite diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, ya que los espaciadores 39 a 43 sólo están presentes en la primera (Kamerbeek *et al.*, 1997; Cousins *et al.*, 1998; Roring *et al.*, 1998) (**Figura 2**). Sin embargo, no se ha evaluado la utilización de esta técnica en TEPs obtenida de muestras de bovinos. La posible tipificación de *M. bovis* a partir de estas muestras permitiría iniciar estudios epidemiológicos sin necesidad de tener el cultivo.



**Figura 2.** Patrones subespecie-especificos dentro de varios miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, definidos por spoligotyping.

## 2. JUSTIFICACIÓN

El tejido fijado en formol y embebido en parafina, es uno de los materiales utilizados en evaluaciones histopatológicas en laboratorios de diagnóstico veterinario, especialmente el de TB, y del que se puede disponer cuando no existe el acceso a cultivos bacterianos. Esto ocurre cuando no se colecta la muestra clínica al no estar presentes las lesiones típicas de TB, o por no contar con suficiente material clínico para el cultivo bacteriológico, o porque el microorganismo no crece en dicho cultivo. Debido a esto, se han tratado de aplicar las técnicas de biología molecular a los TEPs en el diagnóstico de rutina de infecciones micobacterianas. El utilizar este tipo de material en reacciones de PCR para amplificar el ADN de las micobacterias proporcionaría un método relativamente simple y sensible para diagnosticar un gran número de muestras. Además, el spoligotyping permitiría la tipificación de estos microorganismos directamente en especímenes conservados. Por otra parte, el implementar nuevas técnicas de laboratorio para el diagnóstico definitivo de la TB bovina, dará una gran ventaja a la Campaña Nacional contra dicha enfermedad si éste llega a realizarse en una semana, en lugar de varias, después de la colección del tejido, al iniciar investigaciones epidemiológicas para rastrear los animales infectados al hato de origen.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Identificar y tipificar molecularmente a *Mycobacterium bovis* a partir de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina, utilizando las pruebas de PCR y spoligotyping.

#### **3.1 Objetivos particulares.**

**3.1.1** Estandarizar la técnica de extracción de ADN a partir de tejido fijado en formol y embebido en parafina.

**3.1.2** Estandarizar la prueba de PCR para la amplificación de la IS6110 a partir de ADN de la micobacteria obtenido de tejidos conservados.

**3.1.3** Estandarizar la prueba de spoligotyping a partir de ADN de la micobacteria obtenido de tejidos conservados.

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria (CENID-Microbiología), Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

##### 4.1 Tejido fijado en formol y embebido en parafina (TEP)

Se utilizaron 42 TEPs que fueron procesados por el Laboratorio de Micobacterias del Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA) en Santa Ana Tecamac, Estado de México. Estos TEPs se seleccionaron con base en los resultados de pruebas oficiales de laboratorio, como histopatológica y bacteriológica realizadas en dicho laboratorio (**Cuadro 1**), durante los años de 1999 al 2002.

##### Cuadro 1.

Características de los 42 TEPs seleccionados de acuerdo a pruebas oficiales de laboratorio.

| N° casos | Histopatología                                    | Aislamiento bacteriológico     | Tipificación  |
|----------|---|--------------------------------|---|
| 6        | Diagnóstico diferente a TB                        | 4 negativas<br>2 no trabajadas | -   |
| 22       | 19 diagnóstico TB<br>3 diagnóstico sugestivo a TB | <i>Mycobacterium spp.</i>      | 21 <i>Mycobacterium bovis</i><br>1 Micobacteria atípica |
| 14       | 12 diagnóstico TB<br>2 diagnóstico sugestivo a TB | 13 negativas<br>1 no trabajada | -   |

#### 4.2 Extracción del ADN micobacteriano

Para la extracción del ADN genómico micobacteriano a partir de los TEPs, se probaron cuatro diferentes métodos de extracción. En cada uno de los métodos se utilizaron 10 diferentes TEPs para una evaluación preliminar, y escoger el método adecuado que se aplicó en las 42 muestras; también se utilizó una hoja de bisturí por bloque para realizar el corte del tejido, con el fin de evitar la contaminación entre muestras.

**4.2.1 Método 1 (M1)** (Banerjee *et al.*, 1995). Las muestras de tejido fueron obtenidas por cortes de secciones seriadas de 5  $\mu\text{m}$  a partir de bloques de parafina. Se transfirieron los cortes a tubos nuevos estériles (LABCON, San Rafael, CA, USA) para microcentrifuga de 1.5 ml y se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer de digestión (Tris-HCl (AMRESCO, Solon, Ohio, USA - J.T. Baker, Xalostoc, México) 50 mM, pH 8.5; EDTA (AMRESCO, Solon, Ohio, USA) 1 mM y Tween (J.T. Baker, Xalostoc, México) 20 0.5%), aplastando suavemente los cortes con puntas estériles. Los tubos se colocaron en un horno de microondas (SAMSUNG) a radiación de alto poder (500 W) por 90 segundos (s), en segmentos de 15 s hasta llegar a 90 s y se centrifugaron a 12,000 x g por 10 min a temperatura ambiente. El anillo de parafina sólida que se formó sobre el buffer que contiene la pastilla de tejido, se retiró cuidadosamente por las paredes del tubo con una punta estéril. La pastilla de tejido libre de parafina se resuspendió en buffer y se agitó cuidadosamente. Se le agregó a cada tubo 2.4  $\mu\text{L}$  de 16.5 mg/ml de Proteinasas K (SIGMA, St Louis, MO, USA), concentración final 200  $\mu\text{g/ml}$  y se dejaron las muestras toda la noche a 42 °C o 3 h a 55 °C. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 6000 x g y se transfirió el sobrenadante que contiene el lisado de ADN a nuevos tubos estériles. Finalmente se calentaron durante 10 min a 95 °C para desnaturalizar la proteasa residual y proteínas contaminantes.

**4.2.2 Método 2 (M2)** (Marchetti *et al.*, 1998). Se realizaron cortes de 20  $\mu\text{m}$  de ancho por bloque, y se colocaron en un tubo nuevo estéril de 1.5 ml. Se derritió la parafina a 65 °C por 20 min y se removió adicionando 1 ml de xileno (Técnica Química, México), agitando vigorosamente, y dejando incubar a temperatura ambiente por 30 min, posteriormente se centrifugaron a 12,000 x g por 5 min, decantando el sobrenadante, y repitiendo el proceso desde la adición de xileno. Se adicionó 1 ml de etanol 100% (MERCK, México), agitando vigorosamente, y centrifugando a 12,000 x g por 5 min. Se removió el sobrenadante dejando secar la pastilla, y se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de buffer de digestión (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, SDS (AMRESCO, Solon, Ohio, USA) 0.5% NaCl (AMRESCO, Solon, Ohio, USA) 50 mM, 300  $\mu\text{g}$  Proteinasa K/ml), dejando incubar las muestras a 37 °C en movimiento, toda la noche, y finalmente a 95 °C por 10 min para inactivar la proteinasa K. Se adicionó 300  $\mu\text{l}$  de fenol (Técnica Química, México), agitando vigorosamente y se centrifugó a 12,000 x g por 3 min para remover el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo estéril, donde se le adicionaron 300  $\mu\text{l}$  de fenol-cloroformo (MERCK, México) (1:1), después se agitó vigorosamente, se centrifugo a 12,000 x g por 3 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo estéril, adicionando 300  $\mu\text{l}$  de cloroformo-álcohol isoamílico (MERCK, México) (24:1), se agitó vigorosamente, se centrifugó a 12,000 x g por 3 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo estéril y se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio (SIGMA, St Louis, MO, USA) 0.2 M y etanol frío al 99% (para precipitar los ácidos nucleicos), para almacenarlo a -20 °C por 1 hr. Se centrifugo a 12,000 x g por 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y se dejó secar la pastilla, para finalmente resuspenderla en 40  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril.

**4.2.3 Método 3 (M3)** (Isogen Bioscience B.V.) Chelex 100 (SIGMA, St Louis, MO, USA). Se adicionaron 150  $\mu\text{l}$  de la suspensión Chelex 5% a la sección de tejido embebido en parafina de 14  $\mu\text{m}$  contenidas en un tubo nuevo estéril de 1.5 ml. Se agitó vigorosamente para que la sección quedara cubierta con la

suspensión de Chelex 5%. Se calentaron las muestras por 30 min a 100 °C, y se centrifugaron durante 10 min a 13,000 x g, transfiriendo la solución que se encuentra entre el anillo de parafina y las perlas de Chelex, que contiene el extracto de ADN, a un tubo de microcentrifuga nuevo estéril.

**4.2.4 Método 4 (M4)** (van der Zanden *et al.*, 1998) Chelex 100-Detergentes. A una sección de tejido de 14 µm de ancho contenido en un tubo de microcentrifuga nuevo estéril de 1.5 ml, se le adicionaron 300 µl de solución de extracción (Chelex 100 5%, SDS 0.1%, Nonidet P-40 (SIGMA, St Louis, MO, USA) 1%, Tween 20 1%), y se mezcló vigorosamente. Se calentaron las muestras a 100 °C por 30 min, se centrifugaron a 13,000 x g por 10 min, y se transfirió el sobrenadante bajo el anillo de parafina que se formó a un tubo de microcentrifuga nuevo estéril, evitando tomar las partículas de Chelex.

**4.2.5 Método 5 (M5).** De acuerdo a la técnica propuesta por Miller *et al.* (1997, 1999), con ciertas modificaciones. Se obtuvieron por lo menos 4 secciones seriadas de 5 µm de grosor a partir del tejido contenido en parafina. Se transfirieron 2 cortes de cada TEP en un tubo estéril para microcentrifuga de 1.5 ml y se centrifugaron a 16,000 x g por 1 min para peletizar el corte. Para obtener el extracto crudo se adicionaron 200 µl de solución amortiguadora de digestión (Tris 0.05 M, pH 8.3, EDTA 1mM y Tween 20 0.5%), a continuación se sometieron a dos ciclos de ebullición durante 10 min en baño maría y enfriamiento en nitrógeno líquido durante 1 min; seguido por una ebullición final en baño maría durante 10 min y centrifugación a 3,000 x g durante 20 min. Finalmente, con una punta estéril, se retiró el anillo sólido de parafina que se formó y se transfirió el sobrenadante, que contenía el ADN micobacteriano, a nuevos tubos estériles de 1.5 ml.

#### **4.2.6 Cuantificación del ADN micobacteriano y electroforesis**

Se realizó a partir de las muestras de ADN o del extracto crudo mediante fluorescencia (VersaFluor Fluorometer System, BIORAD, USA) para determinar la cantidad de ADN en la solución, utilizando la bisbenzamida como fluorocromo (Fluorescent DNA Quantitation Kit, fluochrome Hoechst 33258, BIORAD, USA). Las lecturas se hicieron tres veces, se promediaron y finalmente el producto de extracción se ajustó a una concentración de 100 ng/μl. Para validar los métodos de extracción de ADN micobacteriano, en cuanto a calidad, integridad y concentración aproximada de ADN, se sometieron 5 μl del ADN de cada una de las muestras a electroforesis, durante 20 min a 80 voltios en un gel de agarosa al 1.0%. Para visualizar el ADN observando la fluorescencia de las bandas, mediante la adición de bromuro de etidio (0.5 μg/ml), el gel se examinó en un transiluminador de luz ultravioleta (EpiChemi II Darkroom, UVP BioImaging Systems, Upland CA, USA).

#### **4.3 Amplificación del locus del citocromo b (cit b).**

En los 42 TEPs se amplificó por PCR un fragmento de 375 pb de la región conservada del locus del citocromo b (cit b), del ADN mitocondrial (ADNmt) a partir de las células somáticas de los TEPs bovinos, como control interno o control de coamplificación para el análisis del PCR (Ron, *et al.*, 1996), ya que es un paso crítico cuando se evalúan agentes infecciosos, al actuar como un marcador de suficiencia de ADN (tamaño del producto y cantidad) (Greer *et al.*, 1995). Se utilizaron los iniciadores CYB1 y CYB2 cuya secuencia es 5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3' y 5'-GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA -3' respectivamente. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, para un volumen final de 20 μl: template de ADN 300 ng, iniciador CYB1 0.5 pM, iniciador CYB2 0.5 pM, mezcla dNTP (Biotecnologías Universitarias, D.F., México) 0.2 mM c/dNTP, PCR buffer (Biotecnologías Universitarias, D.F., México) 1x, MgCl<sub>2</sub> (Biotecnologías

Universitarias, D.F., México) 1.5 mM, Amplificasa (Biotecnologías Universitarias, D.F., México) 1.25 U. El programa de amplificación se realizó en un termociclador (GeneAmp PCR System 2400, PERKIN-ELMER, Norwalk CT, USA) y consistió en un ciclo a 94 °C por 4 min, seguido por 40 ciclos a 94 °C por 35 seg, 58 °C por 45 seg y 72 °C por 35 seg, con una extensión final a 72 °C por 7 min. En cada PCR se utilizaron como controles ADN de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium*, agua, y al menos una muestra con diagnóstico negativo a TB por cada diez muestras procesadas. Para el análisis de los productos de amplificación se utilizaron 5 µl de la reacción de amplificación para la electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y visualizados en el transiluminador de luz ultravioleta. Los TEPs se determinaron PCR-positivos cuando el fragmento de 375 pb estuvo presente en el gel, y fueron PCR-negativos cuando este fragmento estuvo ausente.

#### **4.4 Identificación molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR**

Para la detección del ADN micobacteriano en cada una de las muestras se amplificó mediante PCR un fragmento de 123 pb de la IS6110 del CMTB (Eisenach, *et al.*, 1990) siguiendo métodos ya descritos (Miller, *et al.*, 1997, 1999). Para ello se utilizaron los iniciadores HTB1 y HTB2 cuya secuencia es 5'-TCGTCCAGCGACGATTCGG-3' y 5'-CCTGCGAGCGTAGGCGTCCGG-3' respectivamente. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, para un volumen final de 20 µl: templete ADN 300 ng, iniciador HTB1 20 pM, iniciador HTB2 20 pM, mezcla dNTP 0.2 mM c/dNTP, PCR buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, TaqGold (Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., NJ, USA) 1.25 U. El programa de amplificación se realizó en un termociclador y consistió en precalentamiento a 94 °C por 10 min y 72 °C por 2.15 min, seguido de 50 ciclos a 94 °C por 45 seg y 72 °C por 75 seg, con una extensión final de un ciclo a 72 °C por 10 min. En cada PCR se utilizaron como controles positivos ADN de *M. bovis*

BCG y *M. tuberculosis* H37Rv, como controles negativos *M. avium* y agua, y al menos una muestra con diagnóstico negativo a TB por cada diez muestras procesadas. Para el análisis de los productos de amplificación se utilizaron 5 µl de la reacción de amplificación para la electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio al (0.5 µg/ml) y visualizados en el transiluminador de luz ultravioleta. Los TEPs se determinaron PCR-positivos cuando el fragmento de 123 pb estuvo presente en el gel, y fueron PCR-negativos cuando este fragmento estuvo ausente pero el fragmento de 375 pb estuvo presente para cit b.

#### **4.5 Detección y tipificación molecular de miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* por Spoligotyping**

La caracterización molecular de cepas a partir TEPs se realizó basada en el polimorfismo de las secuencias espaciadoras de la región DR según métodos ya establecidos (Kamerbeek *et al.*, 1997).

##### **4.5.1 Amplificación del ADN**

El ADN de los distintos TEPs se amplificó por PCR, utilizando un par de oligonucleótidos específicos dirigidos contra la región DR, uno de ellos biotinilado, con la siguiente secuencia: DRa 5'- GGT TTT GGG TCT GAC GAC -3', biotinilado en 5', 5'- CCG AGA GGG GAC GGA AAC -3'. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, para un volumen final de 50 µl: template de ADN 300 ng, iniciador DRa 20 pmol, iniciador DRb 20 pmol, mezcla dNTP 0.2 mM c/dNTP, PCR buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.25 mM, Amplitaq (Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., NJ, USA) 0.0125 U; y el programa de amplificación consistió en un ciclo a 96 °C por 3 min, seguido por 40 ciclos a 96 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 30 seg; y una extensión final a 72 °C por 10 min. Se utilizaron, en cada sesión de amplificación, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG como controles positivos, como controles negativos *M. avium* y agua, y al menos

una muestra con diagnóstico negativo a tuberculosis por cada diez muestras procesadas.

#### **4.5.2 Hibridación de los productos de amplificación**

Los productos de amplificación se hibridaron con una serie de oligonucleótidos sintéticos cuyas secuencias corresponden a 37 regiones espaciadoras de las DR de *M. tuberculosis* H37Rv y 6 de *M. bovis* BCG, que se encuentran unidos covalentemente a una membrana de nylon (ISOGEN, Bioscience BV, Maarsseen, Holanda) en carriles paralelos. El producto de amplificación (20  $\mu$ l) se diluyó con SSPE 2X-SDS 0.1% (SSPE 20x (Invitrogen life Technologies Ultra Pure, UK) 50 ml, SDS 10% 5 ml, agua destilada 445 ml) (150  $\mu$ l) precalentado, y se desnaturalizó mediante calentamiento a 100 °C por 10 min, inmediatamente después se colocó en hielo. La membrana se lavó en 50 ml de SSPE 2X-SDS 0.1% precalentado por 5 min a 60 °C, colocándose posteriormente en un miniblottter MN45 (Immunetics, Cambridge, UK) de manera que los pozos de este quedaran perpendiculares a la línea de los oligonucleótidos adheridos a la membrana, y removiendo cualquier fluido residual por aspiración. Cada pozo del miniblottter se llenó con 150  $\mu$ l del producto de PCR diluido (evitando las burbujas de aire y la contaminación de los pozos vecinos), se colocó cinta adhesiva para evitar la evaporación, y se hibridó durante 1 hr a 60 °C. Posteriormente se removieron las muestras de los pozos del miniblottter por aspiración, y la membrana se lavó dos veces en un tubo de hibridación con 50 ml de SSPE 2X-SDS 0.5% (SSPE 20x 50 ml, SDS 10% 25 ml, agua destilada 425 ml) a 60 °C por 10 min, con movimiento en el horno, para remover los productos no hibridados. Después de enfriar el tubo para evitar la inactivación de la peroxidasa la membrana se incubó con 20 ml de SSPE 2X-SDS 0.5% y 10  $\mu$ l del conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Amershan Biosciences, Piscataway, NJ USA), dilución 1:2000, por 45-60 min a 42°C en movimiento. Finalmente se lavó dos veces la membrana con 30 ml de SSPE 2X-SDS 0.5% por 10 min a 42 °C y se mantuvo otros 5 min en 50 ml de SSPE 2X (SSPE 20x 50 ml, agua destilada 450 ml) a 30

°C. Para la detección por quimioluminiscencia del ADN hibridado, la membrana se incubó por 1 min en 6 ml del líquido detector ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK), dilución 1:1, y se expuso la membrana a una película de rayos-X (Kodak, película para diagnóstico, Rochester, NY, USA) por 10 min.

#### **4.5.3 Análisis molecular de los patrones de hibridación**

Los patrones de hibridación de los productos de amplificación de cada uno de los TEPs, se utilizaron para construir una matriz de datos compuestos por los números 1 y 0 en base a la presencia o ausencia de los fragmentos (espaciadores). El análisis de los patrones de hibridación se realizó con el paquete para análisis estadístico SPSS versión 8 para Windows, utilizando el procedimiento de "Squared Euclidean Distance" bajo la opción de "Hierarchical Cluster" y "Nearest Neighbor" como el método de agrupamiento para la elaboración final de un dendrograma.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Extracción del ADN micobacteriano

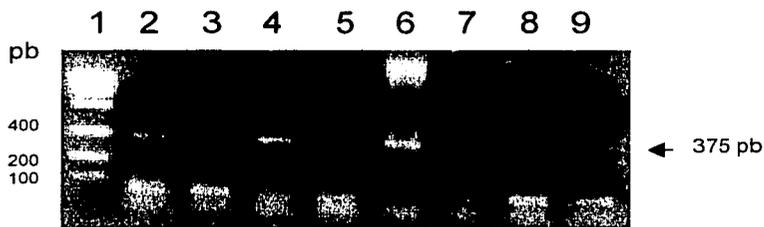
Al evaluar los 10 distintos TEPs en cada uno de los métodos de extracción de ADN micobacteriano, M1, M3, M4 y M5 mostraron ser métodos sencillos, ya que requirieron de un mínimo de tiempo y manipulaciones para llevarlos a cabo, sin la purificación del material, aunque a la observación directa del extracto crudo se observó todavía la presencia de residuos de parafina en muestras extraídas por los métodos M1, M3 y M4. El M2 permitió mayor purificación pero requirió múltiples manipulaciones por las centrifugaciones y lavados.

La calidad del ADN aislado de TEPs fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa. En todas las muestras, independientemente del método empleado, se observó un cierto grado de degradación del ADN, siendo esto mayor en M1, M3 y M4. El contenido de ADN de cada una de las muestras fue determinado por fluorometría, las concentraciones más altas fueron obtenidas con M1 (rango de 42 a 8599.5 ng/ $\mu$ l) y M5 (rango de 250 a 7125 ng/ $\mu$ l), seguido por M3 (rango de 38.5 a 1138 ng/ $\mu$ l) y M4 (rango de 1102.5 a 3293.5 ng/ $\mu$ l); y M2 resultó en mínima o nula concentración (rango de 0 a 616 ng/ $\mu$ ).

El M5 fue el método que finalmente se aplicó a los 42 TEPs obteniéndose de esta manera un extracto crudo que contiene al ADN. Se ajustó la concentración de cada muestra a 100 ng/ $\mu$ l, ya que un exceso de cantidad de ADN podría inhibir la reacción de amplificación y pudo almacenarse durante seis meses a -20 °C, y utilizarse para la amplificación de las regiones previamente descritas.

## 5.2 Amplificación del locus cit b

Para determinar si era posible amplificar el ADN obtenido de los TEPs, a pesar de la posible degradación del ADN después de 1 a 4 años de almacenadas las muestras en parafina y para excluir la presencia de inhibidores, se establecieron las condiciones para poder amplificar un fragmento de 375 pb del ADN mitocondrial bovino que codifica el cit b, utilizado como control interno. Se obtuvo el producto de amplificación esperado en los 42 TEPs (**Figura 3**) empleando para esto 40 ciclos de amplificación, utilizando 300 ng de ADN almacenado a -20 °C. Después de este tiempo de almacenamiento fue necesario utilizar hasta 500 ng para poder amplificar el ADN y en muchos casos ya no fue posible esta amplificación.

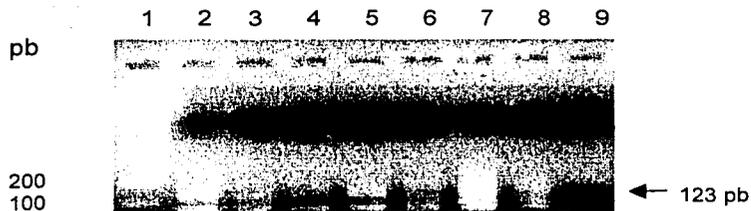


**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa 3% de los productos de amplificación del *cit b* con 375 pb. Carriles: 1) marcador de peso molecular, 2-5) muestras de diferentes TEPs, 6) *M. tuberculosis* H37Rv, 7) *M. bovis* AN5, 8) *M. avium*, 9) agua.

### 5.3 Identificación molecular del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR

La cantidad requerida de extracto crudo para la amplificación del fragmento de 123 pb de la IS6110 (**Figura 4**) fue de 300 ng, con 50 ciclos de amplificación. Productos de este tamaño se obtuvieron con ADN de las cepas de *M. bovis* AN5 y *M. tuberculosis* H37Rv, utilizadas como controles positivos mientras que no se observó ninguna amplificación con ADN de *M. avium*, que constituyó el control negativo.

Los resultados obtenidos mediante PCR se compararon con los obtenidos en histopatología y cultivo (**Cuadro 2**). Los 42 TEPs procesados procedían de bovinos que habían mostrado lesiones sugestivas de TB en la inspección realizada en el rastro. Treinta y una de ellas fueron positivas al diagnóstico histopatológico (tinciones ZN, HE positivas), 6 fueron negativas y 5 fueron ZN negativas pero HE positivas. *M. bovis* fue aislado de 21 de las muestras, 15 fueron negativas y en una muestra se aisló una micobacteria atípica, de rápido crecimiento. De las 21 muestras cultivo positivas 16 se analizaron por PCR, siendo todas positivas. Diez muestras negativas a cultivo pero positivas en histopatología fueron también positivas en PCR. De las seis muestras negativas por histopatología (tinciones ZN, HE negativas), 4 fueron cultivo negativas para micobacteria y 2 no se trabajaron. Por PCR 4 fueron positivas (2 cultivo negativas y 2 no trabajadas) y las 2 restantes fueron negativas en PCR para el CMTB.



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los productos de amplificación de 123 pb de la IS6110 para el CMTB. Carriles: 1) marcador de peso molecular, 2-6) muestras de diferentes TEPs, 7) *M. tuberculosis* H37Rv, 8) *M. bovis* AN5, 9) agua.

## Cuadro 2

Comparación de los resultados de los 42 TEPs procesador por Histopatología,  
Cultivo y PCR.

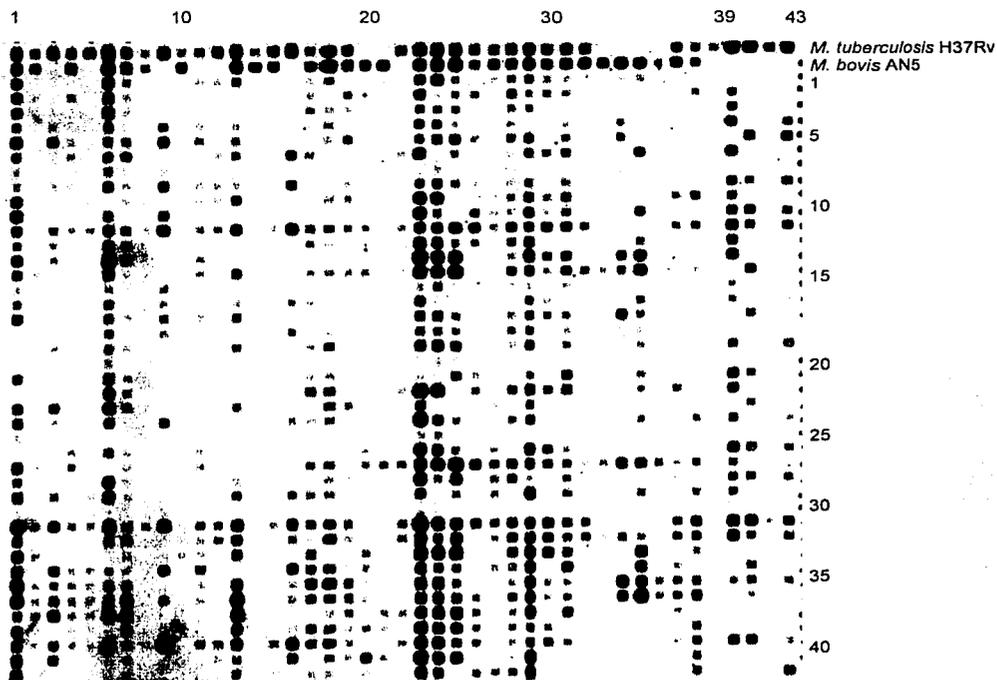
| Diagnóstico<br>Macroscópico<br>En NL | Histopatología            | Cultivo para Micobacteria                                  | PCR para identificar al<br>CMTB |
|--------------------------------------|---------------------------|--|---------------------------------|
| 42 con lesiones de TB                | 31 positivas <sup>1</sup> | 18 positivas a<br><i>Mycobacterium bovis</i>               | 14 positivas<br>4 no trabajadas |
|                                      |                           | 1 positiva a<br>Micobacteria atípica                       | 1 positiva                      |
|                                      |                           | 11 negativas   | 10 positivas<br>1 no trabajada  |
|                                      |                           | 1 no trabajada   | 1 positiva                      |
|                                      | 6 negativas <sup>2</sup>  | 4 negativas<br>2 no trabajadas                             | 4 positivas<br>2 negativas      |
|                                      | 5 sugestivos <sup>3</sup> | 3 positivas a<br><i>Mycobacterium bovis</i><br>2 negativas | 4 positivas<br>1 no trabajada   |

1. Tinción Ziehl-Neelsen positiva/Hematoxilina-eosina positiva. 11 animales reactivos a la prueba de tuberculina, 1 expuesto a animales infectados.
2. Tinción Ziehl-Neelsen negativa/Hematoxilina-eosina negativa. 1 reactor a la prueba de tuberculina, 1 expuesto a animales infectados.
3. Tinción Ziehl-Neelsen negativa/Hematoxilina-eosina positivo. 1 reactor a la prueba de tuberculina, 1 expuesto a animales infectados.

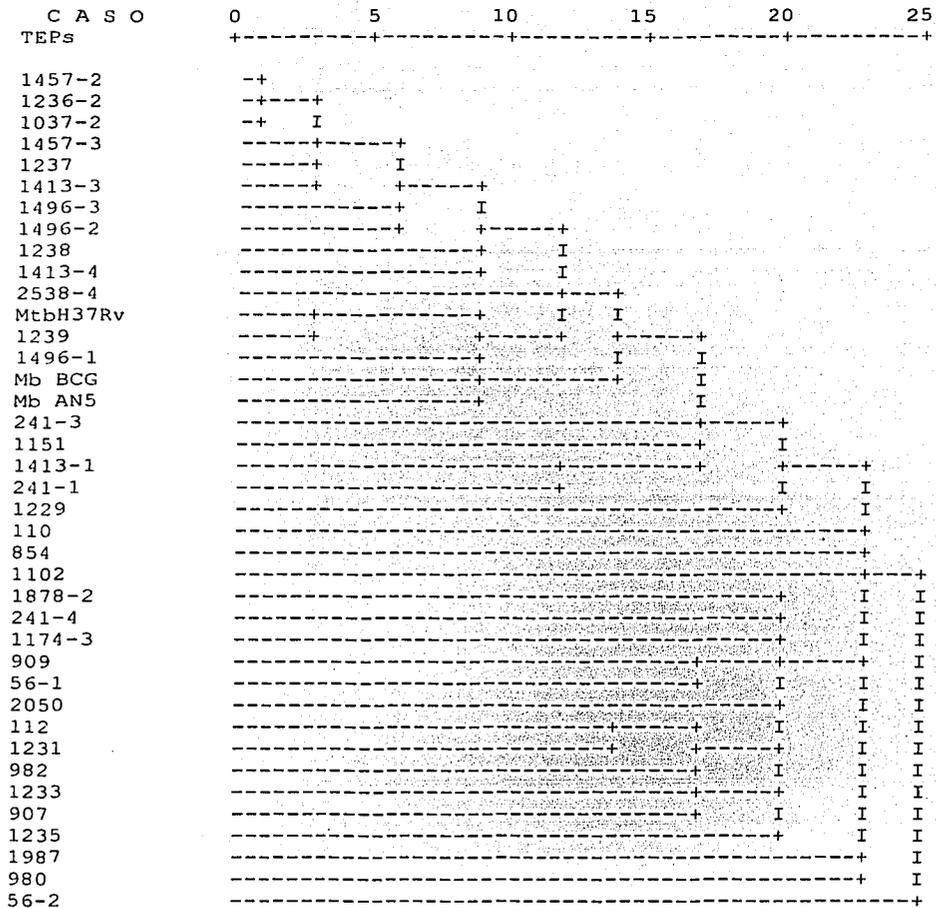
#### **5.4 Detección y tipificación molecular de miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* por spoligotyping**

Treinta y seis TEPs fueron analizados por spoligotyping. En todos ellos se pudo amplificar mediante PCR la región DR. La **figura 5** muestra algunos de los patrones obtenidos al hibridar los productos de amplificación con los espaciadores fijados previamente a la membrana. Utilizando 300 ng de extracto crudo se obtuvieron patrones definidos de todas las muestras. Las cepas de *M. bovis* BCG, *M. bovis* AN5 y *M. tuberculosis* H37Rv utilizadas como controles presentaron los patrones esperados, en los cuales se observa la ausencia de los espaciadores 39 a 43 en las dos primeras. En el caso de *M. avium* no se observó amplificación de la región DR, tampoco cuando se añadió agua en vez de ADN. Aunque algunos de los patrones obtenidos con los TEPs muestran semejanzas con los de *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG, en muchos de ellos se observó también la presencia de espaciadores que son característicos de *M. tuberculosis*. El **Cuadro 3** muestra el número de muestras de ADN obtenidas de TEPs en los que se observa la presencia de uno o varios de los espaciadores 39 a 43, característicos de *M. tuberculosis*.

Al analizar los diferentes patrones por SPSS se obtuvo el dendrograma (**Figura 6**) que muestra los diferentes grupos genéticos formados por los distintos TEPs, y en el que las primeras 13 muestras presentaron patrones semejantes a los de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG y *M. bovis* AN5, mientras que las restantes 24 muestras, mostraron mayor distancia genética respecto a estas.



**Figura 5.** Patrones genéticos obtenidos por spoligotyping con ADN de diferentes TEPs. Los números en la parte superior indican la posición de los espaciadores de la región DR en la membrana. Cada fila (1-41) muestra la presencia o ausencia de los 43 distintos espaciadores en el ADN de los TEPs analizados.



**Figura 6.** Dendrograma que muestra los grupos genéticos formados por los distintos TEPs. El número indica el número de caso.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### Cuadro 3

Reconocimiento de los espaciadores 39 al 43 de la región DR obtenidos por Spoligotyping de los 36 TEPs evaluados por esta técnica.

| N° muestras | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 |
|-------------|----|----|----|----|----|
| 3           | X  | X  | X  |    | X  |
| 2           |    | X  | X  | X  | X  |
| 14          |    | X  | X  |    | X  |
| 1           |    | X  |    | X  | X  |
| 3           |    | X  | X  |    |    |
| 2           |    | X  |    |    | X  |
| 1           |    |    | X  |    | X  |
| 2           |    | X  |    |    |    |
| 1           |    |    | X  |    |    |
| 4           |    |    |    |    | X  |
| 3           |    |    |    |    |    |

## 6. DISCUSION

El éxito de cualquier prueba basada en la amplificación del ADN por PCR aplicada a los TEPs depende de diferentes factores, que incluyen el fijador usado para el procesamiento del tejido, la duración de fijación, la edad del TEP, el tamaño del fragmento de ADN a amplificar (Greer *et al.*, 1995), el número de copias del fragmento presente en el genoma del microorganismo, el procesamiento del TEP para PCR, la concentración de ADN, la masa molecular, iniciadores para la amplificación y la naturaleza del tejido evaluado (Wright y Manos, 1990; Marchetti *et al.*, 1998).

Los tejidos (NL) utilizados en este estudio, con lesiones sugestivas de TB, fueron fijados con formol amortiguado al 10% para estudios histopatológicos, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-031-ZOO-1995), lo que reduce en gran medida el tamaño de los fragmentos de ADN que pueden ser recuperados, específicamente si el tiempo de fijación es prolongado (Miller *et al.*, 1997), siendo 30 días el tiempo máximo que tardaron los tejidos en llegar al Laboratorio de Micobacterias del CENASA para su procesamiento. Greer *et al.*, (1995) mencionan que el tipo de fijador usado así como el tiempo de fijación son factores críticos que deberían ser tomados en consideración cuando se planean estudios tanto retrospectivos como prospectivos que involucren la amplificación de ADN usando TEPs, porque después de 24 hr de la fijación del tejido, la habilidad para amplificar productos grandes por PCR decrece con todos los fijadores excepto etanol, acetona, y OmniFix. Esto es particularmente importante cuando el muestreo de tejido ocurre en regiones lejanas, lo que requiere fijación y almacenamiento por periodos prolongados de tiempo previo al análisis. Se sugiere que el tiempo de fijación en formalina de especímenes a ser usados tanto para histopatología como para PCR debe ser entre 24 a 48 hr (Fiallo *et al.*, 1992). Por otra parte, se menciona que la formalina reduce en gran medida el tamaño de los fragmentos de

ADN que pueden ser recuperados si el tiempo de fijación es prolongado; en tal caso es más recomendable la utilización de iniciadores que amplifiquen fragmentos menores de 200 pb (Greer *et al.*, 1995). La secuencia de 123 pb amplificada por los iniciadores específicos para el CMTB fue resistente al efecto de fijación con formalina, lo cual ha sido también observado por Miller *et al.*, (1999).

En este trabajo se seleccionó el método de extracción M5 ya que provee una técnica simple que permitiría evaluar un gran número de muestras. La simplicidad del procedimiento de extracción del ADN de TEPs, mediante ciclos de ebullición-congelación, redujo la posibilidad de realizar un gran número de pasos evitando así la posibilidad de introducir por parte del operador de agentes contaminantes (Wright y Manos 1990; Walsh *et al.*, 1991; Bascuñana y Belák 1996). Además, no fue necesario purificar el ADN, lo cual es una ventaja ya que los pasos adicionales involucrados en esta purificación disminuyen las posibilidades de obtener las concentraciones de ADN necesarias para la amplificación, problemático cuando el blanco de amplificación esta presente en un número muy bajo de copias, como lo han comprobado varios autores (Wright y Manos 1990; Walsh *et al.*, 1991, Marchetti *et al.*, 1998), además de que se ha reportado que el descalcificar el tejido inhibe el éxito de amplificación del ADN (Miller *et al.*, 1997). Este método permite la amplificación de fragmentos de ADN pequeños, aunque algunos autores mencionan que los resultados son menos consistentes al no remover los inhibidores tan eficientemente como el procedimiento de digestión con proteinasa K, observándose amplificaciones no específicas (Bascuñana y Belák 1996).

Por otra parte, se ha observado que la amplificación del ADN de TEPs es menos eficiente que la amplificación de ADN purificado o extractos de material clínico fresco. Para compensar esto, es posible incrementar el número de ciclos y tiempo en cada temperatura dentro del ciclo. Sin embargo debe tenerse en cuenta

que debido al incremento en el número de ciclos de amplificación y la extensión en los tiempos de alineación y polimerización usados en PCR de muestras de parafina puede llevar a la obtención de algunos productos no específicos en adición a los productos específicos. Tales productos no específicos son visibles por tinción con bromuro de etidio, y son frecuentemente más pequeños que los productos específicos (Wright y Manos, 1990). En este trabajo se incluyó como control negativo ADN de *M. avium* para comprobar que los productos de amplificación obtenidos eran específicos.

Los resultados de este estudio mostraron que el ADN obtenido se pudo conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta seis meses, aunque después de este tiempo fue necesario utilizar mayor cantidad para lograr su amplificación. Otros autores mencionan que el tejido digerido pudo ser almacenado por 1 mes a  $-20^{\circ}\text{C}$  o a temperaturas menores pero recomiendan que las muestras sean amplificadas inmediatamente después de la extracción ya que el ADN extraído puede deteriorarse a través del tiempo. Se menciona también que secuencias genómicas presentes en múltiples copias, son amplificables después de varios meses (Greer *et al.*, 1995), lo cual sería conveniente en las campañas de erradicación de TB.

Independientemente del método de extracción empleado se observó en los geles de agarosa degradación parcial del ADN. Sin embargo, puesto que la PCR no requiere un peso molecular alto de ADN blanco se ha demostrado que es posible amplificar ADN aún de especímenes deteriorados (Wright y Manos 1990), permitiendo la evaluación especie-específico de la micobacteria en TEPs (Richter *et al.*, 1995). Esto fue corroborado en el presente estudio ya que fue posible amplificar el fragmento del gen de *cit b* usado como control interno, así como la secuencia de 123 pb de la IS6110.

El uso de iniciadores como controles internos o control de coamplificación es crítico cuando se evalúan agentes infecciosos. Sin este marcador de suficiencia de ADN (tamaño del producto y cantidad) la falta de detección de agentes infecciosos en un espécimen en particular no es confiable. Se sugiere que estos iniciadores amplifiquen un fragmento de mayor tamaño que el fragmento de interés, al menos 100 pb más largo (Greer *et al.*, 1995); en este trabajo se emplearon iniciadores que amplifican un fragmento de 375 pb lo que permitió confirmar que el ADN extraído de los TEPs sí es amplificable.

El tipo de tejido (Shibata *et al.*, 1988; Marchetti *et al.*, 1998; Frevel *et al.*, 1999), el estado necrótico, y el contenido de nucleasas son factores más importantes en la recuperación de ADN intacto que la fijación en formalina (Shibata *et al.*, 1988), así también debe de tomarse en cuenta la humedad, el pH y la temperatura (Qian *et al.*, 1999). Se ha reportado una sensibilidad del PCR con la IS6110 del 75% cuando se utilizan NL (Marchetti *et al.*, 1998). Ikononopoulos *et al.*, (2000) han notado que la sensibilidad mejora cuando se seleccionan secciones de TEPs con lesiones características en vez de usar el bloque entero. Los resultados muestran que algunos TEPs tienen suficiente ADN bacteriano que permite la identificación por PCR, probablemente no influenciada por la pérdida de integridad o presencia de inhibidores, aún cuando los resultados del aislamiento bacteriológico hayan sido negativos, hecho comprobado por varios autores (Marchetti *et al.*, 1998; Salian *et al.*, 1998; Frevel *et al.*, 1999) posiblemente porque la PCR es más sensible que el cultivo; además, para el PCR no se requiere de organismos viables, al contrario del aislamiento. En México, Morales *et al.*, (2001) infieren que la baja sensibilidad de las pruebas de aislamiento e histopatología puede ser debido a que en el laboratorio no se están recibiendo muestras con lesiones típicas de micobacterias, lo que indica que el diagnóstico de estos organismos debe de ser maximizada mediante la aplicación conjunta del PCR con el aislamiento bacteriológico.

Por otro lado, otros estudios muestran que no siempre se obtiene una sensibilidad del 100% a partir de muestras positivas al aislamiento (Miller *et al.*, 1997, 1999). Esto puede deberse a que no se utiliza la misma región del órgano tanto para histopatología como para aislamiento, ya que muchas veces no contiene una lesión suficiente para su procesamiento. Las amplificaciones de muestras extraídas y digeridas que han sido almacenadas no siempre son exitosas como las que han sido amplificadas inmediatamente después de la digestión, posiblemente el almacenamiento o congelamiento/descongelamiento promueve la rotura o deterioro del ADN (Wright y Manos 1990). El fracaso puede ser debido a la presencia de inhibidores en el extracto crudo de tejido o inadecuada recuperación de ADN cuando se utiliza la purificación. Resultados PCR falsos negativos también puede ser una consecuencia de la pequeña cantidad de tejido examinado, como el comparado con la cantidad usada para el cultivo bacteriológico (Miller *et al.*, 1997).

En este trabajo se evaluó también la utilización de la técnica de spoligotyping para caracterizar molecularmente el ADN extraído de los TEPs. El análisis de los patrones obtenidos con los TEPs mostró semejanza con los de *M. bovis* AN5 y *M. bovis* BCG, aunque en muchos de ellos se observó también la presencia de algunos espaciadores que son característicos de *M. tuberculosis*. Esto podría deberse a la presencia de fragmentos de ADN de otras micobacterias que pudieran hibridar con algunas de las secuencias espaciadoras de la región DR fijadas a la membrana o la posibilidad de que el tejido haya estado infectado simultáneamente con dos micobacterias pertenecientes al CMTB. No se debe de descartar la posibilidad de que el reconocimiento de estas regiones sea inespecífico. Las reacciones falsas positivas es uno de las mayores desventajas en el método de PCR para la detección de secuencias específicas. Para prevenir la contaminación con productos de PCR de previas amplificaciones sería conveniente incluir en el ensayo de PCR dUTP en vez de dTTP, junto con uracil ADN glicosilasa para degradar el ADN de previas amplificaciones, como ha sido

sugerido por otros investigadores (van der Zanden *et al.*, 1998), no afectando este paso la sensibilidad del PCR. Se ha mencionado que en muestras viejas se encuentran frecuentemente patrones truncados o incompletos, indicando que los templetos de ADN viejo pueden haber sido dañados y fragmentados durante el curso del almacenamiento (Qian *et al.*, 1999); también se obtienen patrones incompletos al usar bajas concentraciones de ADN cercanas al límite detectable, debajo de 10 fg (equivalente a dos células micobacterianas) (Kamerbeek *et al.*, 1997; van der Zanden *et al.*, 1998), aunque para este trabajo se utilizaron 300 ng del extracto crudo por lo que no se considera que fuera una limitante para la amplificación. La complejidad de los patrones obtenidos en este trabajo no permitió definir con claridad si las micobacterias detectadas en los TEPs correspondían a *M. bovis*. Sin embargo es muy probable que así sea pues solo ocasionalmente se ha reportado la presencia de otras micobacterias del CMTB en bovinos. Sería necesario utilizar otros métodos como la amplificación por PCR del pseudogen *oxyR* (Yan *et al.*, 1998) para confirmarlo.

Los presentes resultados combinados con un control interno de amplificación representan un método rápido, sensible y confiable para la detección e identificación del CMTB en TEPs. Por lo tanto, el utilizar este tipo de material en reacciones de PCR para amplificar el ADN de las micobacterias proporciono un método relativamente simple y sensible para diagnosticar un gran número de muestras. Por otra parte, el implementar nuevas técnicas de laboratorio para el diagnóstico definitivo de la TB bovina, dará una gran ventaja a la Campaña Nacional contra dicha enfermedad ya que todo el procesamiento pudo realizarse en una semana, en lugar de varias, que es lo que requiere el aislamiento bacteriológico.

## 7. CONCLUSIONES

A partir de las muestras de TEPs se obtuvo ADN que demostró ser amplificable utilizando los iniciadores para el gen del citocromo b.

Utilizando los iniciadores específicos que amplifican la región de 123 de la IS6110, se pudo detectar micobacterias del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, a partir de las muestras de TEPs.

A partir del ADN extraído de TEPs fue posible amplificar la región DR, confirmando la presencia de micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, debido a la complejidad de los patrones obtenidos no fue posible establecer claramente la presencia de *M. bovis* en los TEPs.

La sensibilidad de estas pruebas fue mayor que la del aislamiento y la histopatología por lo que deberían de considerarse como pruebas confirmatorias de TB en animales que muestren lesiones al sacrificio.

## 8. PERSPECTIVAS

Evaluar la amplificación por PCR del pseudogene *oxyR* para poder diferenciar a *M. bovis* de *M. tuberculosis* a partir de TEPs.

Evaluar la utilización de ADN purificado a partir de TEPs que permita diferenciar a especies y subespecies dentro del CMTB, especialmente *M. bovis* de *M. tuberculosis*, utilizando la técnica del Spoligotyping.

Realizar el Spoligotyping a partir del aislamiento bacteriológico correspondiente a cada uno de los TEPs utilizados en estudio, para corroborar los resultados obtenidos.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Adams LG. 2001. *In vivo* and *in vitro* diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rv sci tech Off int Epiz.* 20(1):304-324.
2. Amadori M, Lyashchenko KP, Gennaro ML, Pollock JM, Zerbini I. 2002. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis. *Vet Microb.* 85:379-389.
3. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Vidal D, Domingo M, González O, Rodríguez-Ferri EF, Bunschoten AE, van Embden JDA, Cousins D. 1996. Spacer Oligonucleotide Typing of *Mycobacterium bovis* Strains from Cattle and Other Animals: a Tool for Studying Epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microb.* 34(11):2734-2740.
4. Balandrano CS, Anzaldo FG, Peña FGP, Betancourt MX. 1996. Tuberculosis. *Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR.* 2:15.
5. Bascuñana CR, Belák K. 1996. Detection and Identification of Mycobacteria in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues by Nested PCR and Restriction Enzyme Analysis. *J Clin Microb.* 34(10):2351-2355.
6. Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR. 1995. Microwave-Based DNA Extraction from Paraffin-Embedded Tissue for PCR Amplification. *Biotechniques* 18:768-774.
7. Betancourt MX, Robles PMAG, Borja PJ, Yela M. 2001. Tuberculosis bovina, con referencia a la tipificación de Micobacterias de muestras de bovinos, cerdos, y otras especies de la fauna silvestre. *Memorias 2º Congreso Internacional de Epidemiología. Asociación Mexicana de Epidemiología Veterinaria, A.C.* 361-364.
8. Caldarelli-Stefano R, Vago L, Bonetto S, Nebuloni M, Costanzi G. 1999. Use of magnetic beads for tissue DNA extraction and IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* PCR. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 52:158-163.

9. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. 2000. Brucelosis y Tuberculosis (*M. bovis*). Situación de los programas en la Américas. Publicación N° 1. 28-40.
10. Collins DM, Radford AJ, de Lisle GW, Billman-Jacobe H. 1994. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet Microb.* 40:83-94.
11. Corner LA. 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microb.* 40:53-63.
12. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HFAK, de Kantor I, Meslin FX. 1998. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerg Infect Dis.* 4(1):59-70.
13. Cousins DV. 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Rev sci tech Off int Epiz.* 20(1):71-85.
14. Cousins D, Williams S, Liébana E, Aranaz A, Bunschoten A, van Embden J, Ellis T. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 36:168-178.
15. Cousins DV, Wilton SD, Francis RR. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microb* 27:187-195.
16. Díaz OF, Banda RV, Jaramillo ML, Arriaga DC, González SD, Estrada-Chávez C. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet Mex.* 34(1):13-26.
17. Doherty ML, Monaghan ML, Basset HF, Quinn PJ, Davis WC. 1996. Effect of dietary restriction on cell-mediated immune responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 49 (4): 307-320.
18. Domingo M, Liébana E, Carrera J, Villafranca M, Casal J., Aranaz A, Altamira J, Vidal D, Marco A, Planell JM, Mateos A, Domínguez L. 1995. Eficacia comparativa de la intradermoreacción y de la prueba de liberación

- de gamma-interferón para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo. *Med Vet.* 12(5):307-317.
19. Douglas, J.T., Qian, I., Montoya, J.C., Sreevatsan, S., Musser, J., van Soolingen, D., van Embden, J.D.A. 1997. Detection of a novel family of tuberculosis isolates in the Philippines. In Annual Conference of the American Society for Microbiology (ASM), 4-8 May, Miami Beach, ASM, Washington, D.C. 572.
  20. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. 1990. Polymerase Chain Reaction Amplification of A Repetitive DNA Sequence Specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infec Dis.* 161: 977-981.
  21. Fiallo P, Williams DL, Chan GP, Gillis TP. 1992. Effects of Fixation on Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycobacterium leprae*. *J Clin Microb.* 30(12):3095-3098.
  22. Frevel T, Schäfer KL, Tötsch M, Böcker W, Dockhoorn-Dworniczak B. 1999. PCR based detection of mycobacteria in paraffin wax embedded material routinely processed for morphological examination. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 52:283-288.
  23. García-García ML, Valdespino-Gómez JL, Palacios-Martínez M, Mayar-Maya ME, García-Sancho C, Sepúlveda-Amor J. 1995. Tuberculosis y SIDA en México. *Salud Pública de México.* 37(6):539-548.
  24. Goodchild AV, Clifton-Hadley RS. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis.* 81 (1/2):23-41.
  25. Grange JM. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis.* 81 (1/2):71-77.
  26. Grange JM, Yates MD. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet Microb.* 40:137-151.
  27. Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. 1995. PCR Amplification from Paraffin-embedded Tissues: Sample Preparation and Effects of Fixation. *PCR Primer A Laboratory Manual.* 99-112.

28. Ikonomopoulos JA, Gorgoulis VG, Kastrinakis NG, Zacharatos PV, Kokotas SN, Evangelou K, Kotsinas AG, Tsakris AG, Manolis EN, Kittas CN. 2000. Sensitive Differential Detection of Genetically Related Mycobacterial Pathogens in Archival Material. *Microb and Inf Dis.* <http://www.ajcp.com:/ikonomopoulos1200ar.html>
29. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Manual de procedimientos para el diagnóstico histopatológico de la tuberculosis bovina. 1997a. 1-6.
30. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Manual de procedimientos para el aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis*. 1997b. 1-8.
31. Isogen Bioscience BV. Spoligotyping, a PCR-based method to simultaneously detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Manual. 14.
32. Kamerbeek J, Schouls L, Folk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. 1997. Simultaneous Detection and Strain Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for Diagnosis and Epidemiology. *J Clin Microbiol.* 35:907-914.
33. Kocagöz T, Yilmaz E, Özkara S, Kocagöz S, Hayran M, Sachedeva M, Chambers HF. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. *J Clin Microb.* 31(6):1435-1438.
34. Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gómez-Mampaso E, Tercero JC, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Dominguez L. 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organism in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microb.* 33:33-36.
35. Luna-Martínez E, Mejía TC, Betancourt X, Valera NM, Mas-Ibañez T, Peña FG. 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.
36. Marchetti G, Gori A, Catozzi L, Vago L, Nebuloni M, Rossi MC, Esposti AD, Bandera A, Franzetti F. 1998. Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from Formalin-Fixed, Paraffin-embedded Tissues: Comparison of Four Amplification Assays. J Clin Microb. 36(6):1512-1517.
37. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. 1993. Molecular epidemiology: Application of Contemporary Techniques to the Typing of Microorganisms. Clin Inf Dis. 17:153-164.
38. Milián SF, Gallegos TRM. 2001. La vacunación con *M. bovis* BCG, posible alternativa para el control de la Tuberculosis Bovina en México. Memorias 2° Congreso Internacional de Epidemiología. Asociación Mexicana de Epidemiología Veterinaria A.C. 63-69.
39. Milián-Suazo F, Salman MD, Ramírez C, Payeur JB, Rhyan JC, Santillan M. 2000. Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in Mexico. Am J Vet Res. 61(1):86-89.
40. Miller JM, Jenny AL, Ellingson JL. 1999. Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. J Vet Diagn Invest. 11:436-440.
41. Miller JM, Jenny AL, Payeur JB. 2002. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. Vet Microb. 87:15-23.
42. Miller J, Jenny A, Rhyan J, Saari D, Suarez D. 1997. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for

- Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. J Vet Diagn Invest. 9:244-249.
43. Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. 1994. The tuberculin test. Vet Microb. 40:111-124.
  44. Montali RJ, Mikota SK, Cheng LI. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. Rev sci tech Off int Epiz. 20(1):291-303.
  45. Morales LA, Becerril MP, Franco GM, Trejo CA, Martínez VIO. 2001. Uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diagnóstico de tuberculosis bovina. Memorias XXXVII Reunion Nacional de Investigación Pecuaria. 191.
  46. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microb. 40:153-177.
  47. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis. 81(1/2):79-86.
  48. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microb. 40:41-52.
  49. Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995. www.sagarpa.gob.mx
  50. Office International des Epizooties. 2001. Mycobacterium infections in domestic and wild animals. 20(1):20.
  51. Olive DM, Bean P. 1999. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. J Clin Microb. 37(6):1661-1669.
  52. O'Reilly LM, Daborn CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tuberc and Lung Dis. 76(1):1-46.
  53. Organización Mundial de la Salud. 2000. www.who.int/inf-fslen/faat104.html
  54. Pfyffer GE, Auckenthaler R., van Embden JDA, van Soolingen D. 1998. *Mycobacterium canetti*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from Swiss patient exposed in Africa. Emerg infect Dis. 4:631-634.
  55. Plackett P, Ripper J, Corner LA, Small K, De Witte K, Melville L, Hides S, Wood PR. 1989. An ELISA for the detection of anergic tuberculosis cattle. Australian Vet J. 66:15-19.

56. Pollock JM, Neill SD. 2002. *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *Vet J.* 163:115-127.
57. Qian L, van Embden JDA, van der Zanden AGM, Weltevreden EF, Duanmuh H, Douglas JT. 1999. Retrospective Analysis of the Beijing Family of *Mycobacterium tuberculosis* in Preserved Lung Tissues. *J Clin Microb.* 37(2):471-474.
58. Richter E, Schlüter C, Duchrow M, Hahn M, Rusch-Gerdes S, Galle J, Flad HD. 1995. An improved method for the species-specific assessment of mycobacteria in routinely formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *J Pathol.* 175:85-92.
59. Ritacco V, López B, Barrera L, Nader A, Fliess E, Kantor IN. 1990. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *J Vet Medicine Series B.* 37:19-27.
60. Ron M, Verner N, Feldmesser E, Hochman D, Band M, Shani M. 1996. Amplification of the Conserved Cytochrome b Locus as a Versatile Internal Control for PCR Analysis in Animals. *BioTechniques.* 20:604-608.
61. Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, Hughes MS, Skuce RA, van Embden JDA, Neill SD. 1998. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Vet Microb.* 61:111-120
62. Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. 1998. Polymerase Chain Reaction to Detect *Mycobacterium tuberculosis* in Histologic Specimens. *Am J Respir Crib Care Med.* 158(4):1150-1155.
63. Shibata D, Marti WJ, Arnheim N. 1988. Analysis of DNA Sequences in Forty-Year-Old Paraffin-embedded Tissues Sections: A bridge between Molecular Biology and Classical Histology. *Cancer Res.* 48:4564-4566.
64. Silva E. 2001. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Vet Microb.* 78:111-117.

65. Thoen CO, Huchzermeyer H, Himes EM. 1995. Laboratory diagnosis of Bovine Tuberculosis. *Mycobacterium bovis* Infection in Animals and Humans. 71-72.
66. United States Animal Health Association. USAHA. Noviembre 2001. Resolution N° 16. <http://www.usaha.org/resolutions/reso01/res-1601.html>
67. Vago L, Zerbi P, Caldarelli-Stefano R, Cannone M, D'Amico M, Bonetto S, Barberis M. 2000. Polymerase Chain Reaction for *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA. Use on Negative Archival Ziehl-Neelsen Cytologic Samples. *Acta Cytologica*. 44:1023-1028.
68. van der Zanden AGM, Bosje T, Heilmann FGC, van Soolingen D. 2001. Nosocomial transmission of tuberculosis to a nurse demonstrated by means of spoligotyping of a formalin-fixed bronchial biopsy. *The Netherlands J Medic*. 59(3):152-157.
69. van der Zanden AGM, Hoentjen AH, Heilmann FGC, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JDA. 1998. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *J Clin Pathol: Mol Pathol*. 51:209-214.
70. van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Ping HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JDA. 1995. Predominance of Single Genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in Countries of East Asia. *J Clin Microb*. 33(12):3234-3238.
71. van Soolingen D, van der Zanden AGM, de Haas PEW, Noordhoek GT, Kiers A, Foudraine NA, Portaels F, Kolk AH, Kremer K, van Embden JDA. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* Infections among Humans by using novel genetic markers. *J Clin Microb*. 36(7):1840-1845.
72. Vitale F, Capra G, Maxia L, Reale S, Vesco G, Caracappa S. 1998. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in cattle by PCR using milk, lymph node aspirates, and nasal swabs. *J Clin Microb*. 36(4):1050-1055.

73. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol.* 43:227-240.
74. Wilson SM, Nava E, Morales A, Godfrey-Faussett P, Gillespie S, Andersson N. 1993. Simplification of the polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in the tropics. *Trans Royal Soc of Trop Medicine and Hygiene.* 87:177-180.
75. Wood PR, Jones SL. 2001. BOVIGAM™: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 81(1/2):147-155.
76. Wood PR, Rothel JS. 1994. In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Vet Microb.* 40:125-135.
77. Wright DK, Manos MM. 1990. Sample preparation from paraffin-embedded tissues. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 153-158.
78. Yan J-J, Chen F-F, Jin Y-T, Chang K-C, Wu J-J, Wang Y-W, Su I-J. 1998. Differentiation of BCG-induced lymphadenitis from tuberculosis in lymph node biopsy specimens by molecular analysis of *pncA* K and *oxyR*. *J Pathol.* 184:96-102.
79. Zumarraga MJ, Bernadelli A, Bastida R, Quse V, Loureiro J, Cataldi A, Bigi F, Alijo A, Castro-Ramos M, Sampers S, Otal I, Martin C, Romano MI. 1999. Molecular characterization of mycobacterial isolates from seals. *Microb.* 145:2519-2526.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN