



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

RELACIÓN GENÉTICA Y EPIDEMIOLÓGICA DE CEPAS DE
Mycobacterium bovis DE BOVINOS DE MÉXICO Y DE LOS ESTADOS
UNIDOS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A
MARIA MARTINA ESPERANZA PEREZ SORIA

TUTOR: DR. FELICIANO MILIAN SUAZO
COMITE TUTORAL: DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ
DR. ALFREDO SAHAGUN RUIZ

QUERÉTARO, QRO.

2007



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.

DEDICATORIA

A mi Madre, quien siempre ha estado a mi lado apoyándome.

A mi Padre, quien sé me apoya aunque haya partido a otro lugar del universo.

A mis hermanas y mi hermano por ser parte de mi vida.

A toda mi familia que siempre me da ánimos para seguir adelante.

A mi sobrino, que con sus 6 años, sus risas y su compañía hacen la vida más divertida.

A mis amig@s porque con su gran amistad han hecho que el camino recorrido sea grandioso.

A mis profesores, que con sus enseñanzas y consejos, me impulsaron a lograr este objetivo

A Dios, por brindarme la oportunidad de realizar este gran proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A Universidad Nacional Autónoma de México, por darme la oportunidad de enriquecer mis conocimientos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Querétaro donde realicé mi formación profesional.

A mi tutor: Dr. Feliciano Milián Suazo, por su gran apoyo en el transcurso de la maestría y en la realización de este proyecto.

A mi respetable Comité Tutorial:

Dra. Camila Arriaga , por toda su paciencia, sus enseñanzas, sus comentarios y su apoyo incondicional que siempre recibí y que me impulsaron a llegar hasta el final de este proyecto.

Dr. Alfredo Sahagún Ruíz, por todo el apoyo, por sus críticas constructivas y buenos consejos que me brindo para la realización de este trabajo y llegar a la meta.

A mi honorable Jurado:

Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello	Presidente
Dra. Camila Arriaga Díaz	Secretario
Dra. Gabriela Barcenas	Vocal
Dr. Alfredo Sahagún Ruíz	Primer suplente
Dr. Feliciano Milián Suazo	Segundo suplente

Por sus valiosa contribución y su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

A las instituciones que generosamente apoyaron la realización de este proyecto: INIFAP, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID), Centro Nacional de Investigación en Fisiología Animal, Comité de Fomento y Protección Pecuaria de los Estados de Chihuahua, Sonora, Nuevo León y Jalisco, y CONACYT.

A la M.V.Z. Cecilia Romero Torres por su apoyo incondicional, su amistad, su paciencia, todas sus enseñanzas, su guía en el trabajo de laboratorio, y quien fue una clave muy importante para la realización de este proyecto.

Al gran equipo de investigadores del CENID MICROBIOLOGIA quienes siempre me hicieron sentir como en casa durante mi estancia en el laboratorio de biotecnología del CENID MICROBIOLOGIA de Palo Alto, además de brindarme su amistad, sus buenos consejos y opiniones que fueron de gran ayuda en la realización de este proyecto.

Al Dr. Fernando Díaz, Dr. Dionisio Córdova, Dr. Fernando Diosdado, Dr. Atalo Martínez, Dra. Lupita, por su amistad y apoyo.

Al MC. Marco Antonio Santillán, por sus consejos, sus comentarios, su amistad y apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A los investigadores del INIFAP Querétaro, por todo el apoyo, consejos, opiniones y valiosa amistad que siempre me otorgaron.

Al Dr. Moisés Montaña, por su amistad, su apoyo y consejos que me brindo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Héctor Vera, por su apoyo, guía y consejos brindados durante toda la maestría.

Al Dr. Jorge Cantó, quien con su amistad, sus consejos y comentarios me impulso a seguir adelante y concluir este proyecto.

A la MC. Leticia García Casanova, por los buenos consejos, su gran amistad y todo el apoyo que siempre me brindo para la realización de este proyecto.

A todos mis amigos y amigas quienes han estado conmigo brindándome el apoyo y el cariño incondicional para seguir adelante en este proyecto: MVZ. Cecilia Romero Torres, MVZ Rubén Gómez, MVZ Octavio Lugo, MVZ Adrián Guerrero MVZ Elías Sánchez, MVZ Héctor Ruíz, CP Alicia Pegueros, MVZ Vicente Castañeda, MVZ Vicente Luna, MC Gabriela Huitron, MVZ Margarita Alarcón, MC. Marina Durán, MC Horacio Zendejas, MVZ Armando Solís, Biol. Carlos Valdés, MVZ Margarita Salto, MVZ Ana María Anaya, MVZ Irma Sánchez, TP Isidro Varela, MVZ Ricardo Lagunes, Rodrigo Pérez, Nora Furrusca.

A Noe García por todo su apoyo en la realización de este trabajo.

A Leticia Jiménez, por su guía, su orientación, su apoyo, su amistad y sus consejos que me brindo en todo momento.

A la Biol. Maribel Hernández Mendoza, por su amistad, sus consejos y por compartir conmigo sus conocimientos.

Al MC Juan Manuel Leal Rodríguez, por su gran amistad, sus consejos y por estar siempre apoyándome.

A mis Profesores de Maestría quienes con sus enseñanzas, me han apoyado y motivado a seguir adelante.

Al MC Juan Becerra, quien con su apoyo constante, sus enseñanzas y su amistad, me impulso a llegar a la meta.

A la Dra. Teresa Peña, por su amistad, sus consejos y su apoyo durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Felipe Ruíz, por sus enseñanzas, su amistad y sus consejos.

Al Dr. Armando Shimada, por sus consejos, sus enseñanzas y su amistad.

A la Quim. Erika, quien me brindo su amistad, su poyo y sus consejos en todo momento.

Al Lic. Miguel Arellano y Lic. Karen por su amistad y su apoyo para la realización de este trabajo.

A mi familia quien me ha apoyado e impulsado siempre en la realización de proyectos de vida como este.

A mi Mamá, por todo el apoyo y cariño que siempre me ha brindado, durante toda mi vida.

A mis hermanas, Salomé, Fátima, Cecilia, Judith, Paloma, por que siempre han estado conmigo incondicionalmente impulsándome a seguir adelante.

A mis tíos, Tereso y Ana de quienes siempre he recibido apoyo en todos los aspectos para la realización de mis metas.

A todas las maravillosas personas que junto conmigo formaron parte de este proyecto al apoyarme, al brindarme su valioso conocimiento, su cariño, su confianza, sus palabras precisas en todo momento y su gran amistad. Mi agradecimiento de todo corazón.

INDICE

	Página
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VIII
INDICE	X
LISTA DE CUADROS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
I. INTRODUCCIÓN	
➤ Definición de la enfermedad	1
➤ Etiología	1
➤ Generalidades	2
➤ Problemas de Salud Pública	5
➤ Importancia Económica	7
➤ Diagnóstico y control	9
➤ Epidemiología	12
➤ Epidemiología Molecular	14
II. OBJETIVO	19
✓ Objetivos Específicos	

III. HIPOTESIS	20
IV. JUSTIFICACIÓN	21
V. MATERIAL Y MÉTODOS	22
VI. RESULTADOS	28
VII. DISCUSION	31
VIII. CONCLUSIONES	34
IX. BIBLIOGRAFÍA	35
X. CUADROS Y FIGURAS	43
XI. ANEXOS	56

RESUMEN

La comercialización de ganado en pie con los Estados Unidos de Norte América (EEUU) ha obligado a México a mejorar las estrategias de control de la tuberculosis y la brucelosis; dos de las barreras no arancelarias más importantes de comercio internacional. Los EEUU han establecido un programa de acreditación para los Estados Mexicanos que pueden exportar ganado, la cual depende de la prevalencia de las mencionadas enfermedades, de la infraestructura y servicios veterinarios para su control. Sin embargo; animales de origen Mexicano ocasionalmente son encontrados con lesiones tuberculosas en rastros de los EEUU. Existe la posibilidad tanto de que algunos animales mexicanos pasen la frontera como falsos negativos, así como que enfermen en territorio del país del norte, Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la fuente más probable de infección de los animales que presentan lesiones de TB en rastros de los EEUU y México, mediante la comparación de los patrones genéticos de cepas de ambos países.

Se utilizaron un total de 84 cepas, de las cuales 44 fueron mexicanas y 40 de los EEUU. Para obtener los patrones genéticos (fingerprints) de las cepas se utilizó la técnica "spoligotyping". La similitud genética entre aislados se determinó a través de un análisis de grupos (clusters) y se graficó en un dendrograma. En el dendrograma se observa que algunas cepas mexicanas presentan similitud con las cepas de los EEUU. Se observaron también patrones genéticos diferentes en animales provenientes del mismo establo, y cepas genéticamente similares de animales provenientes de diferentes ranchos e incluso estados.

En base a los resultados se puede decir que posiblemente algunos de los animales mexicanos iban infectados al cruzar la frontera, de ahí la similitud de

algunas cepas aisladas en los EEUU con cepas Mexicanas; sin embargo, la similitud de cepas de los EEUU entre sí y con las obtenidas de animales silvestres, indican que está ocurriendo infección entre el ganado y animales silvestres, donde el ganado mexicano no tiene ninguna participación. Esto demuestra que la utilidad de las técnicas moleculares depende de la disponibilidad de información epidemiológica que sustente los hallazgos.

Palabras clave: Tuberculosis bovina, Comercio Internacional, ADN, Spoligotyping, Epidemiología Molecular, Dendrograma.

ABSTRACT

Trading live cattle with the United States of America (USA) has made Mexico to have better strategies to control Tuberculosis (TB) and Broucellosis; two of the most important non tariff barriers of the international trade. USA has established an accreditation program for Mexican Sates that can export cattle, which depends in the prevalence of the mentioned diseases, in the infrastructure and veterinarian services for their control. However, Mexican origin animals are occasionally found with TB lesions at the USA slaughterhouses. It is possible that some Mexican animals pass the border as false negative, as well as they can become ill in the USA territory. This is why, this study objective was to determine the most likely infection source of the animals that have the TB lesions at the USA and Mexico slaughterhouses, comparing the strains genetic patterns (fingerprints) of both countries.

84 strains were used, from which 44 were Mexican and 40 from the US. To obtain the strains genetic patterns (fingerprints) the “spoligotyping” technique was used. The genetic similarity among insolates was determined by a cluster analysis and a dendogram was made. It can be seen on the dendogram that some Mexican strains are similar to US strains. It can also be seen some different genetic patterns in animals that came from the same dairy and strains genetically similar in animals that came from different farms and even different states.

Based on these results, we can say that it is possible that some of the Mexican animals were already infected when they crossed the border, which is why some US isolated strains are genetically similar to the Mexican strains. But, because of the similarity among the US strains and the ones obtained from the wild animals, it indicates that infection is taking place among cattle and wild animals, where the Mexican cattle has no participation. This shows that the usefulness of

the molecular techniques depend on the epidemiological information availability that will support the findings.

Key words: Bovine tuberculosis, International trade, DNA, Spoligotyping, Molecular epidemiology, Dendogram.

I. INTRODUCCION

Definición de la enfermedad

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa causada por diversas especies del género *Mycobacterium*, todas ellas pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, cuyas especies más importantes y representativas son *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch, la cual produce infecciones en humanos y *Mycobacterium bovis*, en infecciones en animales respectivamente. La TB es posiblemente la enfermedad infecciosa más prevalente en el mundo y tan antigua como la humanidad. En la actualidad es una enfermedad curable que se ha convertido en un problema serio de salud pública debido a su alta difusión, mortalidad y a su carácter socioeconómico, propio de una infección de curso crónico.

Etiología

El agente causal de la tuberculosis bovina (TBB) es *Mycobacterium bovis*, es un bacilo ácido alcohol resistente. Es un microorganismo intracelular aerobio estricto, de multiplicación directa, de crecimiento lento (3 a 6 semanas) formando colonias color crema y redondas; no forma esporas pero tiene una resistencia moderada al calor, a la desecación, a la acción de los anticuerpos y a varios desinfectantes (Balandrano et al., 1996). Estas características se deben a que el 60 % del peso total de su pared celular esta constituido por lípidos (Sut et al., 1990). La micobacteria tiene una estructura compleja ya que además de lípidos, en la pared celular existen polisacáridos y proteínas, algunas de las cuales poseen actividad enzimática (Jackson et al., 1999). La infección del bacilo se caracteriza por formar granulomas principalmente en pulmón y linfonódulos, lo que lleva a que

los animales infectados pierdan progresivamente su condición corporal (Balandrano et al., 1996, Milián et al., 2000).

Generalidades

La tuberculosis humana (TBH) no sólo es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, también puede ser causada por otras especies integrantes del complejo *M. tuberculosis*, como es el caso de *M. bovis*, la segunda causa más común de tuberculosis en humanos (Committee on Bovine Tuberculosis, 1994; Zumarraga et al., 1999).

La TBH, como causa única de morbilidad y mortalidad por un solo agente etiológico, continúa siendo el problema de salud pública más importante en muchos países (Dolin et al, 1994). Las infecciones con el virus del SIDA (Daborn y Grange, 1993), la presencia de enfermedades concurrentes tales como la Diabetes mellitus (Chávez et al., 1993), la desnutrición, la sobrepoblación, y la falta de recursos para enfrentar a la enfermedad hacen aún más difícil la solución a este problema.

La TBB tiene una distribución mundial y es uno de los principales problemas a los que se enfrenta la ganadería mexicana, ya que además de ser un riesgo para la salud animal y para la salud pública, causa severas pérdidas económicas. Aunado a esto, la presencia de esta enfermedad se convierte en uno de los principales obstáculos para la movilización y comercialización nacional e internacional del ganado (Milián et al., 2000).

La prevalencia de la TBB en México varía dependiendo de la región, en promedio se estima que la prevalencia es del 9%(Milián et al, 2004) (Figura 1). Esta enfermedad es responsable de grandes pérdidas económicas en la industria pecuaria; en 1992 se estimó que la actividad pecuaria perdió 40 millones de

dólares tan solo por desecho involuntario de vacas lecheras (Valdespino, 1994). Limitaciones en la movilización y la comercialización de animales, tanto interna como hacia los Estados Unidos, a donde se exportan aproximadamente 1.4 millones de becerros al año, pueden también causar pérdidas cuantiosas (SAGARPA, 2006).

El Comité Binacional México-Estados Unidos para el Control y la Erradicación de la Brucelosis y la Tuberculosis establece que los animales que se venden a los Estados Unidos deben estar libres de TBB y ser originarios de hatos libres (Cuadro 1); sin embargo, a pesar de los esfuerzos esporádicamente se detectan animales con lesiones tuberculosas en rastros del país del norte, como lo muestra el cuadro 2 (National Agricultural Statistics Service 2007), de los cuales no siempre se puede conocer su lugar de origen, lo que permite que los Estados Unidos especulen que dichos animales son de origen mexicano y entraron al país infectados. Con el fin de contribuir a esclarecer esta situación, el objetivo del presente trabajo fue determinar si existe relación genética y epidemiológica entre las cepas de *M. bovis* aisladas de bovinos en México con los aislados de bovinos y otras especies en los Estados Unidos.

Actualmente, gracias al desarrollo de técnicas moleculares y a la secuenciación del genoma completo o parcial de varias micobacterias, es posible amplificar por PCR regiones específicas del ADN de la micobacteria a partir de unos pocos microorganismos. La diferenciación de cepas basada en el estudio del ADN puede ser la clave para determinar si cepas de *M. bovis* de hatos cercanos son genéticamente similares, si algunas regiones geográficas son fuentes frecuentes de infección, y si la transmisión de cepas idénticas pasa de una especie a otra.

La tipificación molecular se basa en que cepas epidemiológicamente relacionadas se derivan de la expansión clonal de un precursor único y, como

resultado, presentan características en común que difieren de aquellas sin relación epidemiológica alguna. Una característica útil para la tipificación es aquella que es estable dentro de la cepa, pero diversa dentro de la especie. Asimismo, la diversidad dentro de la especie refleja la divergencia genética evolutiva generada por mutaciones no letales que se acumulan con el tiempo; estas mutaciones pueden ser detectadas si ocurren en sitios que puedan ser analizados, tales como genes que codifican alguna enzima o un sitio de restricción que determina un patrón genético característico (huella genómica) o bien a través de secuenciación directa (Maslow and Mulligan, 1993).

En la actualidad existen diferentes técnicas moleculares que han demostrado su eficacia en la diferenciación de cepas, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis*, en diferentes estudios epidemiológicos (Van Embden et al., 1993; Romano et al., 1996).

Problema de Salud Pública

La TBH es considerada por las organizaciones internacionales como uno de los principales problemas de salud en el mundo. Los factores que se han asociado con la adquisición, desarrollo y mortalidad de la infección son complejos, ya que están influenciados por aspectos sociales, económicos, culturales y de otro tipo. Los factores que con mayor frecuencia se mencionan son la pobreza, la desnutrición, el hacinamiento, el alcoholismo, la drogadicción, la falta de acceso a los servicios de salud, los fenómenos migratorios, la diabetes mellitus y, recientemente, la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La OMS estima que aproximadamente 10 millones de personas están infectadas con *M. tuberculosis* y con el virus VIH al mismo tiempo; la primera causa de muerte en estos pacientes es por tuberculosis. La tuberculosis es también la causa de mortalidad más frecuente en pacientes entre 15 y 49 años, ocasionando un total de 2-3 millones de muertes por año (Ennarson et al., 1999). De acuerdo a cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1990 se presentaron 8 millones de casos activos en el mundo, de los cuales 7.6 millones estaban en países en desarrollo, y solo 400 mil en países industrializados (Daborn and Grange 1993; Caminero, 2003), en los últimos años, estas cifras se incrementaron a 2 billones de infectados, 9 millones de enfermos y 3 millones de muertes anuales, la mayoría en paséis del tercer mundo (Montoto, 2005).

En 1993 la OMS declaró a la tuberculosis como una emergencia mundial, ya que las estadísticas indican que una tercera parte de la población humana esta infectada y aproximadamente 200 millones de personas están en riesgo de desarrollar la enfermedad en los siguientes 20 años si las condiciones actuales continúan.

M. bovis tiene como hospedador principal a los bovinos, pero el hombre es susceptible y puede infectarse por este agente, lo cual representa altos costos en materia de salud pública, gastos terapéuticos y disminución de la capacidad laboral; además del sufrimiento de los individuos que la padecen (Moda et al., 1996; Grange y Yates., 1994).

La tuberculosis en humanos provocada por *M. bovis* no está bien documentada, sin embargo, algunos estudios publicados estiman que el porcentaje de humanos contagiados en el mundo por esta micobacteria es de alrededor del 3% (Grange, 2001). La prevalencia de la tuberculosis humana de origen animal ha disminuido mucho en los países donde se impuso la pasteurización obligatoria de la leche y donde se realizaron campañas exitosas de control y erradicación de la infección bovina. En Latinoamérica, *M. bovis* es responsable de causar alrededor de 7,000 casos de tuberculosis humana cada año (Milián et al., 2000). En México, la tuberculosis humana causada por *M. bovis* representa del 8% al 15% de los casos reportados (Díaz, 2000).

Importancia Económica

La tendencia mundial hacia la apertura de mercados y formación de bloques económicos regionales requiere de mayores exigencias en materia sanitaria. Para México es un desafío mantener estándares sanitarios equivalentes a los de sus socios comerciales, Estados Unidos y Canadá que tienen una baja prevalencia de TBB (Acha P. 1986).

La TBB causa perjuicios económicos al ganadero y reduce la eficiencia productiva de sus animales, disminuyendo la fertilidad hasta en un 6%, bajando la producción láctea en 17%, disminuyendo la duración de las lactancias en un 10% a 20% con respecto a animales sanos (Bawinek y Taylor, 1996; Luna, 1996), se reduce la ganancia de peso del animal o disminución gradual del mismo (caquexia). Se pierde en promedio el 15% del peso normal y como efecto secundario causa reducción de la inmunidad, aumentando la susceptibilidad a otras enfermedades; por otra parte, la esterilidad en vacas tuberculosas aumenta entre el 5% y 10% lo que ocasiona menor producción de becerros por año, así como la disminución de la producción de carne de bovino (Daborn y Grange, 1993).

En México la ganadería cuenta con un estimado de 2,000,000 cabezas de ganado lechero y 28,400,000 de ganado de carne (SAGARPA, 2006) donde se estima que la prevalencia de la TBB para el ganado lechero es más alta (10-12%) que en ganado productor de carne (0.5-1%); esto puede ser debido a que la vida útil de estos últimos es más prolongada, al contacto entre los animales al momento del ordeño y a la estabulación o semiestabulación (Estrada, 1995).

Las consecuencias de reactores positivos sobre el comercio nacional e internacional del ganado y de sus productos son evidentes e importantes para los países exportadores. Una reacción positiva a TBB causa un descrédito y las barreras sanitario-comerciales son fácilmente impuestas, pero levantadas con gran dificultad (Thoen et al., 1995; PAHO/WHO, 1997). En México la tuberculosis representa una barrera no arancelaria para la exportación de animales y productos derivados a otros países. México vende a los Estados Unidos más de un millón de becerros para engorda al año, lo cual significa un ingreso importante para los productores nacionales, sin embargo, cuando algún animal infectado es detectado por los inspectores de rastros en los Estados Unidos, se toman medidas que limitan el paso de animales provenientes de México, lo que trae como consecuencia descontrol en el mercado interno, disminución en los precios y sobre pastoreo (Milián et al., 2000).

Los Estados Unidos han creado un programa de acreditación para los Estados mexicanos que pueden exportar ganado, el cual establece que los animales que se venden a los Estados Unidos deben estar libres de TBB y ser originarios de regiones y hatos libres (figura 2 y 3). Esta acreditación depende de la prevalencia de la TBB, así como de la infraestructura y servicios veterinarios para su control. A pesar de los esfuerzos, en promedio anualmente 36 animales son encontrados con lesiones tuberculosas en rastros de EEUU, de los cuales 26 son de origen extranjero (National Agricultural Statistics Services 2007), (Cuadro 2), donde estos animales no siempre pueden ser rastreados hasta su lugar de origen; lo anteriormente mencionado permite la especulación, ya que existe la posibilidad de que algunos animales mexicanos pasen la frontera como falsos negativos; sin embargo también existe la posibilidad de que estos se enfermen en territorio de los Estados Unidos, dada su permanencia en las pasturas por prolongados periodos de tiempo.

Diagnóstico y Control

El diagnóstico de la tuberculosis se establece en base a la clínica, la epidemiología, la observación directa de bacilos ácido-alcohol resistente en tejido infectado y el aislamiento de las micobacterias en cultivo (Caminero, 2003).

En gran parte del mundo los programas gubernamentales para controlar y erradicar la TBB utilizan un esquema de aplicación intradérmica de tuberculina y el sacrificio de los animales reactivos, tal como lo establece la Norma Oficial Mexicana: NOM-031-ZOO-1995. En México las estrategias para ganado bovino son: el diagnóstico y el sacrificio de los animales positivos, la cuarentena de los hatos infectados, la vigilancia epidemiológica en rastros y la constatación de hatos libres (NOM-031-ZOO-1995).

La detección de la tuberculosis en los bovinos es mediante la prueba de tuberculina que consiste en aplicar 0.1 ml de derivado proteico purificado (PPD), en el pliegue de la cola en forma intradérmica y medir la reacción a las 72 horas. La reacción consiste en un engrosamiento de la piel en la zona de la inyección, siendo a veces hasta de una pulgada en un animal reactivo. Los animales reactivos a la prueba caudal de tuberculina, son sometidos a la prueba cervical comparativa, con la que se descarta o confirma el resultado de la prueba caudal (González et al., 1999).

El PPD es obtenido del sobrenadante del cultivo de micobacterias por lo que no es una entidad química específica, sino que consiste de varias fracciones proteicas con distintos pesos moleculares y diferentes características biológicas, por lo que la sensibilidad y la especificidad pueden variar de un lote a otro (Tuboly

y Szent, 1976; Haagsma, 1986; Grasser y Grasser, 1986). En ocasiones los bovinos reaccionan a la prueba de la tuberculina cuando se usa PPD bovino sin estar infectados, como una respuesta inespecífica, es por eso que se utiliza simultáneamente PPD aviar y de este modo se puede determinar si el animal realmente tiene tuberculosis. Esta prueba, conocida como prueba cervical doble comparativa, utiliza PPD bovino y aviar. Ambas se aplican aproximadamente a 12 cm de distancia entre sí, la tuberculina aviar debe inocularse aproximadamente a 10 cm por debajo de la cresta del cuello y la tuberculina bovina más abajo, la zona de inoculación debe ser rasurada previamente y la piel medida con un vernier para registrar su grosor antes de la inoculación intradérmica; posteriormente a las 72 horas se hace la lectura de la reacción (Monaghan et al., 1994).

Las evaluaciones de la prueba de tuberculina muestran, en el caso de la prueba simple caudal, una sensibilidad del 72% al 91% y una especificidad del 78% al 96 % (Francis et al., 1978). La prueba simple caudal es más apropiada cuando se requiere la más alta especificidad con una sola inyección de PPD, en el caso de la prueba simple cervical se recomienda en los casos que se requiera la máxima sensibilidad posible; la prueba cervical doble comparativa utilizando PPD aviar y PPD bovino muestra en algunos estudios tener mayor eficacia que una simple inyección de PPD bovino en el cuello, pero tiene una baja sensibilidad, aunque permite diferenciar la infección por micobacterias del complejo *M. tuberculosis* de las causadas por las bacterias del complejo avium o por micobacterias atípicas. Es importante recalcar que existen en la naturaleza numerosas especies del género *Mycobacterium* que no han sido plenamente clasificadas, llamadas micobacterias atípicas y que tienen una amplia diseminación en el medio ambiente (McGavin et al., 1975; Ketterer et al., 1981).

Si el resultado de la prueba es confirmado, el bovino debe ser enviado al sacrificio en un rastro autorizado por SAGARPA que tenga inspección sanitaria en donde se le practicará una minuciosa revisión a la cabeza, canal y vísceras en

búsqueda de lesiones sugestivas a tuberculosis, se tomarán muestras que serán enviadas al laboratorio para su análisis, para confirmar o descartar la enfermedad a través del aislamiento, junto con las pruebas de campo de todo el hato (NOM-031-ZOO-1995).

En la década de los ochenta se implementó una prueba de diagnóstico para la TBB, cuyo fundamento es medir los niveles de Interferón-gamma (INF- γ) en plasma. Para realizar esta prueba es necesario colectar sangre completa de los bovinos y cultivarla en presencia y ausencia de PPD, después de 24 horas de cultivo se colecta el plasma que contienen las citocinas liberadas por los linfocitos T sensibilizados por una infección presente en la muestra. Esta prueba es un poco más sensible y específica que la tuberculina, en conjunto estas dos pruebas dan como resultado una alta especificidad y sensibilidad. Lo anterior se debe a que la prueba de INF- γ es capaz de detectar la hipersensibilidad antes que la tuberculina (Rothel et al; 1990).

Inicialmente la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* se basaba en las características del cultivo y en la morfología de la colonia, así como en el crecimiento lento de *M. bovis* pero actualmente se realizan pruebas bioquímicas que permiten distinguir *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Sin embargo, las pruebas bioquímicas son muy laboriosas, por lo que en la mayoría de los laboratorios no se hace diferenciación de especies. La identificación de las especies tiene en general un interés epidemiológico, *M. bovis* es resistente a la pirazinamida, y si no hay diferenciación se corre el riesgo de estar dando el antibiótico equivocado, además, de no permitir conocer con exactitud el papel de *M. bovis* en los casos de tuberculosis humana. (Thoen y Steele., 1995)

Epidemiología

Se considera que la ruta más importante de transmisión de la TBB es la aerógena (90%-95% de los casos). Los bacilos tuberculosos se encuentran en el núcleo de gotas resultantes de la respiración de los animales infectados y son transmitidos por medio de la tos y el estornudo y diseminados por el aire donde pueden permanecer suspendidas por varios días. El polvo contaminado con esputo seco infectado puede ser infectante por 8 a 10 días (SENASICA, 2006). Al mugir el bovino expelle microgotas (menores a cinco micras) con 100 a 200 bacilos, estas microgotas contienen de 1 a 2 bacilos (SENASA, 2000).

Otra de las vías de contagio es la oral, la cual se presenta aproximadamente en un 10-20 %. En hatos infectados se han encontrado animales con solo lesiones mesentéricas, por esta vía se requiere mayor cantidad de microorganismos para penetrar la mucosa intestinal. La contaminación de agua, alimento y medio ambiente son factores determinantes para la transmisión; la bacteria sobrevive alrededor de 18 días en agua estancada. La alimentación de becerros con calostro, leche o suero de leche de vacas infectadas o por alimentación directa de vacas tuberculosas, es la causa más común de contagio en animales jóvenes; otra forma de transmisión es la congénita la cual ocurre raramente, aquí se da la infección del feto en el útero por medio de la arteria umbilical, un 2% aproximadamente pueden nacer infectados. Otra vía es la genital, en toros el bacilo se elimina vía genital por el esperma; la inseminación artificial con semen contaminado con tuberculosis es mucho más peligrosa que el servicio natural pues el bajo pH vaginal debido al estro inactivaría al bacilo (SENASICA, 2006; SENASA, 2000).

Varias especies de animales domésticos y silvestres forman parte de la cadena epidemiológica de la TBB. Las granjas de venados son más susceptibles que las de ganado, por lo que pueden ser una fuente de infección para otras especies. El contacto entre animales en los comederos y bebederos es considerado un punto de transmisión de la enfermedad; en los Estados Unidos estos puntos de transmisión han sido una fuente de contagio de TBB entre animales silvestres y de estos con los bovinos (Cuadro 3 y Figura 4). Esta forma de transmisión aunada a la alta densidad de población de venados (Figura 4) constituye otra causa de la presencia de la enfermedad en los EEUU (Emerging Disease Issues 2006). En México la movilización contribuye a la diseminación de la enfermedad (Milian et al., 2000).

Se ha encontrado que *M. bovis* desaparece del medio ambiente de forma rápida, contrario a lo que se creía; por ejemplo, en Inglaterra en un estudio experimental en el cual se tenía pasto contaminado con orina infectada no se logró la recuperación del bacilo tres días después (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1979). *M. bovis* es altamente susceptible a la pasteurización y a la radiación solar, pero es altamente resistente a la desecación (Morris et al., 1994). En experimentos realizados con *M. bovis* en heces fecales y suelo protegidos de la luz solar, el bacilo puede sobrevivir por varios meses; mientras que bajo condiciones naturales el bacilo muere rápidamente (O' Reill y Daborn, 1995). Los cadáveres de los animales silvestres infectados pueden ser también una fuente de infección, ya que *M. bovis* ha sido recuperado de cadáveres de un mes de descomposición (Morris et al., 1994).

Los programas de control de la tuberculosis muestran que existe una gran variación en la prevalencia y la incidencia de la enfermedad entre regiones geográficas y entre granjas dentro de regiones, es probable que las diferentes condiciones medioambientales jueguen un papel importante en la transmisión de la tuberculosis en el ganado (Morris et al., 1994).

Epidemiología Molecular

El desarrollo de técnicas moleculares en los últimos años ha incrementado las posibilidades de estudiar la epidemiología de la infección, la aplicación de la biología molecular en la identificación de micobacterias aisladas a partir de medios de cultivo líquidos o sólidos permite establecer diagnósticos rápidos y confiables. La mayor parte de dichas técnicas se basan en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), de secuencias génicas específicas de especies del género *Mycobacterium* que son de utilidad para distinguir los miembros del complejo tuberculosis (Mostron et al., 2002).

La secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, consiste de 4.4 megabases (Cole et al., 1998). Se ha visto que existen algunas mutaciones que ocasionan la resistencia a medicamentos, también se ha observado que existe una alta cantidad de recombinaciones causadas por los transposones, que son elementos inestables y tienen la característica de causar muchos tipos de arreglos, tales como transposición, delección, inversión y duplicación (Van Soolingen et al., 1991). Se encuentran alrededor de 14 diferentes secuencias de inserción (IS, por sus siglas en inglés), que son un tipo de transposones, en el genoma de *M. bovis* y son responsables de gran parte del polimorfismo observado, por lo que han sido muy utilizadas para diferenciar cepas (van Soolingen et al., 1991; 2001).

Las técnicas moleculares por su alta sensibilidad y especificidad pueden proporcionar información más exacta a nivel epidemiológico de lo que sucede con la enfermedad, permiten el rastreo y seguimiento de las cepas del agente

patógeno. La utilización de estas técnicas en la tuberculosis bovina permite conocer mejor la dinámica de transmisión del bacilo, la identificación de brotes y la relación de estos con focos de infección (Milián, 1998; Ross et al., 1992; Collins, 1994).

Algunas de las técnicas usadas con mayor éxito son “spoligotyping” (Spacer Oligonucleotide Typing) (Kammerbeek et al., 1997; Cousins et al., 1998) y el análisis de polimorfismo longitud de los fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés); ambas basadas en el polimorfismo del segmento IS6110 (Van Embden et al., 1993); o de las secuencias polimorfitas ricas en GC (PGRS, por sus siglas en inglés) (Cousins et al., 1998); los análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés), el número variable de repeticiones en serie (VNTRs, por sus siglas en inglés), (Frothingham et al., 1998). Y Recientemente, un extenso set de locus VNTR, llamados MIRUs (mycobacterial interspersed repetitive units) han sido descritos por Supply et al., (2001). Todas estas técnicas han demostrado ser útiles epidemiológicamente en el rastreo de cepas (Milián et al; 2000; Cousins et al., 1998; Aranaz et al., 1996; Perumaalla et al., 1999). La técnica de elección para el presente proyecto fue “Spoligotyping”.

RFLP (Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos de Restricción)

La secuencia IS6110, presente únicamente en las especies que integran el complejo tuberculosis: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. cannetti*, es la herramienta mas comúnmente utilizada para la genotipificación por medio de RFLP. Una limitante que presenta esta técnica es que tiene bajo poder de discriminación entre cepas de *M. tuberculosis* que portan menos de cinco copias del elemento; así como es el caso de las cepas de *M. bovis* que por lo general solo tienen entre una o dos copias (Van-Soolingen et al., 1991, Hatfull et al 2000). Los niveles de diferenciación usando IS6110 asociado a RFLP como

marcador genético depende del origen de las cepas. La mayoría de los aislamientos de *M. bovis* en Latino América tienen una sola copia de este elemento (Zumarraga et al., 1999), lo que reduce significativamente la utilidad del RFLP con IS6110 para ser utilizado en epidemiología molecular de tuberculosis animal. Es por ello que se han estandarizado métodos de RFLP utilizando otras sondas como las PGRS (Cousins et al., 1993; Aranaz et al., 1996).

Las PGRS consisten en secuencias polimórficas cortas de 24 pb separadas por espaciadores de secuencia única de tamaño variable. Los PGRS están presentes en varios grupos cromosómicos, cada uno con múltiples copias. Debido a que constituyen un marco de lectura abierto y una secuencia putativa consenso-repetida de ocho residuos aminoácidos, tanto el apareamiento equivocado debido al deslizamiento de las hebras de DNA durante la replicación, como la recombinación homóloga entre secuencias repetitivas adyacentes o distantes podrían causar el polimorfismo (Doran et al., 1992).

Uno de los problemas del RFLP, aparte del bajo número de copias del IS6110, es que requiere gran cantidad de ADN, además del uso de reactivos que representan un riesgo para el trabajador de laboratorio. Desde el punto de vista epidemiológico su utilidad para *M. bovis* a sido aceptable (Van Soolingen, 2001).

Sin embargo, mediante los RFLP con diversas sondas se obtuvieron resultados poco confiables para la tipificación de *M. bovis*, debido a bandas de baja intensidad, a contaminación y a la necesidad de técnicas de electroforesis de alta resolución (Collins y de Lisle, 1984; Cousins et al., 1993)

VNTRs (Repetidos en serie de Número Variable)

Frothingham et al., (1998) encontró seis locus (ETR A, B, C, D, E y F) que contienen repetidos en serie de número variable (VNTRs), los cuales han sido utilizados para la genotipificación de Micobacterias del complejo *tuberculosis*, mediante su amplificación por PCR y separación por electroforesis en geles de agarosa. Estas secuencias permiten una mejor discriminación de cepas con 1 o 2 copias de IS6110, tiene buena reproducibilidad, menor sensibilidad y menor costo que el Spoligotyping (Frothingham y Manso, 1998; Durr et al., 2000). Recientemente, un extenso set de locus VNTR, llamados MIRUs (mycobacterial interspersed repetitive units) (Supply et al., 2001). La utilidad de esta técnica ha sido establecida totalmente para cepas de *M. bovis* y los mejores resultados al parecer se obtienen combinando ambas técnicas, spoligotyping y VNTRs.

Spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing)

Groenen et al., (1993) iniciaron el estudio del polimorfismo para el elemento de inserción IS6110, haciendo referencia a la región donde se inserta esta secuencia como “Región DR” (repetición directa), y propusieron que esta región podría ser utilizada para estudios epidemiológicos del complejo *M. tuberculosis*. Más tarde Kammerbeek et al., (1997), presentaron un método rápido para analizar parte de esta región, denominado “spoligotyping” (tipificación de oligonucleótidos de la región DR), que es uno de los métodos más usados en la actualidad para estudiar la epidemiología de la tuberculosis. Esta técnica se basa en la amplificación por PCR de las zonas variables entre las regiones DR, las cuales pueden ser polimórficas. La DR está constituida por múltiples regiones constantes de 36 pares de bases (pb) separadas por espaciadores variables de entre 34 y 41 (DVRs). Esta variación de los espaciadores es utilizada para obtener diferentes patrones de hibridación para la detección y discriminación simultánea de los miembros del complejo *M. tuberculosis*. En las cepas de *M. bovis* es característica

la falta de cinco de los espaciadores 3' (del 39 al 43) en la región DR, con lo cual se les distingue de *M. tuberculosis*.

“Spoligotyping” es una técnica rápida, requiere poca cantidad de ADN por muestra, 10 ng o dos genomas aproximadamente (Aranaz et al., 1996; Kammerbeerck et al., 1997), y tiene una reproducibilidad aceptable dentro de un mismo laboratorio y entre laboratorios, lo que permite compartir y comparar genotipos de referencia (Groenen et al., 1993; Kammerbeerck et al., 1997). “Spoligotyping” ha demostrado ser una técnica más fácil de realizar que el análisis de RFLP para estudios epidemiológicos a gran escala (Roring et al., 1998).

Estudios epidemiológicos han establecido que cepas con un mismo spoligotipo en animales de la misma especie o en especies diferentes en una misma área geográfica, puede ser evidencia de transmisión activa entre ellos (Braden et al., 1997; Glynn et al., 1999). Por ejemplo, en el Reino Unido el monitoreo de la transmisión de la TBB entre el “badger” (roedor de campo, nombre en español) y los bovinos determinó que el primero es la causa de la persistencia de *M. bovis* en el país (Delahay et al., 2002; Defra, UK, 2007), lo que obliga a considerar a la fauna silvestre en los programas de control y erradicación (Perumaalla et al., 1996; Pillai et al., 2000). Los grupos de cepas establecidos con “spoligotyping” y relacionadas por su origen geográfico se han encontrado en diversos estudios: en Irlanda del Norte (Skuce et al., 1994; 1996), Argentina (Fisanotti et al., 1998), Gran Bretaña (Durr et al., 2000), así como también en México (Perumaalla et al., 1996; Milián et al., 2002). Spoligotyping ha sido utilizado para caracterizar aislamientos de *M. bovis* obtenidos de diferentes animales y humanos en América Latina (Zumarraga et al., 1999) y para establecer que el patrón de spoligotyping de las cepas de *M. bovis* que predomina en la Argentina es también predominante en las Islas Británicas, lo que implica un posible origen filogenético (Filliol et al., 2003).

II. OBJETIVO

Determinar la similitud genética entre cepas de *Mycobacterium bovis* de ganado bovino de México y de los Estados Unidos, con la finalidad de proporcionar información sobre la posible fuente de infección de animales de origen norteamericano o mexicano encontrados con lesiones tuberculosas en rastros de los Estados Unidos de Norteamérica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ✓ Regionalizar cepas de *M. bovis* por país por medio de la técnica molecular "Spoligotyping".
- ✓ Establecer patrones genéticos de las cepas de *M. bovis*. a través de análisis moleculares.
- ✓ Determinar posibles fuentes de infección regionales dentro de cada país.

III. HIPOTESIS

El papel del ganado mexicano como causante de brotes de tuberculosis en el ganado bovino de los Estados Unidos por la comercialización es poco relevante; donde probablemente el país del norte (EEUU) tiene sus propias fuentes de infección.

IV. JUSTIFICACION

La comercialización de ganado en pie hacia los Estados Unidos de Norteamérica ha obligado a México a mejorar las estrategias de control de enfermedades en su territorio, especialmente de tuberculosis y brucelosis, dos de las barreras no arancelarias más importantes del comercio internacional. Uno de los requisitos fundamentales de los Estados Unidos para dejar entrar animales en pie a su territorio, es que estos vayan libres de estas dos enfermedades. Para asegurar esto, dicho país ha establecido un programa de acreditación de los Estados mexicanos interesados en exportar animales, donde además de acreditados, los Estados son regionalizados de acuerdo a la prevalencia de las enfermedades mencionadas, a la infraestructura y servicios veterinarios para el control y la vigilancia epidemiológica. Además de estas acciones, otras restricciones son impuestas por el país del norte para asegurar que los animales que entran a su territorio estén libres de enfermedades. Sin embargo, un promedio anual de 26 animales de origen extranjero son encontrados con lesiones tuberculosas en rastros de los Estados de los Estados Unidos e invariablemente se acusa a México de ser el responsable de enviar animales infectados. México por su parte argumenta que es posible que algunos animales pudieran infectarse en territorio norteamericano dada la permanencia de los animales en las pasturas o en corrales de engorda por prolongados periodos de tiempo, en algunas ocasiones por hasta 12 meses. La intención de este trabajo es determinar el posible origen de la infección analizando los patrones genéticos de los aislados de *M. bovis* obtenidos de ambos países, para ayudar a ambos países a tener un mejor entendimiento comercial.

V. MATERIAL Y METODOS

Aislamientos Micobacterianos.

El total de aislados de *M. bovis* que se incluyeron en este estudio fue de 84, de las cuales 40 cepas fueron provenientes de los Estados Unidos y se aislaron de bovinos (de los cuales 4 son de origen mexicano y 31 de origen norteamericano), y animales silvestres (coyote, alce, jabalí, venados) y 44 cepas de México, aisladas de bovinos.

Información de las cepas de México

<i>ESTADO</i>	<i>No. DE AISLADOS</i>	<i>ESPECIE</i>	<i>PROPOSITO</i>
SONORA	6	BOVINO	3 LECHE 1 CARNE 1 CRUZA
TAMAULIPAS	6	BOVINO	3 CARNE 3 DESCONOCIDO
BAJA CALIFORNIA	5	BOVINO	5 DESCONOCIDO
JALISCO	4	BOVINO	3 LECHE 1 DESCONOCIDO
NUEVO LEON	10	BOVINO	4 CARNE 6 DESCONOCIDO
AGUASCALIENTES	3	BOVINO	1 LECHE 1 CARNE 1 DESCONOCIDO
CHIHUAHUA	8	BOVINO	2 LECHE 6 DESCONOCIDO
COAHUILA	2	BOVINO	1 LECHE 1 DESCONOCIDO
TOTAL	44		

Información de las Cepas de los Estados Unidos

<i>ESTADO</i>	<i>No. DE AISLADOS</i>	<i>ESPECIE</i>	<i>PROPOSITO</i>
CALIFORNIA	9	BOVINO	8 LECHE 1 DESCONOCIDO
NUEVO MEXICO	3	BOVINO	2 LECHE 1 DESCONOCIDO
MONTANA	1	ALCE	1 SILVESTRE
TEXAS	9	BOVINOS	2 LECHE 3 CARNE 4 DESCONOCIDO
ARIZONA	1	BOVINO	1 DESCONOCIDO
MICHIGAN	14	VENADOS BOVINOS	5 SILVESTRES 4 CARNE 3 LECHE 1 DESCONOCIDO
		COYOTE	1 SILVESTRE
HAWAI	3	JABALI	3 SILVESTRE
TOTALES	40		

Los aislados fueron obtenidos por ambos países en diferentes años, desde 1997 hasta 2004 y fueron obtenidos de lesiones sospechosas de infección con tuberculosis encontradas en la inspección de canales en rastros. En México los aislados se obtuvieron de los laboratorios de diagnóstico asociados a las comisiones estatales para el control de la tuberculosis bovina de los Estados del norte de México (Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Jalisco, Aguascalientes y Baja California Norte)(Figura 5A), y los aislados de bovinos y animales silvestres fueron obtenidos del Laboratorio de Servicios Nacionales de Diagnóstico Veterinario (NVSL, por sus siglas en inglés) de APHIS-USDA de los Estados Unidos, con cepas provenientes de los estados de California, Arizona, Nuevo México, Texas, Montana, Michigan y Hawai, (Figura 5B). Además, se obtuvo la información epidemiológica de cada cepa, incluyendo el origen del animal, número del arete, raza, sexo y la edad del animal afectado a fin de relacionar el patrón molecular con el origen de la cepa.

Extracción de ADN

En el Laboratorio Central Regional de Monterrey, las muestras se recultivaron utilizando el medio stonebrink (Anexo I), para activar a las micobacterias y tener una mayor cantidad de unidades formadoras de colonia por aislado. Una vez obtenido el cultivo secundario, de cada aislado se extrajo el ADN siguiendo el procedimiento de Van Soolingen et al., (1994) (Anexo II).

Cuantificación Espectrofotométrica de ADN

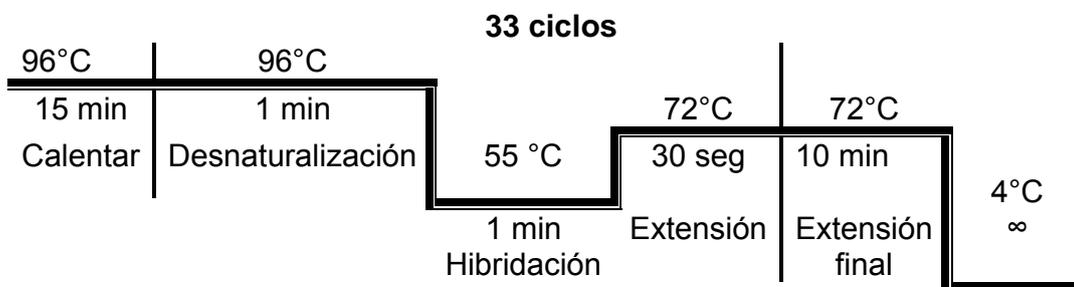
Las muestras de ADN se enviaron al laboratorio de biotecnología del CENID Microbiología del INIFAP en Palo Alto, DF, en donde fueron trabajadas. Una vez recibido el ADN, este se cuantificó utilizando diluciones 1:100, con un espectrofotómetro (Pharmacia Biotech, Gene Quant II, Cambridge England). Las lecturas se realizaron a 260 nm y a 280 nm para calcular la concentración y pureza del ADN. Posteriormente se realizaron diluciones para tener el ADN a una concentración de 100 ng/μl y se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 12 % (Anexo III) teñidos con bromuro de etidio a 100 volts durante 20 minutos y geles de poliacrilamida al 12% (Anexo III). Los geles se observaron en un fotodocumentador (UVP-Biolmaging Systems, Epi Chemi II Darkroom, Maryland USA) (Figura 6 y 7). De las 84 muestras recibidas 9 muestras se recultivaron en el medio Lowenstein-Jensen (Anexo I), en el laboratorio de biotecnología del CENID Microbiología del INIFAP CENID para obtener unidades formadoras de colonias y extraer el ADN, ya que el ADN enviado por el laboratorio de Central Regional de Monterrey, de estas 9 muestras fue insuficiente o nulo para la realización del trabajo.

Análisis Molecular

La técnica “spoligotyping” se realizó según métodos ya establecidos (Kamerbeek et al., 1997) (Anexo IV), la amplificación de la región DR se hizo utilizando los oligonucleótidos con secuencia: DRa 5'- GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3', biotinilado en la posición 5', y DRb 5' CCG AGA GGG GAC GGA AAC- 3'.

La reacción de PCR se hizo en un total de 50 µl de volumen final: ADN 0.5 µl (20 ng/µl), 4 µl de cada iniciador (20 pmol), 25 µl de Amplitaq Gold PCR Master Mix *(Applied Biosystems, Roche Molecular Systems, Inc., NJ USA) la cual contiene Amplitac Gold DNA Polimerasa, 250 U (0.05U/ml), Buffer 30 mM Tris/HCL, pH 8.05, 100 mM KCl, dNTP, 400 mM, MgCl₂ mM y estabilizadores. Se utilizó ADN de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG como controles positivos y agua como control negativo. La mezcla fue amplificada en un termociclador (Gene Amp PCR system 2400, Perkin Elmer) bajo en siguiente protocolo:

Protocolo de amplificación del ADN:



El ADN amplificado fue visualizado en geles de policrilamida al 12%. Los productos de amplificación se aplicaron a una membrana de nylon (ISOGEN, Bioscience BV, Maarsseen, Holanda) conteniendo 43 oligonucleótidos correspondientes a 37 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* H37Rv y 6 secuencias espaciadoras de *M. bovis* BCG. El procedimiento utilizado fue el siguiente: se diluyeron 20 µl del producto de amplificación en 150 µl de SSPE2X/SDS 0.1% SDS (SSPE 20X, Invitrogen life Technologies Ultra Pure, UK)

y 50 ml (SDS 10% 5 ml, agua destilada 45 ml), los cuales se precalentaron a 60 °C por 10 min. Después se hizo la desnaturalización en ebullición durante 10 min e inmediatamente se depositó en hielo. Posteriormente, la membrana se lavó en 50 ml de SSPE2X/SDS 0.1% precalentado por 5 min a 60 °C, y se colocó en un miniblotter MN45 (Immunetics, Cambridge, UK), de manera que los pozos de este quedarán perpendiculares los 43 oligonucleótidos (37 de *M. tuberculosis* H37Rv y 6 de *M. bovis*) adheridos a la membrana, removiendo cualquier fluido residual por aspiración. Cada carril del miniblotter se llenó con 135 µl de producto evitando la formación de burbujas y la posible contaminación de carril a carril, se colocó cinta adhesiva para evitar la evaporación y se hibridó a 60°C durante 45 min en un horno de hibridación (HYBAID).

Posteriormente se removieron los productos de los carriles del miniblotter por aspiración y la membrana se lavó dos veces en un tubo de hibridación, donde se agregaron 100 ml de solución SSPE2X/SDS 0.5% (50 ml de SSPE20X en 425 ml de agua destilada y 25 ml de SDS 10%) y se puso en rotación en el horno de hibridación por 15 min para remover los productos no hibridados. Después de enfriar el tubo para evitar la inactivación de la peroxidasa la membrana se incubó con el conjugado estreptoavidina/peroxidasa (Roche Diagnostics GmbH, IN USA) diluido 1:4000 con SSPE2X/SDS 0.5% (5 µl del conjugado en 20 ml de SSPE2X/SDS 0.5%) a 42°C durante 1 hr. En seguida se lavó dos veces con 100 ml de SSPE2X/SDS 0.5% por 10 min y finalmente se realizó un lavado con 100 ml de SSPE2X (50 ml de SSPE20X en 450 ml de agua destilada) durante 5 min a 30°C. Para la detección de la quimioluminiscencia del ADN hibridado, la membrana se puso sobre un acetato y se le añadió el reactivo quimioluminiscente ECL (Amersham Pharmacia Biotech, UK) en una relación 1:1 y se cubrió con otro acetato y se incubó durante 1 min a 37°C. Para detectar la reacción se expuso la membrana a una película de rayos X (Kodak, película para diagnóstico, Rochester, NY, USA) por 10 minutos, finalmente se reveló la película y se observó (Figura 8).

Análisis Estadístico de los Patrones Moleculares de Hibridación

Con la presencia (1) o ausencia (0) de bandas específicas (espaciadores) de los patrones genéticos o huellas genómicas, se elaboró una matriz de 0's y 1's, posteriormente se realizó una comparación pareada entre aislados a manera de obtener una matriz de distancia genética utilizando el método de Nei y Li (1979). Aislados con mayor coincidencia de espaciadores presentaron una mayor similitud genética.

LA distancia genética o disimilitud ($D=1-S$) entre aislamientos se determino por la comparación entre cada par de bases como se indica a continuación.

$$S = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

Donde:

N_{ab} = Número de espaciadores que el aislamiento a y b presentan en común

N_a = Número de espaciadores en aislamiento a

N_b = Número de espaciadores en aislamiento b

La formación de los grupos genéticos se elaboró con ayuda del paquete para análisis estadísticos SPSS versión 10, con los programas "Squared Euclidean Distance" bajo la opción de "Hierarchical Cluster" y "Nearest Neighbor" obteniéndose el dendrograma final (anexo V). Los grupos del dendrograma fueron complementados todos con la información epidemiológica existente para explicar las relaciones entre aislados.

VI. RESULTADOS

En el presente trabajo se utilizaron 84 cepas de *Mycobacterium bovis*, 44 de México provenientes de bovinos y 40 de los Estados Unidos provenientes tanto de bovinos como de animales silvestres, que fueron tipificados con la técnica de “spoligotyping” para tratar de determinar la fuente más probable de infección para animales que son detectados con lesiones en rastros de los Estados Unidos.

Los resultados del análisis molecular de las 84 cepas muestran una gran diversidad genética (espoligotipos), donde no se observó agrupamiento por país, aunque si en algunos casos, por región dentro de un país. En algunos casos, cepas de una misma región, mostraron diferentes patrones genéticos y cepas de diferentes regiones mostraron patrones genéticamente similares, como puede observarse en el cuadro 4.

En la figura 9 se presenta el dendrograma con la distribución genética entre las cepas y en la figura 10 se muestra un esquema de los patrones genéticos en el mismo orden en que aparecen en el dendrograma. De acuerdo a los patrones de la figura 10 se decidió considerar 4 grupos, designados por conveniencia 1, 2, 3 y 4; dentro de los cuales se forman también algunos subgrupos.

El grupo 1 estuvo formado por 6 cepas de los Estados Unidos y 2 mexicanas. De las cepas de los Estados Unidos cuatro fueron idénticas, todas originarias del estado de California, y dos tuvieron solo un espaciador de diferencia, una de Nuevo México y la otra de un alce en Montana. Las dos cepas mexicanas fueron idénticas, aunque de diferente origen, Aguascalientes y Tamaulipas.

El grupo 2 lo conformaron 28 cepas; catorce de los Estados Unidos y catorce de México, las cuales formaron dos subgrupos principales, con solo algunas incrustaciones de cepas del otro país. En este subgrupo se encuentra una cepa de los Estados Unidos (04-8012) obtenida de un bovino que fue rastreado al estado de Colima en México; esta cepa tiene alta similitud con una cepa de Chihuahua (15), en ambas están ausentes los espaciadores 31-36, sin embargo, el patrón de la cepa de Estados Unidos carece además de los espaciadores 21, 22 y 23, que están presentes en la cepa de Chihuahua. En el subgrupo de las cepas mexicanas se observó alta similitud en la mayoría de ellas, hay un cluster de 6 cepas idénticas y otro de cuatro cepas, las restantes se diferencian solo en un espaciador. El subgrupo de las cepas de Estados Unidos está formado casi en su totalidad por cepas de California y Texas. Este subgrupo tiene una alta similitud genética, con una diferencia en solo uno o dos espaciadores, el 1, o el 15. Tres cepas de este subgrupo (02-0252, 02-4192 y 05-1687) se reportan como provenientes de animales rastreados a México, sin embargo, los patrones genéticos se asemejan más a los de Estados Unidos que a los de México. Respecto a las cepas 02-0252 (Texas) y la 50 (Nuevo León), las cuales presenta un patrón genético idéntico, no fue posible precisar el origen exacto de la cepa de Estados Unidos, solo existe la información de que fue rastreada a México.

El grupo 3 esta conformado por 19 cepas mexicanas y 15 de los Estados Unidos, con la formación de dos subgrupos, uno por cada país, donde la similitud genética entre subgrupos es alta, 21 de las 34 cepas son idénticas. El subgrupo de Estados Unidos incluye a todas las cepas del estado de Michigan, tanto de ganado como de fauna silvestre (venados y coyote), lo que sugiere infección mutua entre estas especies. También incluye a las cepas de jabalí de Hawai, con las cuales no existe información que sustente algún tipo de relación epidemiológica, incluye además a cuatro cepas mexicanas provenientes de diferentes Estados mexicanos; desafortunadamente la escasa información

epidemiológica disponible no permite conocer si existe o no relación entre estas cepas con las de los Estados Unidos. El subgrupo de cepas mexicanas está formado por cepas de diferentes regiones y provenientes tanto de ganado lechero como de ganado especializado en carne. En este subgrupo quedan incluidas dos cepas de bovinos de los Estados Unidos, de los cuales uno es especializado en carne y otro en leche, ambos animales provienen del estado de Michigan; epidemiológicamente no existe relación con las cepas del ganado mexicano de este subgrupo.

Finalmente, el grupo 4 lo constituyen 15 cepas mexicanas, todas de diferentes regiones y con un alto grado de diversidad genética. Los patrones obtenidos en este trabajo se compararon con los reportados en la base de datos internacional de espoligotipos (www.mbovis.org). Se encontró que algunos de los patrones ya han sido reportados en otras partes del mundo y son similares a los espoligotipos SB1165, SB848, SB0269, SB0669 y SB0265 todos de ganado bovino, con los que no se tiene información que sustente que exista relación epidemiológica.

En ambas figuras (9 y 10) se puede observar que el nivel de diversidad genética es mucho mayor entre las cepas de origen mexicano que entre las cepas de los Estados Unidos. Esto puede ser debido a la endemicidad de la enfermedad en el primero, a una mayor prevalencia (figura 5) y a una mayor movilización de ganado entre regiones. En el caso de los Estados Unidos, éste es considerado un país libre de la enfermedad, por lo que las probabilidades de mutaciones que lleven a nuevas líneas genéticas son menores, en especial por que *M. bovis* es una bacteria clonal.

VII. DISCUSION

El presente estudio demuestra la utilidad de los métodos moleculares como “spoligotyping” en la solución de disputas entre países con una larga historia de intercambio comercial. Los resultados demuestran que a pesar de que existe la posibilidad de que algunos animales hayan pasado la frontera como falsos negativos, los Estados Unidos tienen sus propias fuentes de infección, las cuales pueden ser el ganado lechero y la fauna silvestre.

Sin embargo, cuando se utilizan métodos moleculares en estudios epidemiológicos y se hacen conclusiones basadas únicamente en estos, se corren algunos riesgos, ya que no es conveniente relacionar dos cepas basándose solo en su patrón genético, debido a que dichos patrones no son necesariamente representativos de una región o país; por lo que la epidemiología molecular puede sugerir una relación, que solo puede ser confirmada con la información epidemiológica.

De un total de 38 cepas de los Estados Unidos, 15 (40%) son de ganado de leche y 9 (24%) de fauna silvestre; incluyendo 3 de jabalí de Hawai, 4 que pertenecen a venados y a un coyote en el estado de Michigan, y uno más de un alce de Montana. Todas ellas son poblaciones con las que no se espera que el ganado mexicano tenga contacto, el cual generalmente va a ranchos de engorda en el sur de los Estados Unidos; por lo tanto, la probabilidad de que los animales mexicanos sean el foco de infección para las poblaciones mencionadas, son extremadamente bajas. En cinco (13%) de los animales encontrados con lesiones en rastros de los Estados Unidos se encontró que su origen era mexicano, uno de esos animales presentó un patrón molecular semejante a patrones que solo han

sido observados en cepas de México y de España (comunicación personal), lo que sugiere que efectivamente algunos animales mexicanos pudieran cruzar la frontera como falsos negativos.

En trabajos previos realizados con la técnica molecular RFLP, se ha reportado la posibilidad de que las fuentes de infección con tuberculosis sean diferentes para México y los Estados Unidos, ya que se obtuvieron patrones diferentes para cepas de los dos países (Perumaalla et al., 1996).

La mayor diversidad en los patrones genéticos observada en las cepas de México empleadas en el presente trabajo puede ser una consecuencia de alta prevalencia de la enfermedad y un movimiento exagerado de animales entre regiones. Resultados similares en cuanto a una alta diversidad genética ya han sido reportadas en otros trabajos (Milián et al., 2002; Santillán et al., 2006). Por lo tanto, suponiendo que la movilización de animales en los Estados Unidos fuera similar a la realizada en México, las probabilidades de mutaciones no letales que dieran origen a nuevas líneas genéticas serían considerablemente menores debido a la baja prevalencia de la enfermedad en Norteamérica.

La técnica “spoligotyping” agrupa cepas de jabalí obtenidas en Hawai junto con un grupo de cepas de ganado del estado de Michigan; el hecho de que no exista ningún tipo de relación epidemiológica los descarta como fuente de infección entre sí. Similarmente, la revisión de la base de datos internacional de espiligotipos indica que algunos de los patrones observados en el conjunto de cepas de este trabajo, ya han sido reportados en otros países europeos, sin que aparentemente exista ninguna relación genética entre ellos. Estos datos muestran la importancia de la información epidemiológica para complementar la información obtenida con métodos moleculares.

En relación a los patrones mostrados por las cepas del estado de Michigan, en los Estados Unidos, es claro que existe una infección cruzada entre el ganado y la fauna silvestre de la región, ya que presentan patrones idénticos. Esta es una situación complicada, ya que a la larga puede resultar más difícil controlar y eliminar la tuberculosis del ganado cuando la fauna silvestre este involucrada.

Las Figuras 9 y 10 muestran que a pesar de las diferencias, existe en algunos casos alta similitud de las cepas de *M. bovis* de los dos países; Esto puede ser una consecuencia de la historia del intercambio comercial de ganado; los Estados Unidos han sido la fuente tradicional de vaquillas de reemplazo para la producción de leche de México, y éste ha sido un exportador de alrededor de 1.4 millones de becerros en promedio por año para la engorda hacia los Estados Unidos. De este modo, la tuberculosis parece ser un problema compartido entre estos dos países, por lo que la única manera de solucionarlo es trabajando de manera conjunta buscando la optimización de recursos.

VIII. CONCLUSIONES

La evidencia proporcionada por los resultados del análisis molecular (spoligotyping) de 84 cepas de *Mycobacterium bovis* obtenidas de ganado y de especies silvestres en los Estados Unidos y de bovinos de México sugieren que, aunque existe la posibilidad de que algunos animales de origen mexicano crucen la frontera como falsos negativos, los Estados Unidos tienen sus propias fuentes de infección, la cual puede estar relacionada con ganado especializado en la producción de leche y en fauna silvestre.

La técnica “spoligotyping” proporcionó información que demuestra que los focos de infección de animales encontrados con lesiones en rastros de los Estados Unidos pueden tener dos orígenes, animales mexicanos que son exportados como falsos negativos y la fauna silvestre propia que puede estar en contacto con el ganado especializado en leche en estados como Michigan.

Los patrones genéticos obtenidos de las diferentes cepas por medio de la técnica molecular utilizada, aportan información importante para la base de datos internacional sobre *M. bovis*, ya que, aunque algunos patrones genéticos ya han sido reportados por países europeos, otros patrones fueron nuevos, con lo cual se enriqueció la base de datos mencionada anteriormente.

El presente estudio ha demostrado la utilidad de la epidemiología molecular en la prevención de especulaciones por razones de salud animal, en este caso por tuberculosis bovina, entre países que mantienen fuertes lazos comerciales.

Finalmente, se concluye que la tuberculosis es un problema que México y Estados Unidos comparten, y que la mejor manera de atacarla es trabajando de manera conjunta.

IX. BIBLIOGRAFIA

Acha, P. (1986). Zoonosis y Enfermedades Transmisibles comunes al hombre y a los animales. Edit. Organización Panamericana de la Salud. E.U.A.

Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L. (1996). Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 34 (11): 2734-2740.

Balandrano CS, Anzaldo FG, Peña FGP, Betancourt MX, (1996). Tuberculosis. Manual de Procedimientos de Laboratorio INDRE/SAGAR.2:15.

Bawinek F, Taylor NM, (1996). Assesment of the socio-econimic importante of Bovine Tuberculosis in turkey and posible strategies for control or eradication. Turkish-German Animal Health Information Project. General Directorate of protection and control, Ankara.

Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valways S, Onorato IM, Castro KG, Moers D, Yang Z, Stead WW, Bates JH. (1997). Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis os *Mycobacterium bovis* isolates from a state whit a large rural population. J infect Dis.175(6):1446-52.

Caminero LJA. (2003) Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. Paris, Francia.

Chávez A, de Chavez MM, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, et al. (1993). La nutrición en México y la transición epidemiológica. División de Nutrición en Comunidad. INNSZ, México.

Clifton-Hadley RS, Inwald J, Archer J, Huhes S, Palmer N, Sayers AR, Sweeney K, Van Embden JDA, Hewinson RG. (1998). Recent advanced in DNA fingerprinting using spoligotyping-epidemiological applications in bovine tuberculosis. BCVA. 6:79-82.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome secuencia, Nature, 393:537-44

Collins DM, Radford JA, de Lisle GW, Billman JH. (1994). Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. Vet. Microb. 40:83-94.

Committe en Bovine Tuberculosis, Board of Agriculture (1994). National Academy Press 2101 Constitution Avenue, NW Washington, D.C. 20418.

Cousin DV, Williams SN, Ross BC, Ellis TM. (1993). Use of a repetitive element isolates from *Mycobacterium tuberculosis* : a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 37(1-2):1-17.

Cousins D, Williams S, Liébana E, et al. (1998). Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 36(1): 168-178.

Daborn, CJ, y JM Grange. (1993). HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br Vet J.* 149, 403.

Delahay RJ, de Leew AN, Barlow AM, Clifton-Hadley RS, Cheeseman CL. (2002). The status of *Mycobacterium bovis* in UK wild animals: a review. *Vet J.*164:90-105.

DEFRA, UK. Animal Health and welfare. (2007). Bovine TB: protect your herd. www.defra.gov

Díaz, O.F. (2000). Aislamiento y caracterización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium bovis* que estimulan Linfocitos T de bovino. Tesis de Doctorado, C.U. UNAM.

Dolin, PJ, Raviglione, MC, Kochi, MC. (1994). Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ.* 172:211-220.

Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. (2000). Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. Applications of genotyping. *Rev. Sci. Tech.* 19(3):689-701

Emerging Diseases Issues, State of Michigan. (2007), Diseases that may affect Humans or Animals. Michigan Department of Natural Resources (2001-2006).

Enarson DA, Cheretien J. (1999). Epidemiology of respiratory infectious diseases. *Curr Opin Pulm Med.* 5:128-35.

Estrada CC. (1995). Análisis comparativo del diagnóstico presuntivo de tuberculosis bovina, utilizando las pruebas de intradermorreacción, interferón gama y elisa, basado en la inspección postmortem. Tesis de licenciatura. FESC.UNAM.

Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. (1978). The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet Rec.* 103(19):420-5.

Frothingham R, Meeker-O Connell WA, (1998). Genetic diversity in the mycobacterium tuberculosis complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology*. 144(5):1189-96-

Filliol I, Driscoll JR, van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valtudie G, Anh DD, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ, Brudey K, Cataldi A, Cooksey RC, Cousins DV, Dale JW, Dellagostin OA, Drobniowski F, Engelmann G, Ferdinand S, Gascoyne-Binzi D, Gordon M, Gutierrez MC, Haas WH, Heersma H, Kassa-Kelembho E, Ly HM, Makristathis A, Mammina C, Martin G, Mostrom P, Mokrousov I, Narbonne V, Narvskaya O, Nastasi A, Niobe-Eyangoh SN, Pape JW, Rasolofo-Razanamparany V, Ridell M, Rossetti ML, Stauffer F, Suffys PN, Takiff H, Texier-Maugein J, Vincent V, de Waard JH, Sola C, Rastogi N. J. (2003). Snapshot of Moving and Expanding Clones of Mycobacterium tuberculosis and Their Global Distribution Assessed by Spoligotyping in an International Study. *Clin Microbiol. May*; 41(5): 1963-1970.

Fisanotti JC, Alito A, Bigi F, Latini O, Roxo E, Cicuta E, Zumarraga MJ, Cataldi A, Romano MI. (1998). Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South America. *Vet Microbiol*. 60(2-4):251-7.

González Llamazares OR, Gutiérrez Martín CB, Álvarez Nistal D, de la Puente Redondo VA, Domínguez Rodríguez L, Rodríguez Ferri EF. (1999). Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon-gamma assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Vet Microbiol*. 70(1-2): 55-66.

Glynn JR, Bauer J, de Boer AS, Borgdorff MW, Fine PE, Godfrey-Faussett P, Vynnycky E. (1999). Interpreting DNA fingerprinting clusters of Mycobacterium tuberculosis. European Concerted Action on Molecular Epidemiology and control of Tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 3(12):1055-60.

Grange, J.M (2001). *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis* 81 (1/2):71-77.

Grange, J.M., Yates, M.D. (1994). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*. 40. 137-151

Grasser A, Graser R. (1986). The calibration, control and use of a diluted bovine tuberculin (PPD) for testing cattle in areas free from tuberculosis. *Dev Biol Stand*. 58(PtB):683-7.

Groenen PMA, Bunschoten AE, Van Soolingen D, Van Embden JDA. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis* : Application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol*. 10:1057-1065.

Haagsma J. (1986). Potency testing of bovine tuberculins. Dev Biol Stand. 58(PtB):689-94.

Isogen Bioscience BV. (1996). Spoligotyping, a method to detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Manual.

Jackson M, Raynaud C, Lanelle MA, Guilhot C, Kaurent-Winter C, Wnsergueix D, Gicquel B, Daffe M. (1999). Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the Mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. Mol Microbiol. 142(4):425-63.

Kammerbeek j, Schouls M, van Agterveld M, Kolk A. et al, (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 35:907-914.

Ketterer PJ, Rogers RJ, Donald B. (1981). Pathology and tuberculin sensitivity in cattle inoculated with *Mycobacterium avium* complex serotypes 6, 14 and 18. Aust Vet J. 57(2):61-5.

Liébana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gómez E, Tercero J, Alemany J, Suarez G, Domingo M, Domínguez L. (1995). Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organism in bovine tissue samples by PCR. J clin Microbiol. (1)33-36.

Luna ME, Mejia TC, Betancourt X, Valera NM, Mas IT, Peña FG, (1996) 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.

Maslow JN and Mulligan ME. (1993). Molecular Epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. Clin. Infect. Diseases.17:153-164.

McGavin MD, Mallmann VH, Mallman WL, Morril CC. (1975). Lesions and tuberculin sensitivity in calves inoculated with group III mycobacterial isolates from swine, pensoil and cattle feed. AM J Vet Res.36(5):641-4.

Milián SF, García CL, Anaya EA. (2004). INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRICOLAS Y PECUARIAS. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología Animal. Programa Nacional de Epidemiología. Distribución de enfermedades de los animales domésticos en México. (1990-2004).

Milián SF, Saldam MD, Ramírez C, Payeur JB Rhyan JC, Santillan M. (2000). Identification of tuberculosis in cattle slaughtered in México. Am J Vet Res. 61(1):86-89.

Milián SF, Salman M, Black W, Triantis J, Ramirez C, Payeur J. Torres M. (2000). Molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Mexico. Am J Vet Res 61(1):90-95.

Milián, S.F., Sánchez M.L, Toledo P., Ramírez C., Santillán M. (2000) Descriptive study of human and bovine tuberculosis in Querétaro, México. Revista Latinoamericana de Microbiología.42:13-19.

Milián SF, Banda RV, Ramirez CC, Arriaga DC. (2002). Genotyping of mycobacterium bovis by geographic location within México. Prev Vet Med. 55(4):255-64.

Ministry of Agricultura, Fisheries and Food. (1979). Third report. Bovine tuberculosis in badgers. London:HMSO.

Moda, G., Daborn, C., Grange, J.M., Cosivi, O. (1996). The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Tubercle and lung disease. 77. 103-108.

Monaghan ML, Doherty ML, Collins JD, Kazda JF, Quinn PJ. (1994). The tuberculin test. Vet Microbiol. 40(1-2):111-24.

Montoto Mariana A. Sección Bacteriología. (2005). Tuberculosis enfermedad emergente, cómo diagnosticarla. Laboratorio del Hospital Alemán. Laboratorio de Bacteriología de TBC. Programa de Control de TBC. Hospital E. Tornú. G.C.B.A. Disponible: <http://www.cih.com.br/ART.%20TBC.%20CAMO.htm>

Morris RS, Pfeiffer DU, Jacson R. (1994). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microb. 40:41-52.

National Agricultural Statistics Services. (2007). Bovine tuberculosis, infected cattle detected at slaughter and number of affected cattle herds United States, (2003-2007).www.aphis.usda.gov

National Center for Animal Health Programs. (2007). Status of Current eradication Program. www.aphis.usda.gov

Nei M and Li WH. (1979). Mathematical model for studing geneticfal variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74:5267-5273.

NOM-031-ZOO-1995. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoosanitaria (conaproz), normas oficiales mexicanas en materia de salud animal url : <http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/mrni/doc222/>

O' Reilly LM, Daborn CJ. (1995). the epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and man: a review. *Tuberc and Lung dis.* 76(1):1-46.

Payeur J. et al. (1993). Laboratory methods for the isolation and identification of Mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories. Animal and Plant Health Inspection Service. United States Department of Agriculture. Ames, Iowa.

Perumaalla VS., Adams LG., Payeur JB., Jarnagin JL., Baca DR., Guemes FS. y Ficht TA. (1996). Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* In Texas and Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(9):2066-2071.

Perumaalla VS, Adams LC, Payeur J, Baca D, Ficht TA. (1999). Molecular fingerprinting confirms extensive cow to cow intra herd transmission of a single mycobacterium bovis strain. *Vet Microbiol.* 70(3-4):269-76.

Pillai SD, Widmer KW, Ivey LJ, Coker KC, Newman E, Lingsweiler S, Baca D, Kelley M, Davis DS, Silvy NJ, Adams LG. (2000). Failure to identify non-bovine reservoirs of *Mycobacterium bovis* in a region with a history of infected dairy-cattle herds. *Prev Vet med.* 43(1):53-62.

Pollock J.M., McNair J., Welsh M.D., Girvin R.M., Kennedy H.E., Mackie D.P., Neill S.D. (2001). Immune responses in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*; 81(1/2): 103-107.

Romano MI, Alito A, Fisanotti JC, Bigi F, Kantor Y, (1996). Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol*, 50:59-71.

Roring S, Britain D, Bunschten AE, Van Embden JD, Neill SD. (1998) Spacer oligotyping of *Mycobacterium Bovis* isolates compared to typing by restriction Fragment length polymorphisms using PGRS, DR and IS6110 probes. *Vet Microbiol.* 15;61(1-2):111-20.

Ross BC, Raios K, Lackson K, Dwyer B. (1992). Molecular cloning of a highly repeat DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microl.*30(4):942-6.

Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR.(1990). A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Aust Vet J.* 67(4):134-7.

- SAGARPA. (2003). Informe sobre la situación de los recursos genéticos pecuarios de México.
- SAGARPA.(2006). Situación actual y perspectiva de la producción de carne de bovino en México.
- Santillán FMA, Flores j, Arriaga DC, Romero TC, Suárez GF, (2006). Polymorphism of the domain og PE/PE_PGRS secuencias in clinical isolates of *Mycobacterium bovis* in México. *Vet Microl.*115(4):364-9
- SENASICA.(2005). Campaña nacional contra la tuberculosis bovina.
- SENASICA.(2006). Tuberculosis bovina.
- SENASA. (2000). Manual de actualización en tuberculosis bovina. Buenos Aires Argentina.
- Skuce RA, Britain D, Hughes MS, Beck LA, Nelly SD, (1994). Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 32(10):2387-92
- Skuce RA, Britain D, Hughes MS, Nelly SD, (1996). Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. *J Clin Microbiol.* 34(10):2469-74.
- Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, locht C. (2001). Automated highthroughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based of mycobacterial interspersed respective units. *J Clin Microbiol.* 39(10):3563-71.
- Sut, A, SigueS, Sixou S, Lankhda-Ghazal F, Tocante JF, Lanelle G. 1990. Mycobacteria glicolipids as potencial pathogenicity effectors: alteration of models and natural membranes *Biochemistry.*29(36):8498-502.
- The *M. bovis* spoligotype database(2007). www.mbovis.org
- Thoen CO, and Bloom BR. (1995). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Tuboly S, Szent T. (1976) Specificity of antigenic fractions of tuberculin. *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* (238): 23-8
- Valdespino OJR. (1994). Impacto de la brucelosis y tuberculosis bovina durante 1992 en México. Proceedings of the <pan American Congreso of Veterinary Sciences, Acapulco, México.

Van Embden JD, Cave D, Crawford JT, Dale JW, Eisenach D, Gicquel B, Hermans P, et al., (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin. Microbiol. 31: 406-409.

Van Soolingen D, de Haas PE, Sol DR, Van Embden JD. (1991). Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol. 29:2578-86

Van Soolingen D, de Haas PE, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM et al. (1994). Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol, 32:2425-2433.

Van Soolingen D. (2001). Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. J I MEDICINE. 249:1-26.

World Health Organization. (1997). Global Tuberculosis Program, Global Tuberculosis Control, WHO report, Geneva, Switzerland. Publication No. WHO/TB/97.225.

Zumarraga MJ, Bernadelli A, Bastuida R, Quse V, Loureiro J, Cataldi A, Bigi F, Alito A, Castro-Ramos M, Sampers S, Otal I, Martin C, REomano MI. (1999). Molecular Characterization of mycobacterial isolates from seals. Microb. 145:2519-2526.

X. CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Clasificación de Regiones o Estados por el Departamento de Agricultura (USDA) de los Estados Unidos en relación a la Tuberculosis Bovina en México.

Estados o Regiones de origen	Clasificación de USDA	Requisitos de movilización para exportación a los EUA de Bovinos Castrados
Norte de Sonora	Acreditado Modificado Avanzado	No requiere pruebas de tuberculina
Sur de Sonora Aguascalientes (A) Baja California (A) Campeche (A) Coahuila (A) Chihuahua (A)	Jalisco (A1)-Zacatecas (A) Nuevo León(A) Sinaloa Tamaulipas Yucatán	Acreditado Modificado Requiere prueba de tuberculina al lote a movilizar
Colima Jalisco (A2) Jalisco (A3) Nayarit (A)	Veracruz (A) Puebla (A1, A2) Quintana Roo Tabasco (A)	Acreditado Preparatorio Requiere prueba de tuberculina al hato de origen y al lote a movilizar.
Aguascalientes (B) Baja California (B) Baja California Sur Campeche (B) Chiapas Chihuahua (B1, B2, B3) Coahuila (B1 y B2) Coahuila (La Laguna) Distrito Federal Durango Durango (La Laguna) Guajuato Guerrero Hidalgo	Jalisco (B) Nayarit (B) Nuevo León(B) México Michoacán Morelos Oaxaca Puebla (B) Querétaro San Luis Potosí Tabasco (B) Tlaxcala Veracruz (B) Zacatecas (B)	No Acreditado Movilización para exportación solo a sacrificio inmediato

Fuente: SENASICA 2005

Cuadro 2: Número de animales infectados con *Mycobacterium bovis* encontrados en rastros de los Estados Unidos.

BOVINOS POSITIVOS AL AISLAMIENTO DE <i>M. bovis</i>			
AÑO	DETECTADOS EN RASTRO	CASOS DE DE ORIGEN EXTRANJERO	TOTAL DE GANADO (CABEZAS)
2003	38	27	96,100,000
2004	36	22	94,888,000
2005	40	27	95,438,000
2006	28	26	96,701,500
Promedio a 2006	35.5	25.5	95,781,875
2007	17	9	97,002,900

Fuente: National Agricultural Statistics Service 2007 (Marzo 2007)

Cuadro 3: Estatus Actual del Programa de Erradicación de la Tuberculosis en Estados Unidos por estado y especie.

ESTADO	TB EN BOVINOS	TB EN VENADOS
AL	LIBRE	MA
AK	LIBRE	MA
AR	LIBRE	MA
AZ	LIBRE	MA
CA	LIBRE	MA
CO	LIBRE	MA
CT	LIBRE	MA
DE	LIBRE	MA
FL	LIBRE	MA
GA	LIBRE	MA
HI	LIBRE	MA
IA	LIBRE	MA
ID	LIBRE	MA
IL	LIBRE	MA
IN	LIBRE	MA
KS	LIBRE	MA
KY	LIBRE	MA
LA	LIBRE	MA
MA	LIBRE	MA
MD	LIBRE	MA
ME	LIBRE	MA
MI	MA/MAA/LIBRE	MA
MN	MAA	MA
MO	LIBRE	MA
MS	LIBRE	MA
MT	LIBRE	MA
NC	LIBRE	MA
ND	LIBRE	MA
NE	LIBRE	MA
NH	LIBRE	MA
NJ	LIBRE	MA
NM	MAA/LIBRE	MA
NV	LIBRE	MA
NY	LIBRE	MA
OH	LIBRE	MA
OK	LIBRE	MA
OR	LIBRE	MA
PA	LIBRE	MA
RI	LIBRE	MA
PR	LIBRE	MA
SC	LIBRE	MA
SD	LIBRE	MA
TN	LIBRE	MA
TX	LIBRE	MA
UT	LIBRE	MA
VA	LIBRE	MA
VI	LIBRE	MA
VT	LIBRE	MA
WA	LIBRE	MA
WI	LIBRE	MA
WV	LIBRE	MA
WY	LIBRE	MA

MA= Acreditado Modificado

MAA= Acreditado Modificado Avanzado

Fuente: National Center for Animal Health Programs 2007 (APHIS)

Cuadro 4: Información Epidemiológica disponible de las 84 cepas de *Mycobacterium bovis* de México y los Estados Unidos usadas en el estudio.

No. AISLADO	PATRON	ESTADO	ESPECIE	PROPOSITO
02-1852	6767336777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
03-4006	6767336777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
03-2616	6767366777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
03-2620	6767366777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
03-0248	6767736777 77600	NUEVO MEXICO	BOVINO	LECHE
91-2198	6667736777 77600	MONTANA	ALCE	SILVESTRE
27	4767636777 77600	AGUASCALIENTES	BOVINO	DESCONOCIDO
36	4767636777 77600	TAMAULIPAS	BOVINO	DESCONOCIDO
04-8012	6660736177 00600	TEXAS	BOVINO	DESC. RAST. A COL.
15	6660737777 77600	CHIHUAHUA	BOVINO	DESCONOCIDO
8	6640637777 77600	CHIHUAHUA	BOVINO	DESCONOCIDO
42	6640737777 77600	NUEVO LEON	BOVINO	DESCONOCIDO
9	6640737777 77600	JALISCO	BOVINO	DESCONOCIDO
6	6640737777 77600	SONORA	BOVINO	CARNE
10	2640637777 77600	CHIHUAHUA	BOVINO	DESCONOCIDO
13	2640637777 77600	CHIHUAHUA	BOVINO	DESCONOCIDO
21	2640737777 77600	NUEVO LEON	BOVINO	CARNE
30	2640737777 77600	JALISCO	BOVINO	LECHE
32	2640737777 77600	AGUASCALIENTES	BOVINO	LECHE
48	2640737777 77600	TAMAULIPAS	BOVINO	DESCONOCIDO
35	2640737777 77600	NUEVO LEON	BOVINO	CARNE
41	2640737777 77600	BAJA CALIFORNIA N	BOVINO	DESCONOCIDO
02-6570	2660737777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	DESCONOCIDO
02-4544	2660737777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
02-1652	2660737777 77600	TEXAS	BOVINO	LECHE
02-4170	2660737777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
04-6082	2660737777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
04-2067	2660737777 77600	TEXAS	BOVINO	LECHE
03-4181	6680637777 77600	TEXAS	BOVINO	CARNE
50	6680637777 77600	NUEVO LEON	BOVINO	DESCONOCIDO
02-5651	6660737777 77600	ARIZONA	BOVINO	DESCONOCIDO
02-0232	6600737777 77600	TEXAS	BOVINO	DESC. RAST. A AGS
03-5025	6660737777 77600	TEXAS	BOVINO	CARNE
01-5950	6660737777 77600	TEXAS	BOVINO	CARNE
02-4192	6660737777 77600	TEXAS	BOVINO	DESC. RAST. A AGS.
05-1687	6660737777 77600	TEXAS	BOVINO	DESC. RAST. A TAM.
02-2284	2660637777 77600	CALIFORNIA	BOVINO	LECHE
97-0214	6400337777 77600	MICHIGAN	VENADO	SILVESTRE
98-0415	6400337777 77600	MICHIGAN	VENADO	SILVESTRE
03-0752	6400337777 77600	MICHIGAN	BOVINO	DESCONOCIDO
03-5734	6400337777 77600	HAWAI	JABALI	SILVESTRE
03-0751	6400337777 77600	MICHIGAN	BOVINO	CARNE
03-1057	6400337777 77600	MICHIGAN	BOVINO	CARNE
02-4263	6400337777 77600	MICHIGAN	BOVINO	CARNE
03-5416	6400337777 77600	NUEVO MEXICO	BOVINO	DESCONOCIDO
99-0440	6400337777 77600	MICHIGAN	VENADO	SILVESTRE
99-0745	6400337777 77600	MICHIGAN	VENADO	SILVESTRE
99-3877	6400237777 77600	HAWAI	JABALI	SILVESTRE
02-1372	6400337777 77600	HAWAI	JABALI	SILVESTRE
95-1315	6400337777 77600	MICHIGAN	VENADO	SILVESTRE
05-2438	6400337777 77600	MICHIGAN	COYOTE	SILVESTRE
03-2859	6400337777 77600	NUEVO MEXICO	BOVINO	LECHE
03-2070	6400337777 77600	MICHIGAN	BOVINO	CARNE
02-6234	6400337777 77600	MICHIGAN	BOVINO	LECHE
34	6400337777 77600	SONORA	BOVINO	CRUZA
37	6400337777 77600	BAJA CALIFORNIA N.	BOVINO	DESCONOCIDO
26	6400337777 77600	TAMAULIPAS	BOVINO	DESCONOCIDO
29	6400337777 77600	AGUASCALIENTES	BOVINO	CRUZA
02-6627	6400237777 77600	MICHIGAN	BOVINO	LECHE
4	6400337777 77600	SONORA	BOVINO	LECHE
03-2069	6400337777 77600	MICHIGAN	BOVINO	CARNE
17	6400337777 77600	TAMAULIPAS	BOVINO	CARNE
20	6400337777 77600	TAMAULIPAS	BOVINO	CARNE
2	6400337777 77600	SONORA	BOVINO	CRUZA
28	6765637777 76600	JALISCO	BOVINO	LECHE
22	4400237777 76600	COAHUILA	BOVINO	LECHE
3	4400237777 77600	SONORA	BOVINO	LECHE
38	4400237777 77600	BAJA CALIFORNIA N.	BOVINO	DESCONOCIDO
43	6400337777 77600	BAJA CALIFORNIA N.	BOVINO	DESCONOCIDO
7	0440637777 57600	CHIHUAHUA	BOVINO	DESCONOCIDO
44	0440617777 57600	COAHUILA	BOVINO	DESCONOCIDO
46	2640637777 77600	NUEVO LEON	BOVINO	DESCONOCIDO
5	4200237777 47600	SONORA	BOVINO	LECHE
16	0440636377 46600	CHIHUAHUA	BOVINO	LECHE
12	4440636377 46600	CHIHUAHUA	BOVINO	LECHE
31	4440637777 46600	JALISCO	BOVINO	LECHE
47	4440637777 00600	NUEVO LEON	BOVINO	DESCONOCIDO
40	2640737777 77600	TAMAULIPAS	BOVINO	DESCONOCIDO
39	6400136377 46600	NUEVO LEON	BOVINO	DESCONOCIDO
19	6765737770 77600	NUEVO LEON	BOVINO	CARNE
23	6765737770 77600	NUEVO LEON	BOVINO	CARNE
18	6765737770 77600	BAJA CALIFORNIA N.	BOVINO	DESCONOCIDO
49	6765737770 77600	NUEVO LEON	BOVINO	DESCONOCIDO
14	6400130177 77600	CHIHUAHUA	BOVINO	DESCONOCIDO

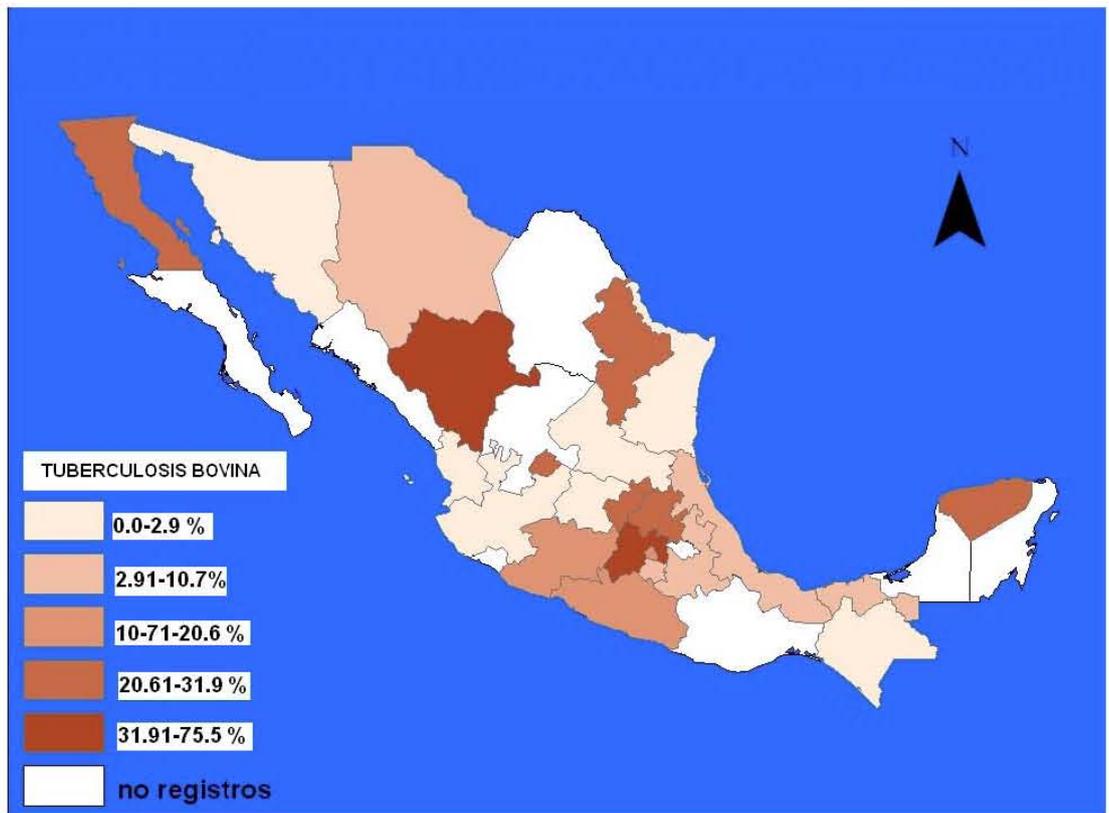


Figura 1: Distribución y Prevalencia de la Tuberculosis Bovina 1990-2004

Fuente: INIFAP 2004 (Distribución de enfermedades de importancia económica de los animales domésticos en México Programa Nacional de Epidemiología 1990-2004)

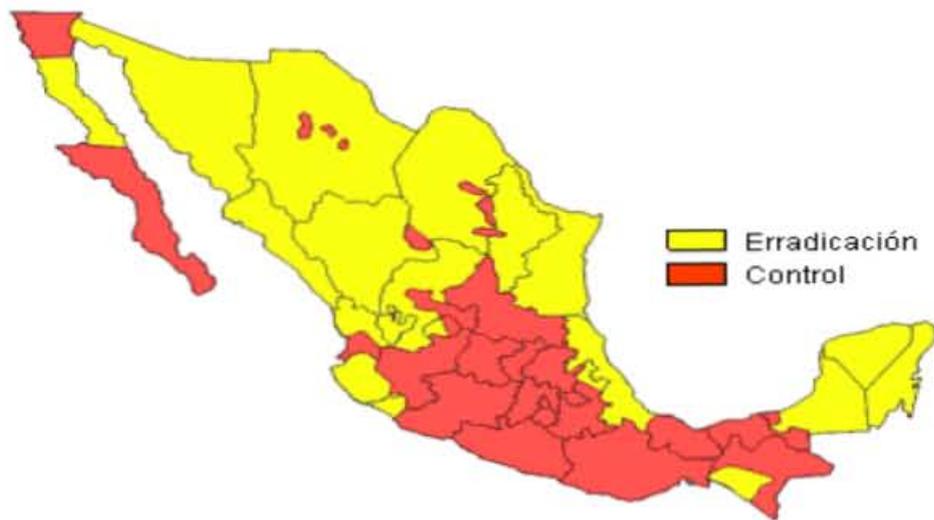
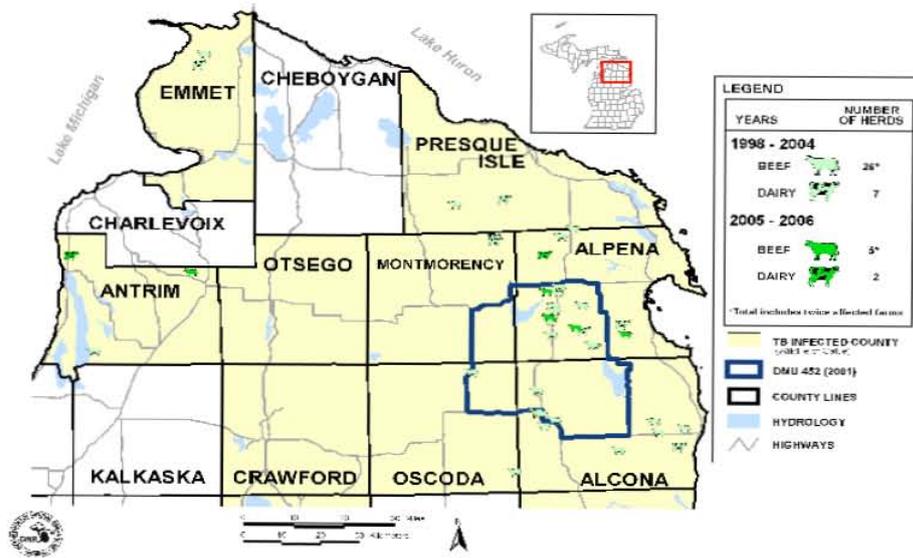


Figura 2: Situación de la Tuberculosis Bovina en México 2005, Clasificación de los Estados Mexicanos de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995

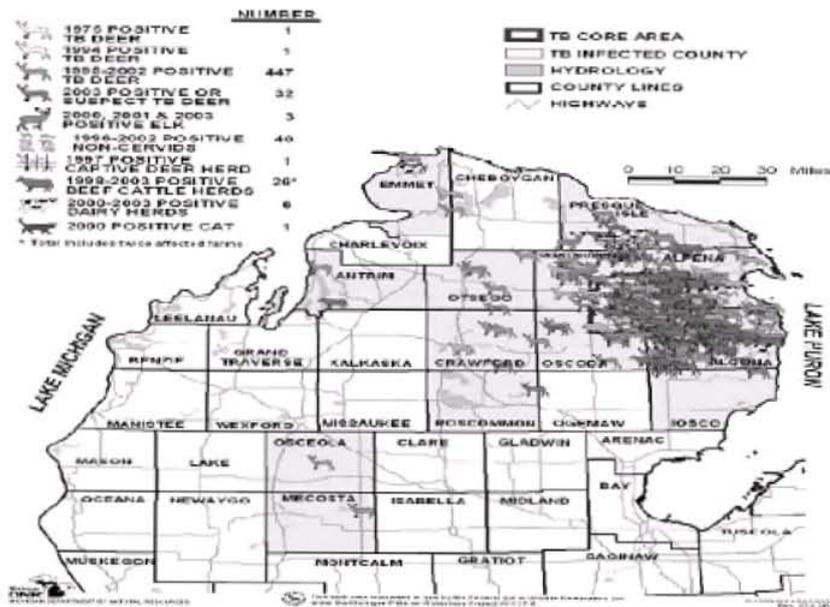


Figura 3: Clasificación de los Estados o Regiones de México, realizadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en relación a la Tuberculosis Bovina.

Fuente: SENASICA 2005



(A)



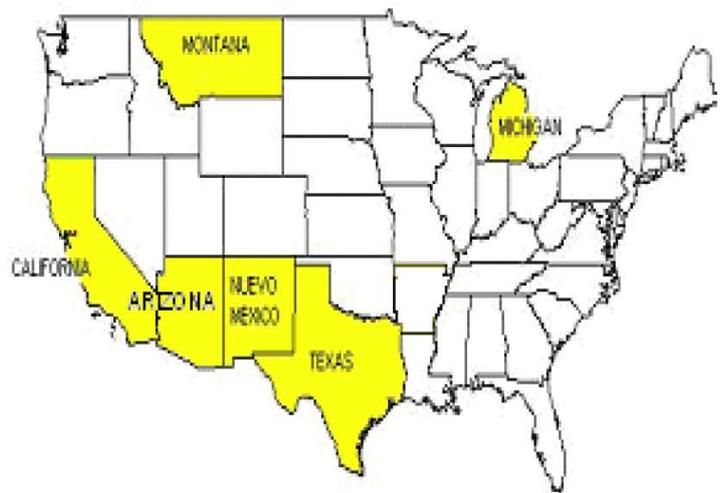
(B)

Figura 4: Datos positivos a Tuberculosis Bovina en Michigan, (panel A) Información de animales silvestres positivos a *M. bovis* en Michigan, (panel B)

Fuente: Emerging Diseases Issues 2006



(A)



(B)

Figura 5: Localización geográfica de los aislados de *M. bovis* de México (panel A) y EEUU (panel B), utilizados en el presente trabajo.

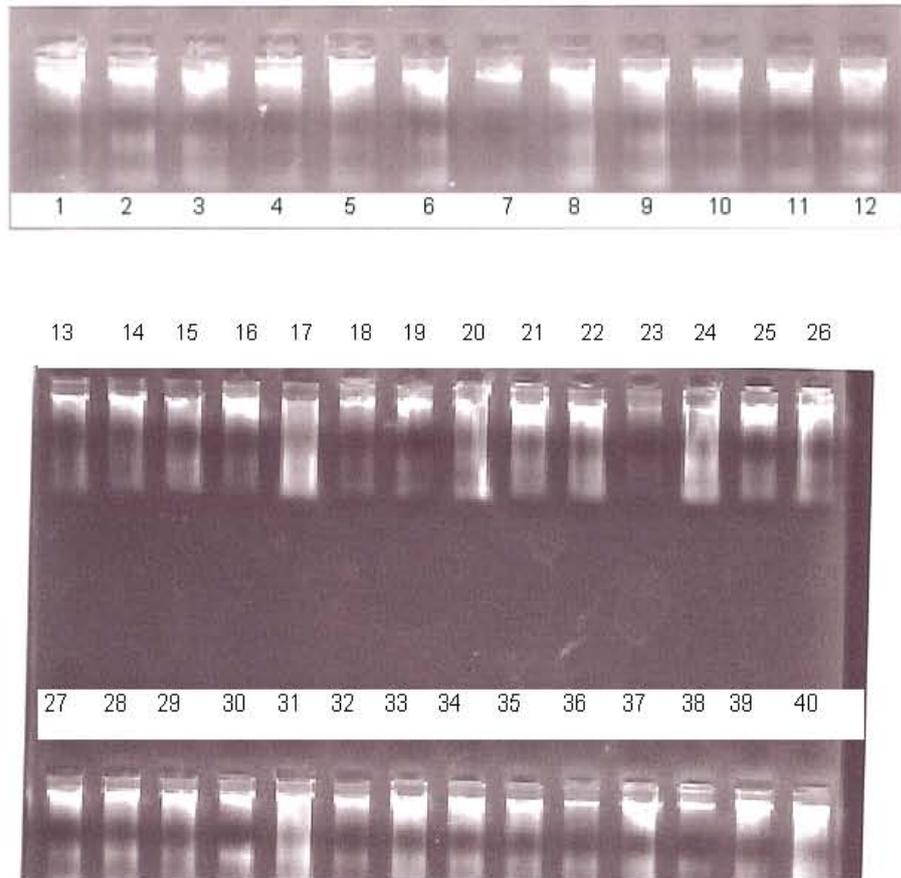


Figura 6: Fotografía de Gel de Agarosa al 12% mostrando la presencia de ADN de cepas de *Mycobacterium bovis* de México y los Estados Unidos.

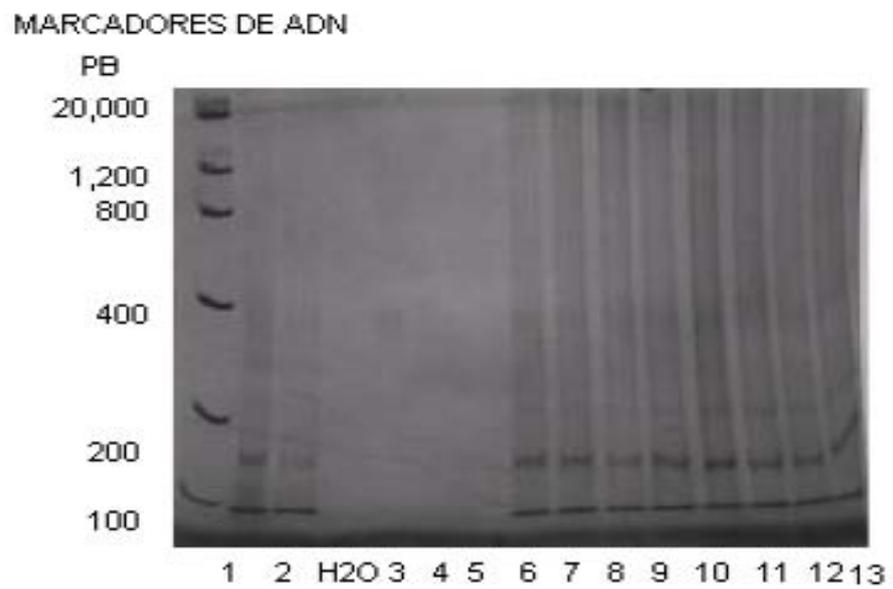


Figura 7: Fotografía de Gel de Poliacrilamida al 12% mostrando los productos De amplificación obtenidos por PCR utilizando ADN de cepas de *Mycobacterium bovis* de México y los Estados Unidos.

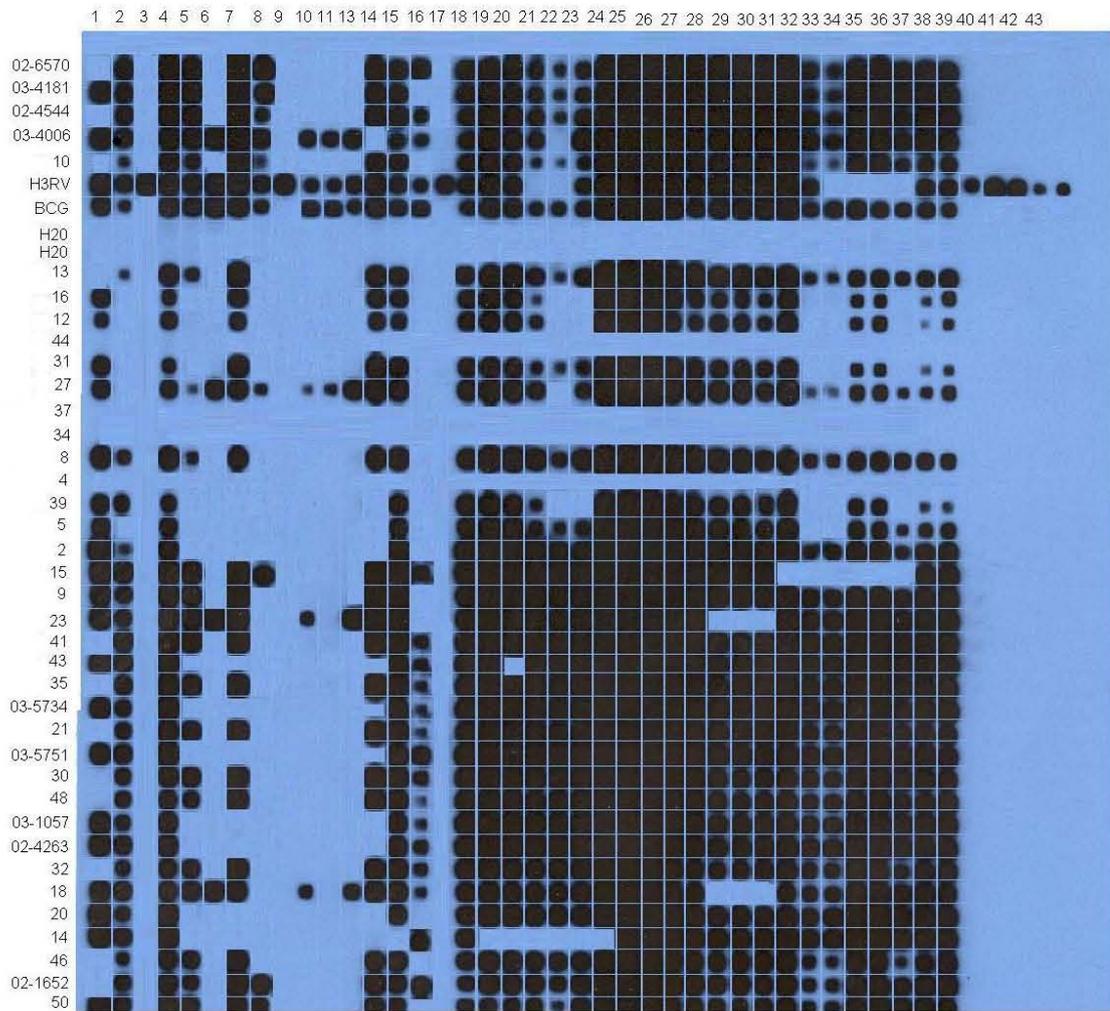


Figura 8: Radiografía de una Membrana de Nylon mostrando 38 Patrones Genéticos de los 84 aislados de *Mycobacterium bovis* de México y los Estados Unidos tipificados con “Spoligotyping.”

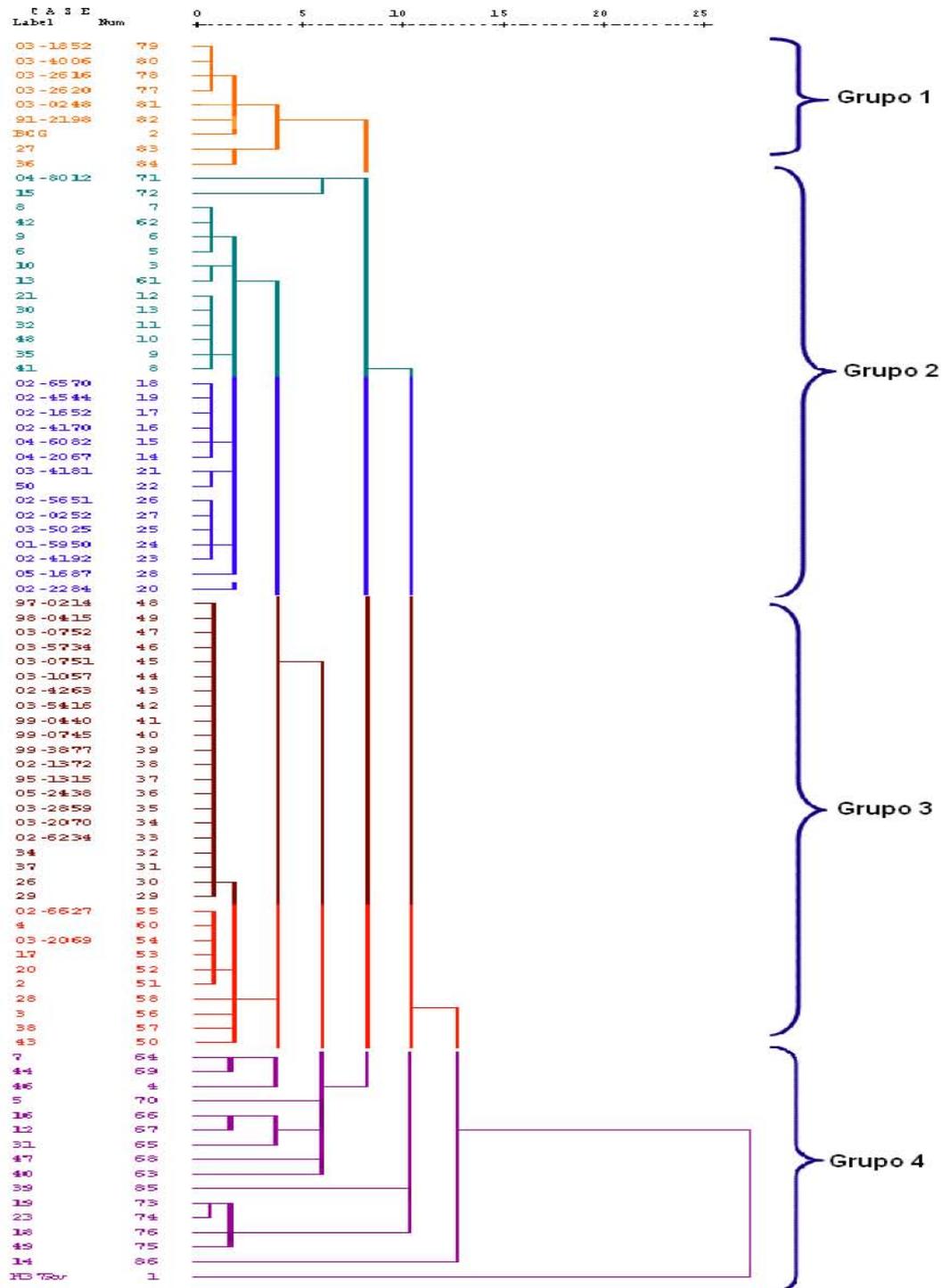


Figura 9: Dendrograma mostrando la Distribución y la Relación Genética entre 84 cepas de *Mycobacterium bovis*, 44 de México y 40 de los Estados Unidos. Cepas identificadas con dos dígitos son de origen Mexicano, el resto pertenece a los Estados Unidos.

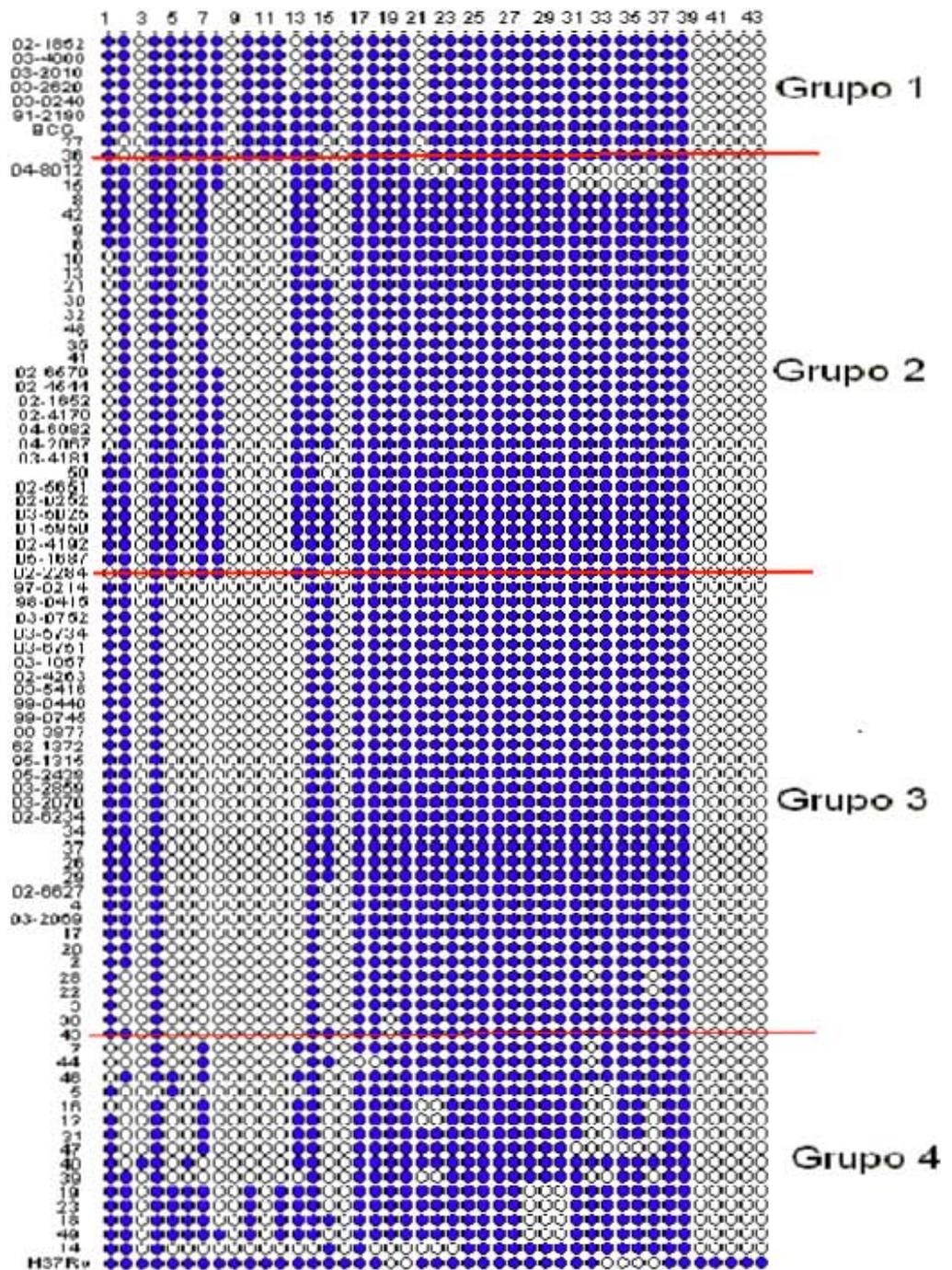


Figura 10: Representación Esquemática de los Patrones de las 84 cepas de *Mycobacterium bovis* de México y los Estados Unidos en el mismo orden en que aparecen en el Dendrograma.

XI. ANEXOS

Anexo I

MEDIOS DE CULTIVO

PREPARACION DEL MEDIO STONEBRINK

INGREDIENTES (para 1200ml del medio)

Mezcla de sales

Piruvato de Sodio (Sal pirúvica ácida de Sodio)	5.0gm
Fosfato potásico monobásico	2.0gm
Agua destilada	300ml
Fosfato Sódico dibásico	1.4gm
Aprox para un pH de 6.5	

Mezcla del colorante

Cristal Violeta	100mg
Verde Malaquita (forma de Oxalato)	800mg
Agua destilada	100ml

Mezcla de huevo

20 huevos enteros preparados asépticamente
Esta preparación sirve para 140 medios

METODO DE PREPARACION

Mezclar la solución de sales hasta que se disuelvan completamente. Ajustar el pH a 6.5 con fosfato sódico dibásico. Colocar el matraz servidor. Mezclar la solución de colorante hasta que esté completamente disuelta, colocarla en el frasco con tapa de rosca, esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Mantener en refrigeración.

Preparación de la mezcla de huevos:

Los huevos deben ser frescos, las aves de postura no debieron haber recibido medicamentos en el alimento o como tratamiento. Remojar los huevos en solución de alcohol isopropilico durante 30 min, secar con toallas estériles, sumergir en alcohol una pequeña parte, abrir el huevo por la parte estéril y verter el contenido en el recipiente. Mezclar los huevos hasta que se homogenicen pero que no se produzcan burbujas. Agregar la mezcla de colorante a la mezcla de sal en el matraz servidor. Filtrar los huevos y añadirlos a la mezcla en el bote aspirador,

mezclar y homogenizar. Depositar la mezcla en tubos asépticos. Inclinar los tubos por 30 min a 82°C, enfriar e incubar por 24 horas.

PREPARACION DEL MEDIO LOWENSTEIN-JENSEN

INGREDIENTES (para 1612ml del medio)

Base de medio Lowenstein	37.0 g
Acido Piruvico(sustituyendo al glicerol)	5.0 g x litro
Agua destilada	600.0 ml
Huevos completos (asépticos)	1000.0 ml
1 N HCL	20.0 ml

METODO DE PREPARACION

Adicionar el medio base al agua destilada. Mezclar en la batidora hasta obtener una solución uniforme. Hervir la mezcla para verterla posteriormente en el recipiente aspirador conteniendo el acido piruvico, adicionar el HCL. Esterilizar en autoclave por 20 min a 121°C y dejarlo reposar en el cuarto atemperado.

Anexo II

Extracción de ADN

- 1.-Tomar el cultivo o el tejido macerado y transferir aproximadamente 100mg de peso húmedo, a un tubo de microcentrífuga que contenga 400µl de TE 1X. Si trabaja con cultivos bacterianos puros inactivados a 80 °C durante 30min., y enfriar a temperatura ambiente.
- 2.-Adicionar 50 µl de lisozima (10mg/ml), agitar e incubar a 37°C durante 1hr (este procedimiento puede durar toda la noche).
- 3.-Adicionar 70 µl de SDS 10% y 5µl de proteinasa K (20mg/ml), agitar e incubar a 65°C durante 10min.
- 4.-Adicionar 100µl de NaCl 5 M. Adicionar 100µl de CTAB/NaCl (Esta solución debe precalentarse a 65°C), agitar hasta que la solución tome una consistencia lechosa. Incubar a 65°C durante 10min.
- 5.-Adicionar 750µl de cloroformo/alcohol isoamílico, agitar para hacer una solución homogénea.
- 6.-Centrifugar a 12000g durante 5min.
- 7.-Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (aprox 600µl), teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia, ya que esto puede contaminar el DNA.
- 8.-Transferir en volúmenes de 200µl. Adicionar 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico (360µl aprox), para precipitar los ácidos nucleicos.
- 9.-Dejar la mezcla a -20°C durante 30min. (Este procedimiento puede durar toda la noche).
- 10.-Centrifugar a 12000g durante 1min. Descartar la mayoría del sobrenadante, dejando aprox 20µl por encima del botón de DNA.
- 11.-Adicionar 1µl de etanol al 70% frío (mantener a -20°C). Centrifugar a 12000g durante 5min, descartar la mayoría del sobrenadante. Dejar 20µl por encima del botón de DNA.
- 12.-Centrifugar a 12000g durante 1min y decantar cuidadosamente el sobrenadante.
- 13.-Permitir que el DNA seque a temperatura ambiente. Más o menos durante 20min.
- 14.-Disolver el DNA en 20µl de amortiguador TE1X o en agua MilliQ, puede ser almacenado a 4° o a -20 °C hasta su uso en el laboratorio.

Para una estimación rápida de la concentración de DNA, se puede correr 1µl del DNA en solución en un gel de agarosa.

Anexo III.

PREPARACIÓN DE GELES

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

1. Preparar 50 ml de agarosa al 12% en buffer TBE 1X, calentar a ebullición, agregar 3 ml de bromuro de etidio y agitar, después enfriar hasta 50°C.
2. Vaciar la agarosa en un molde de 8x10x0.5 cm, con un peine con capacidad de 20 μ l por orificio, dejar gelificar (45 min aproximadamente)
3. Colocar el gel en una cámara de electroforesis.
4. Mezclar en un tubo Eppendorf 10 μ l de la muestra de ADN obtenida más 2 μ l de jugo azul 6X y depositar la mezcla en un carril de gel.
5. Agregar 500 ml de buffer TAE 1X. El buffer deberá cubrir completamente el gel.
6. Dejar correr a 100 volts por 20 min.
7. Observar con el fotodocumentador

PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Reactivos para gel de corrimiento	12%
Solución de acrilamida-bisacrilamida	6.250ml
Buffer pH 8.8 (6.8*)	1.875ml
SDS 10%	0.150ml
Persulfato de amonio 1.5%	0.750ml
H ₂ O	5.975ml
TEMED	10 l

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

1. Separa los vidrios del gel tras el corrimiento electroforético.
2. Separar el gel usando una solución de ácido acético glacial y etanol (5ml en 45ml de agua) agitar durante 15min.
3. Retirar la solución y adicionar la solución de tinción de nitrato de plata (500 l de nitrato de plata en 50ml de agua) y agitar durante 15min.
4. Retirar la solución y lavar dos veces con agua milliQ
5. Agregar la solución de revelado (400 l de formaldehído y aforar a 50ml con hidróxido de sodio al 3%)
6. Agregar la solución de paro (500 μ l de ácido acético glacial concentrado y aforar a 50ml con agua milliQ).

Anexo IV

PROTOCOLO DE SPOLIGOTYPING

1. Antes de usar la membrana, enjuagar 2 veces con agua milliQ esteril.
2. Lavar la membrana durante 5min. con 50ml de SSPE 2X/SDS 0.1% a 60°C.
3. Colocar la membrana en el miniblotter MN45
4. Adicionar 20µl del producto de amplificación en 150µl de SSPE2X/SDS0.1% precalentar a 60°C/10min y calentar a ebullición durante 10min para desnaturalizar los productos de amplificación.
5. Una vez desnaturalizados colocar inmediatamente en hielo, para mantener desnaturalizados los productos.
6. Cada producto de amplificación se colocará en uno de los carriles del miniblotter MN45 evitando la formación de burbujas, así como la contaminación de las demás celdas.
7. La membrana se hidridara a 60°C durante 45min (si la membrana, tiene más de 15 usos hidridar hasta 1:15hrs).
8. Remover la membrana evitando contaminación y colocarla en un tubo de hidridación.
9. Adicionar de 50 a 250ml de SSPE2X/SDS 0.5% y se colocar en el horno de hidridación a 60°C durante 15min. Repetir este paso dos veces.
10. Agregar el conjugado estreptavidina/peroxidasa, para lo cual se hace una dilución 1:4000 (5µl de conjugado en 20ml de SSPE2X/SDS 0.5%) Incubar durante 1hr a 42°C. *Nota:* El horno debe de estar a 42°C para evitar que la enzima se desactive.
11. Lavar dos veces con 100ml (250 ml) de SSPE2X/SDS 0.5% durante 10min a 42°C.
12. Lavar 1 vez con 100ml de SSPE2X durante 5 min. a temperatura ambiente (30°C)
13. Sacar la membrana, ponerla sobre un acetato y adicionar sobre la membrana el reactivo de ECL (3ml de cada reactivo) hasta que se cubra bien y colocar otro acetato sobre la membrana. Incubar durante 1min a 37°C.
14. Colocar la membrana en un cassette para rayos X en un cuarto oscuro y sobreponer una película de rayos X sobre los acetatos, cerrar el casete y dejar en exposición durante 10 a 60min (según el uso de la membrana).
15. Revelar la película durante 1min, lavar la película durante 10seg y fijar durante 2min. Finalmente enjuagar la película durante 10seg y observar.
16. Después de usar la membrana lavarla con SDS10% (5ml de SDS10% y aforar a 50ml con agua destilada) a 80°C durante 30min, descartar la solución. Este paso se hace dos veces.
17. Agitar durante 15 min con EDTA pH 8.0 200mM (5ml de EDTA 200nM pH 8 y aforar a 50ml con agua destilada) a temperatura ambiente y descartar la solución.
18. Agregar EDTA (5ml de EDTA 200nM pH 8 y aforar a 50ml con agua destilada) y refrigerar.

Anexo V

PROGRAMA ESTADISTICO SPSS

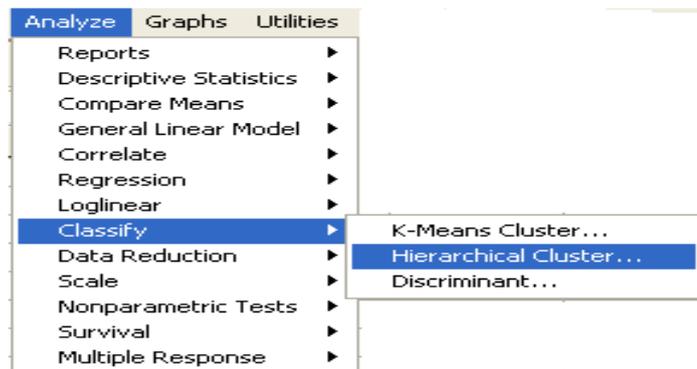
Elaboración del Dendrograma

1.- Abrir SPSS

- Aparece una hoja la cual tiene en la parte inferior dos pestañas (Data View y Variable view)
- En la hoja de trabajo llamada (Data View), en la primera columna se colocan la identificación de cada aislado y en las demás columnas y renglones se colocan los “1” y “0” de cada uno de los patrones genéticos.
- En la hoja (Variable View), en la primera celda se escribe “MUESTRA” y en esa misma columna se insertan el numero de los espaciadores (DR’s del 1 al 43).

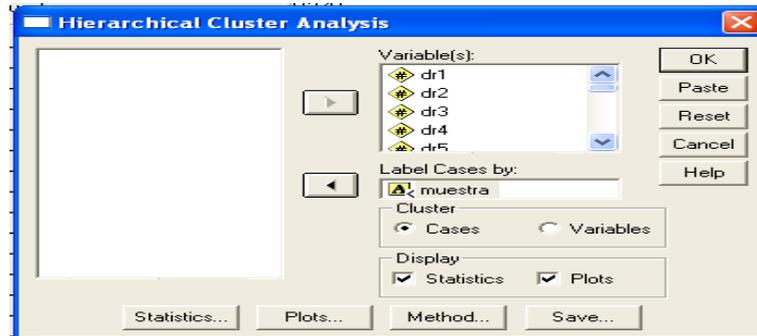
2.- Seleccionar “Analyze” del menú .

- Aparece un menú de herramientas,
- seleccionar “CLASSIFY” → Hierarchical Cluster

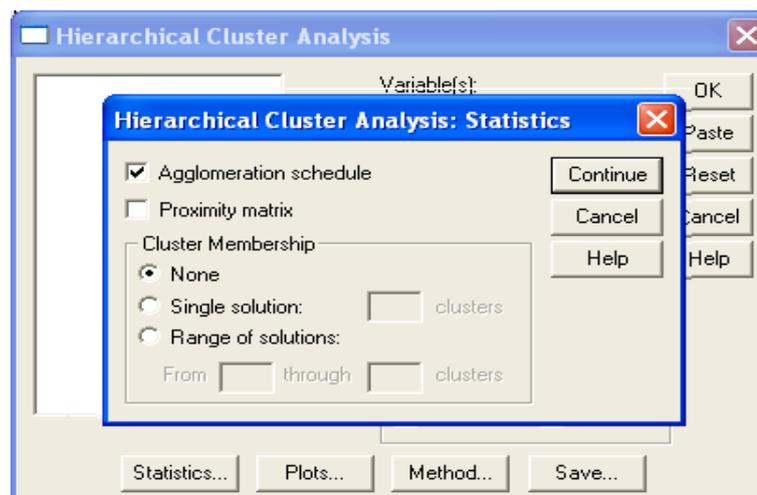


3.- Aparece un recuadro con los datos que insertamos en las hojas anteriores, los cuales se acomodan de la siguiente manera:

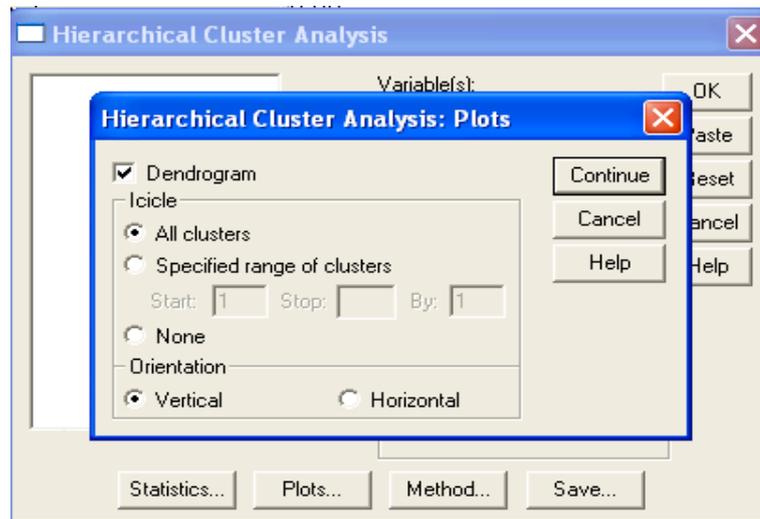
- En el cuadro nombrado: “VARIBLE(S)”, se insertan los DR’s (seleccionar del 1 a 43)
- En el cuadro llamado: “LABEL CASE”, se inserta “MUESTRA”
- A continuación esta una opción llamada “CLUSTER” aquí se selecciona “CASES”



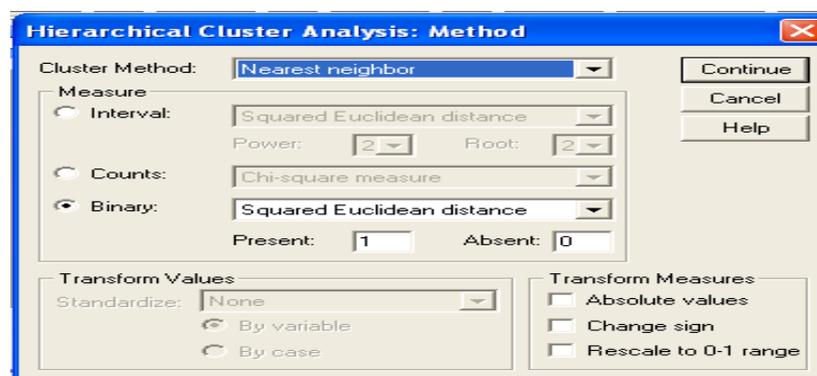
- En la Opción “DISPLAY” : Seleccionar “ESTADÍSTICS Y PLOTS”
- En la parte inferior del recuadro aparecen varias opciones.
⇒ Dar clic en la opción “STATISTIC”
- Seleccionar: AGLOMERATION SCHEDULE → Continuar



- En la opción “PLOTS”, seleccionar “DENDROGRAMAS”



- En la opción ICICLE seleccionar: “ALL CLUSTERS”
- En opción ORIENTACIÓN, seleccionar “VERTICAL” → Continuar
- En la opción METHOD:
- Seleccionar “CLUSTER METHOD”: NEAREST NEIGHBOR
⇒ En la opción MEASURE:
- Seleccionar “BINARY” → SQUARED EUCLIDIAN DISTANCE → Continuar



- Seleccionar "OK" del recuadro
- Aparece el DENDROGRAMA

