



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

USO DEL SPOLIGOTYPING COMO PRUEBA PARA EL
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

MVZ. ARITZEL TOLEDO OCAMPO

TUTOR:

DRA. en C ELIZABETH MORALES SALINAS
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)

COMITÉ TUTOR:

DR. en C JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia)

DRA. en C CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN
(Instituto de Investigaciones Biomédicas)

MÉXICO D.F JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres, los seres más bellos que he conocido en mi vida y que siempre me han apoyado y amado incondicionalmente.

A mis hermanas, por ser dos grandes ejemplos de lucha fortaleza y amor.

A mi hermano, sé que aún me acompañas y cuidas donde quiera que estés.

A mi sobrino, que es una de las alegrías de mi vida y una persona responsable y admirable a pesar de su corta edad.

A mi tía Leticia y mi primo Fernando que son mi segunda familia y un apoyo importante.

Al M en C Víctor Manuel Banda Ruíz por ser un gran ser humano y excelente profesional.

A mis amigos: Ayde, Yuiatzin, Erika, Adriana, Ana Isabel, Vilma, Francisco, Joaquín, Liz, Pavana, Mayra, que me han regalado mil recuerdos y momentos especiales.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por el apoyo recibido a través del programa PAEP.

Al CONACYT por el apoyo a los estudiantes.

A la FMVZ y a los profesores por permitirme seguir siendo parte de su historia y sus enseñanzas.

A la FESC porque ahí mi historia como profesionista empezó.

Al CENID-Microbiología, el Laboratorio de Leptospirosis, y el Laboratorio de Tuberculosis por permitirme la realización del trabajo experimental.

Al M en C Víctor Manuel Banda Ruíz mil gracias por creer en mí, por darme la oportunidad de ser tesista de posgrado, por todo el tiempo y las enseñanzas compartidas y sobre todo por la paciencia.

A la M en C Guadalupe Socci y la MVZ Elvira Carrera, por su apoyo, enseñanzas y paciencia.

Al M en C Marco por apoyarme con el trabajo experimental.

A la Dra Elizabeth Morales Salinas por todo su tiempo, su apoyo y ayuda.

Al Dr José Juan Martínez Maya y la Dra Clara Espitia Pinzón por enriquecer y aportar en el avance del trabajo.

Al Dr. Alfredo Sahagún, Dr. Orbelin Soberanis y el Dr. Alfredo Castañeda, por sus sugerencias y mejoras en el presente trabajo.

INDICE

| | Página |
|--|---------------|
| 1. INDICE | ii |
| 2. LISTA DE APENDICE 1 FIGURAS | iii |
| 3. LISTA DE APENDICE 2 CUADROS | iv |
| 4. LISTA DE APENDICE 3 PREPARACIÓN DE REACTIVOS | v |
| 5. Resumen | 1 |
| 6. Abstract | 2 |
| 7. Introducción | 3 |
| 8. Justificación | 11 |
| 9. Hipótesis | 12 |
| 10. Objetivos | 13 |
| 11. Materiales y Métodos | 14 |
| 12. Resultados | 18 |
| 13. Discusión | 21 |
| 14. Conclusiones | 31 |
| 15. Referencias | 74 |

| APENDICE 1 | FIGURAS | PÁGINA |
|-------------------|--|---------------|
| | Figura 1. PCR de diagnóstico con MPB70. Gel de agarosa al 1.5%. Líneas 1 y 2 muestras positivas, línea 3 muestra negativa, línea 4 control negativo, línea 5 control positivo y línea 6 marcador de peso molecular de 100 pb. | 32 |
| | Figura 2. Testigo positivo de <i>Mycobacterium phlei</i> para la prueba bioquímica de la determinación de fotoreactividad. | 32 |
| | Figura 3. Prueba para detectar Acumulación de Niacina. | 33 |
| | Figura 4. Prueba de reducción de Nitritos a Nitratos. | 33 |
| | Figura 5. Actividad de la Catalasa. | 34 |
| | Figura 6. Prueba de Hidrólisis de Tween 80. | 34 |
| | Figura 7. Prueba de pirazinamida. | 35 |
| | Figura 8. Morfología colonial en medio de Lowenstein-Jensen. | 35 |
| | Figura 9. Dendograma de patrones obtenidos en Spoligotyping de tejido. | 36 |
| | Figura 10. Dendograma de patrones obtenidos en Spoligotyping de cepas. | 37 |

APENDICE 2**CUADROS**

| | PÁGINA |
|--|---------------|
| Cuadro 1. Relación de los resultados de 101 muestras analizadas | 38 |
| Cuadro 2. Clasificación de los agentes por bioquímicas y Spoligotyping de tejido y cepa. | 38 |
| Cuadro 3. Muestras positivas a aislamiento y a Spoligotyping de tejido. | 39 |
| Cuadro 4. Patrones de Spoligotyping de tejido y cepas. | 39 |
| Cuadro 5. Rastreo de los patrones obtenidos en la prueba Spoligotyping a partir de tejido. | 40 |
| Cuadro 6. Rastreo de los patrones obtenidos en la prueba Spoligotyping a partir de cepas. | 42 |
| Cuadro 7. Patrones de muestras de tejido ordenadas en base al número de deleciones y su identificación de espoligotipo. | 45 |
| Cuadro 8. Patrones de cepas ordenadas en base al número de deleciones y su identificación de espoligotipo. | 46 |

APENDICE 3 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

| | PÁGINA |
|---|---------------|
| Formalina amortiguada al 10% | 47 |
| Descontaminación de muestras ácido-álcali | 47 |
| Reactivos para la descontaminación álcali-ácido. | 48 |
| Descontaminación con Zephiran | 49 |
| Cloruro de benzalconio “Zephiran” | 49 |
| Medio de Lowenstein Jensen | 50 |
| Medio de Stonebrink | 52 |
| Procedimiento para la siembra | 54 |
| Procedimiento para la extracción de ADN genómico con CTAB | 55 |
| Preparación de soluciones para extracción | 57 |
| PCR MPB70 | 58 |
| PCR Dra y Drb Complejo tuberculosis | 59 |
| Procedimiento para realizar la prueba de Spoligotyping | 60 |
| Preparación de soluciones para Spoligotyping | 62 |
| Pruebas bioquímicas | 63 |

RESUMEN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), caracterizada por la formación de granulomas en nódulos linfáticos de pulmón. Afecta animales domésticos, principalmente bovinos y al hombre. El diagnóstico se realiza por aislamiento bacteriológico seguido de la tipificación bioquímica, obteniendo resultados en 12 semanas, a manera de contribuir con la campaña nacional y obtener información rápida con respecto al diagnóstico, brotes y trazabilidad el objetivo es demostrar la funcionalidad del Spoligotyping como prueba diagnóstica complementaria a partir de tejido. El muestreo se realizó en la Región Lagunera; se obtuvieron 101 muestras de nódulos linfáticos de ganado bovino raza Holstein con lesiones sugestivas de tuberculosis, enviados a rastro. Se cultivó por duplicado en los medios Stonebrink y Lowenstein Jensen y se tipificaron mediante pruebas bioquímicas. Se realizaron pruebas de PCR a partir de tejidos empleando como secuencia blanco una región de 372 pb dirigida al gen de la proteína MPB70. Se realizó Spoligotyping a partir de tejido y cepa seguido del análisis filogenético con el programa SSPS. Se obtuvo el 43.56% (44/101) de aislamientos a *Mycobacterium spp.* Al tipificarse bioquímicamente resultaron 33 *M. bovis*, 10 *M. spp.* y una muestras no se pudo procesar. Mediante la PCR-MPB70 se obtuvo 28.71% (29/101) muestras positivas. La prueba de Spoligotyping a partir de tejido detectó 53.46% (54/101) muestras positivas. Se determinaron 50 patrones genéticos diferentes en tejidos, 32 de los cuales resultaron *M. bovis* y 18 *M. tuberculosis*. Los patrones de las cepas fueron 18 para *M. bovis* y 10 para *M. tuberculosis*. Por lo que se concluye que la prueba de Spoligotyping que fue diseñada para tipificar las especies del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* además demostró ser de utilidad como prueba diagnóstica complementaria por su capacidad de detectar y diferenciar a dos de las principales especies de dicho complejo: *M. bovis* y *M. tuberculosis* a partir de muestras clínicas.

Palabras clave: *M. bovis*, *M. tuberculosis*, Tuberculosis bovina, Spoligotyping.

ABSTRACT

Bovine tuberculosis is an infectious disease. Caused for *M. bovis*, characterized by the formation of granulomas in lung lymph nodes. This disease affects cattle, wild animals and humans. The diagnosis method its by bacterial isolation, this test is insensitive and time consuming; the goals were: To demonstrate the functionality of the Spoligotyping test like a diagnosis test; and compare the results of isolation and biochemical tests *versus* Spoligotyping. The Samples were collected from slaughter in la Región Lagunera, México. We take 101 samples lymph node from Holstein cattle with lesions suggestive of bovine tuberculosi. We used two techniques for decontamination (acid-alkali and zephiran). Cultured were performed in duplicate in medium Stonebrink and Lowenstein Jensen, 44 isolates (*Mycobacterium* sp) were obtained; which were typified by biochemical tests. A PCR test was performed on the protein MPB70 target. By PCR we obtained 29 positive samples. We was able to obtain another hand we obtained 54 tissues positive samples by Spoligotyping. Phylogenetic analysis was carried out with the statistical program IBM SSPS Statistics 22, we obtained 50 genetic patterns determined in tissues; 32 *M. bovis*, 18 *M. tuberculosis*. We found 28 patterns from micobacterium isolated 18*M. bovis* and 10 *M. tuberculosis*. The Spoligotyping was able to detect and characterize two major bacteria *Mycobacterium tuberculosis* complex. *M. bovis* and *M. tuberculosis* causes disease in cattle and humans respectively. Therefore Spoligotyping test could be used like a complementary diagnostic in tissues bovine samples infected.

Keywords: *M. bovis*, *M. tuberculosis*, bovine tuberculosis, Spoligotyping.

USO DEL SPOLIGOTYPING COMO PRUEBA PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) ha acompañado a la humanidad desde tiempos remotos. Se detectó en momias egipcias de 3 mil años de antigüedad y en una momia peruana del año 700 d. C. Durante el siglo XVI era conocida con el nombre de “tisis” en la cultura mediterránea, y en el siglo XIX se le denominó “plaga blanca” en Europa y Estados Unidos. Se estima que en 1830, la tasa de mortalidad por tuberculosis en ese último país era de 400 por cada 100 mil habitantes, proporción que descendió a la mitad en 1900 gracias a la mejoría de las condiciones sociales y sanitarias (Abalos, 2004).

En 1882, Koch describió el bacilo que observó de lesiones en humanos, aves y bovinos, declarando que el mismo agente causal produce los tres tipos de enfermedad. Fue en 1896 que Smith diferenció el bacilo humano del bacilo bovino basado en las propiedades patógenas, de cultivo y experimentales de ambos microorganismos (Pierre-Charles, 2010). El Informe mundial sobre la tuberculosis publicado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), menciona que: La TB es la segunda causa mundial de mortalidad, después del SIDA, causada por un agente infeccioso. En 2013, 9 millones de personas enfermaron de TB y 1,5 millones murieron por esta causa. Más del 95% de las muertes por TB ocurrieron en países de ingresos bajos y medianos. La tuberculosis es la causa principal de muerte de las personas infectadas por el VIH, pues causa una cuarta parte de las defunciones en este grupo (OMS, 2015).

A lo largo del siglo XX, la producción industrial y el creciente consumo de leche condujo al aumento de la tuberculosis bovina, al transmitirse *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) del ganado al hombre. Esto influyó inicialmente sobre la infección de tuberculosis bovina en humanos, pero luego la pasteurización de la leche redujo la incidencia de la infección. En México, se estima que solamente la mitad de la producción de leche del país se pasteuriza; lo demás, se consume directamente o se transforma en derivados lácteos sin pasar por el proceso (Abalos, 2004).

TUBERCULOSIS BOVINA

DEFINICIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico causada por *M. bovis*. Se caracteriza por la formación de granulomas o tubérculos en nódulos linfáticos particularmente de pulmón, afecta animales domésticos principalmente bovinos. Es una zoonosis, el hombre la contrae al ingerir productos lácteos contaminados y no pasteurizados, por aerosoles o por el contacto con animales infectados, en estos disminuye la producción láctea y de carne, lo que significa pérdidas a los ganaderos cuando se decomisan canales o partes de los mismos debido a la presencia de lesiones de esta enfermedad (SENASICA, 2015).

AGENTE ETIOLÓGICO

El complejo *Mycobacterium tuberculosis*, comprende las sub especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microtti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*; así como *M. bovis* BCG. *M. bovis* pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* y al orden *Actinomycetales*. (Warren, 2006, Singh, 2015).

La secuencia del genoma de *M. bovis* es de 4.345.492 pb de longitud, dispuestos en un único cromosoma circular con un contenido medio de G + C de 65,63% (Garnier, 2003).

M. tuberculosis y *M. bovis* son de crecimiento lento, no pigmentadas, aerobios estrictos, inmóviles, de morfología bacilar, que no forman esporas y no poseen flagelos ni cápsula. Poseen una pared celular gruesa que consta de cuatro capas: la más interna es el peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucolilmurámico; esta capa da rigidez y forma a la bacteria. La segunda posee arabinogalactanos que se encuentran unidos a los ácidos micólicos de la tercera capa. La capa más externa se encuentra constituida por lípidos como el factor cuerda o trehalosa 6,6'-dimicolato y por mucósidos (Madigan, 2009, Quinn, 2012, Harvey, 2013).

La micobacteria puede sobrevivir varios meses en el medio ambiente, particularmente en lugares fríos, oscuros y húmedos. Entre 12 y 24 °C, el tiempo de supervivencia varía de 18 a 332 días, dependiendo de la exposición a la luz solar. En un estudio reciente, *M. bovis* permaneció viable durante 4 a 8 semanas en muestras de suelo seco o húmedo con

un 80% de sombra (34 °C) (CFSPH, 2009).

En general las necesidades nutritivas de las micobacterias son sencillas, requiriendo una fuente de carbono (glicerol o piruvato) y nitrógeno (amonio o aminoácidos) así como determinadas sales minerales (Alcaide, 2005, Madigan, 2009). Los medios de cultivo para el aislamiento de las micobacterias pueden ser Middlebrook, Löwenstein-Jensen o Stonebrink (Jawetz, 2008, Rosario, 2012).

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos que tienen la propiedad de ser ácido alcohol resistente (BAAR), esta propiedad se debe a la presencia en la superficie de la micobacteria de ácidos micólicos. La tinción ácido alcohol resistente (Ziehl-Neelsen) emplea una mezcla del colorante básico fucsina y fenol permitiendo la identificación del organismo en lesiones tuberculosas. Las micobacterias no se tiñen fácilmente mediante la tinción de Gram debido al alto contenido lipídico en su superficie. Sin embargo, si se elimina la fracción lipídica de la célula usando etanol alcalino, la célula permanece intacta pero se vuelve Gram (+) y deja de ser BAAR (Varello, 2008, Madigan, 2009, Gutierrez, 1993).

HUESPED

Los huéspedes susceptibles en orden de importancia son:

Bovinos: El principal agente etiológico para los bovinos es *M. bovis* (Palmer, 2013).

Humanos: El principal agente etiológico en humanos es *M. tuberculosis* pero puede haber infección con *M. bovis* (Sanou, 2014).

Porcinos: susceptibles a *M. bovis*, *Mycobacterium avium* (*M. avium*). (Di Marco, 2012, Livingstone, 2015)

Ovinos y Caprinos: La ocurrencia de la enfermedad en ovinos y caprinos es limitada por los sistemas productivos generalmente extensivos. De los pocos casos comprobados, unos se debieron a *M. caprae*, *M. bovis* y otros a *M. avium*. (Cousins, 2003)

Equinos: Es poco frecuente (Good, 2011).

Perros y gatos: La infección en estas especies puede deberse a una exposición masiva y repetida al cohabitar con pacientes humanos o al consumir productos contaminados (Abalos, 2004).

Aves: La tuberculosis de las aves se debe a *M. avium*. La tuberculosis aviar es muy frecuente en pollos y aves en cautiverio (OIE, 2008).

Mamíferos marinos: principalmente son afectados por *M. pinnipedii* (Cousin, 2003).

Otros huéspedes conocidos que mantienen la infección incluyen, las zarigüeyas de cola de escoba (*Trichosurus vulpécula*) y posiblemente los hurones (*Mustela putorius furo*) en Nueva Zelanda, los tejones (*Meles meles*) en el Reino Unido e Irlanda, los alces (Alces alces) en Canadá, el kudú (*Tragelaphus strepsiceros*) y el búfalo cafre (*Syncerus caffer*) al sur de África. Los ciervos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) de los Estados Unidos (Michigan) también se incluyen, aunque algunos autores actualmente consideran que esta especie puede constituir un huésped accidental, que mantiene al organismo únicamente cuando la densidad de la población es elevada (Palmer, 2013, CFSPH, 2009).

TRANSMISIÓN

La principal ruta de infección de la tuberculosis bovina es vía aerógena, cerca del 80-90% del ganado es infectado por inhalación de bacilos (Dean, 2005). Esto se ve favorecido por el contacto directo de los bovinos en el pastoreo, comederos, corrales o salas de ordeño. En los becerros la vía aérea es la más importante, aunque ocasionalmente pueden ser infectados por leche tuberculosa debido a que 1 a 2% de las vacas infectadas elimina el microorganismo en la leche (Rivera 2010).

Otra vía de ingreso es la digestiva (10 a 20% de los casos) por el consumo de pastos y alimentos contaminados con secreciones nasales, materia fecal y orina que contienen el agente causal (Abalos, 2004).

M. bovis puede ser transmitido de animales a humanos a través de dos rutas principales: aerosoles o por vía digestiva (consumo de leche); además existe riesgo de infección para trabajadores de rastros y Médicos Veterinarios. (Pierre-Charles, 2010, Sanou, 2014).

LESIONES

La tuberculosis bovina tiene un largo periodo de incubación, con progresión crónica y se caracteriza por la formación de granulomas o tubérculos. La formación y mantenimiento de los granulomas son esenciales para el control de las infecciones por micobacterias pero, los granulomas son también responsables de la Inmunopatología típica causada por estas infecciones. *M. bovis* se han adaptado para sobrevivir dentro de los macrófagos, y esta capacidad de persistencia frente a una potente respuesta celular es la base de la reacción

inflamatoria crónica del huésped. En el ganado bovino los tubérculos se encuentran en los nódulos linfáticos, asociados con el sistema respiratorio. También son frecuentes en bazo, hígado y las superficies de las cavidades corporales. En casos aislados, se pueden hallar múltiples granulomas pequeños en diversos órganos. (Lugo-Villarino, 2013, Saunders 2007).

DIAGNÓSTICO

La norma oficial NOM-031-ZOO-1995 de la tuberculosis bovina menciona que el diagnóstico se debe realizar por medio de la prueba de tuberculina utilizando un derivado proteico purificado (PPD) en campo, así como análisis bacteriológico, histopatología y la observación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en laboratorio.

La toma de muestras para estudios histopatológico y bacteriológico se realiza en órganos que presenten lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis o secreciones sugestivas (NOM-031-ZOO-1995).

Si el animal es positivo a la prueba de tuberculina y a la necropsia no hay presencia de lesiones macroscópicas que sugieran la infección del animal, entonces se deberán enviar al laboratorio nódulos linfáticos de la cabeza como los retrofaríngeos, mandibular, parotídeos y las tonsilas faríngeas (NOM-031-ZOO-1995).

En México, los programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina se basan en la tuberculinización y la eliminación de los animales reactivos; sin embargo, el comportamiento epidemiológico de la prueba ha sido una preocupación constante por sus parámetros irregulares de sensibilidad (40 a 90 %) y especificidad (78 a 96 %), lo que predispone a la presencia de resultados falsos positivos y falsos negativos (Millián 2010).

Mediante la tinción de Ziehl-Neelsen se observan microorganismos ácido alcohol resistente en frotis realizados con el material sospechoso o bien en laminillas con tejidos sospechosos. En caso de ser una muestra positiva, con esta tinción se observan bacilos teñidos de color rojo (NOM-031-ZOO-1995).

En el estudio histopatológico las muestras con lesiones sugestivas a tuberculosis deberán fijarse con formalina amortiguada al 10%, el tamaño de las mismas deberá ser aproximadamente de 2 cm³ y en una proporción de una parte de tejido y nueve de fijador, (NOM-031-ZOO-1995).

En el diagnóstico histopatológico se utiliza la tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E). Esta técnica permite identificarla presencia de los granulomas característicos. Además se emplea la tinción de Ziehl-Neelsen para observar a los bacilos en los granulomas (NOM-031-ZOO-1995).

En el envío de muestras para el aislamiento bacteriológico es necesario sumergir los tejidos en solución saturada de borato de sodio, muestras no mayores de 2 cm³. El tiempo máximo en que debe permanecer el tejido en la solución de borato de sodio es de 4 semanas, si el tiempo es mayor la muestra se deshidrata (NOM-031-ZOO-1995).

CULTIVO

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas continúa siendo fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos. El cultivo ha demostrado ser más sensible (10^3 - 10^5 bacterias viables/ml) que el examen microscópico (Alcaide, 2005).

El cultivo, aislamiento e identificación de *M. bovis*, es a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Stonebrink y Lowenstein Jensen (Payeur, 1994). El verde de malaquita inhibe el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva y de algunas bacterias Gram negativas. El crecimiento de *M. bovis* en medio Löwenstein-Jensen es pobre en presencia de glicerol, y mejor en presencia de piruvato. La temperatura óptima de crecimiento es a 37 °C. Los medios de cultivo deben ser revisados periódicamente (Prat, 2008).

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas para distinguir *M. bovis* y *M. tuberculosis* son: Determinación de fotoreactividad, acumulación de niacina y reducción de nitratos que son negativos en *M. bovis*, actividad de catalasa, hidrólisis de Tween 80, morfología colonial. *M. bovis* y *M. tuberculosis* producen catalasa termosensible (positiva a temperatura ambiente e inactivada a 68°C). *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida, como fármaco antituberculoso de primera línea. También se puede diferenciar de *M. africanum* por la resistencia a la pirazinamida (Payeur, 1994).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR es un método *in vitro*, basado en la síntesis enzimática de un fragmento de ADN específico del microorganismo. El método se basa en el uso de dos oligonucleótidos artificialmente sintetizados (primers) que hibridan las hebras opuestas y flanquean la región de interés del ADN blanco o templado. Una serie repetida de ciclos que involucran la desnaturalización del templado, la hibridación de los primers con cada una de las cadenas del templado y la extensión de los primers, por la ADN polimerasa lo que resulta en una acumulación exponencial del fragmento específico. Como el producto de extensión sintetizado en un ciclo sirve como templado en el siguiente, el número de copias es el doble en cada ciclo (Rahman, 2013).

La PCR puede amplificar cantidades extremadamente pequeñas de ADN, aun cuando las cantidades estén en el rango de picogramos (1×10^{-12}). Los iniciadores o primers que más se han utilizado para llevar a cabo el diagnóstico de tuberculosis bovina mediante la PCR tiene como blanco el gen Rv2875 que codifica la proteína MPB70, considerada específica para *M. bovis*, ha demostrado ser útil en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y ganado. Una sola copia de este gen está presente en cepas de *M. bovis* y otras micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, pero ausente en otras 24 especies y otros géneros bacterianos. MPB70 es una proteína seleccionada por la purificación de fluidos del cultivo de *M. bovis* BCG (Cousins, 1992, Millán, 2010).

MÉTODO DE TIPIFICACIÓN OLIGONUCLEÓTIDO ESPACIADOR (SPOLIGOTYPING)

La prueba de Spoligotyping fue desarrollada por Judith Kamerbeek y Dick Van Soolingen, con la finalidad de ser usada como una herramienta epidemiológica para identificar focos de infección y para monitorear la transmisión de *M. tuberculosis* con multiresistencia a drogas. Durante el desarrollo de esta técnica se observó, el potencial del Spoligotyping para tipificar y diferenciar genéticamente los aislados del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (kamerbeek, 1997).

El método de Spoligotyping se basa en un polimorfismo de ADN presente en un locus cromosomal, la región de repetición directa (Direct Repeat; DR), la cual está presente únicamente en las bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. La región DR en

Mycobacterium bovis BCG consiste en secuencias repetidas directamente de 36 pares de bases que está flanqueada por espaciadores de ADN no repetitivos, cada 35 a 41 pares de bases de longitud. Un DR y el espaciador no repetitivo son denominados Repetido Variable Directo (DVR). El número de copias de la secuencia DR en *M. bovis* BCG es de 49. En otras cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* el número de elementos DR varía significativamente. La gran mayoría de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* contienen uno o más elementos de IS6110 en la región DR. Se han reportado 94 diferentes espaciadores entre los DR: el cromosoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv tiene 48 DVR y el de *M. bovis* BCG 41. Para la genotipificación se utilizan de manera rutinaria 43 espaciadores, 37 de H37Rv y 6 de BCG en la prueba de Spoligotyping para la tipificación de bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Los espaciadores en el locus de repetición directa se amplifican por PCR y se detectan mediante hibridación del producto de PCR marcado con biotina en una membrana que contiene oligonucleótidos inmovilizados derivados de las secuencias espaciadoras que han sido previamente unidas a una membrana. La técnica es básicamente utilizada para la tipificación de cepas obtenidas de cultivo, también ha demostrado su utilidad para simultáneamente detectar y tipificar cepas del Complejo *M. tuberculosis* directamente de muestras clínicas. *M. bovis* puede ser reconocido por la ausencia de los DRs 3, 9,16 y 39 al 43. El nivel de diferenciación por Spoligotyping es menor comparado a "IS6110 Fingerprinting" para cepas que tienen cinco o más copias IS6110, pero mejor para cepas con menos de cinco copias. Spoligotyping es un método preferentemente para tipificar cepas de *M. bovis*, que usualmente contienen de una a cinco copias de IS6110 (Kamerbeek, 1997, Kremer, 2002, Aranaz, 1996, Acosta, 2009).

JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis bovina es frecuente en países en vías de desarrollo y pueden ocurrir pérdidas económicas por el desecho prematuro del ganado bovino, disminución en la producción, además de restricciones en la comercialización. Tradicionalmente el diagnóstico consiste en la observación de lesiones macroscópicas, lesiones histopatológicas, así como el aislamiento del agente. El aislamiento puede tardar hasta 8 semanas ya que las micobacterias causantes de la TB son de lento crecimiento en medios específicos, además de la tipificación bioquímica que toma 5 semanas más, para conocer si el cultivo es *M. bovis* o *M. tuberculosis* (NOM-031-ZOO-1995).

Existe un creciente énfasis en el muestreo sistemático de las lesiones sospechosas de tuberculosis detectadas en los rastros para su aislamiento, identificación y tipificación molecular (Haddad, 2001). Las herramientas moleculares han permitido desarrollar métodos de diagnóstico más rápidos que las pruebas bacteriológicas convencionales. En el caso de la tuberculosis bovina, se han implementado métodos basados en la PCR como un diagnóstico rápido, que distingue cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Huard 2003).

Pero la epidemiología de la tuberculosis bovina resulta muy compleja, puede permanecer de forma latente y una vez que se desarrolla la enfermedad afectar a diversas especies animales, incluyendo fauna silvestre que funge como reservorio. Por este motivo en todo el mundo existe la necesidad de genotipificar de manera precisa las cepas de *M. bovis* y rastrear el origen de la infección (Acosta, 2009).

El método de Spoligotyping fue desarrollado específicamente para la tipificación genética de aislados del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (kamberbeek, 1997). Este método ha demostrado ser muy eficiente para diferenciar genéticamente a cepas de *M. bovis* de *M. tuberculosis*. Por lo tanto la evaluación del empleo de este último método (Spoligotyping) como prueba diagnóstica a partir de muestras clínicas de bovinos, podría apoyar a la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina en México como diagnóstico complementario, ya que se obtendrían resultados más rápidos que con las pruebas bacteriológicas y además información rápida con respecto al diagnóstico, brotes y trazabilidad.

HIPÓTESIS

El diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante aislamiento bacteriológico y tipificación bioquímica tendrá la misma especificidad que la prueba de Spoligotyping, por lo que será útil como método complementario obteniendo los resultados en menor tiempo.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Demostrar la funcionalidad de la prueba Spoligotyping como herramienta para la tipificación genética del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y su uso como prueba diagnóstica.

Objetivos Específicos:

- Comparar los resultados obtenidos del aislamiento y las pruebas bioquímicas con los del Spoligotyping utilizados para el diagnóstico de la tuberculosis bovina para conocer si los géneros y especies de los agentes causales detectados coinciden.

MATERIALES Y MÉTODOS.

MUESTREO

La toma de muestras se realizó en la Comarca Lagunera, esta comprende en el estado de Coahuila los municipios de Torreón, Matamoros, San Pedro de las colonias, Francisco I. Madero y Viesca; en el estado de Durango los municipios de Gómez Palacios, Lerdo, Tlahualilo, Mapimi, San Pedro del Gallo, San Luis Cordero, Rodeo, Nazas y Cuencame; considerada la cuenca lechera más importante de México. La Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina ubica a la Laguna en la Región B, dicha región engloba a todos aquellos estados en fase de erradicación con prevalencia de hato menor al 2%, aun cuando se estima su prevalencia en 16.5% (SENASICA, 2015). Se realizó un muestreo por conveniencia donde se obtuvieron 101 muestras de animales enviados a rastro bajo el siguiente criterio de inclusión:

- Bovinos productores de leche raza Holstein.
- Bovinos con lesiones sugestivas de tuberculosis.

TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

Durante el proceso de sacrificio de ganado lechero en el rastro Municipal de Torreón, ubicado en la carretera Torreón-Mieleras Km 8.5, Fraccionamiento agropecuario C.P. 27000, Tipo Inspección Federal (TIF) N°243, se obtuvieron 101 nódulos linfáticos (uno por canal), de animales con lesiones sugestivas de tuberculosis. Se colocaron en solución de borato de sodio al 6%, a razón de una parte de muestra por nueve partes de solución en un frasco de plástico con tapa de rosca, se identificó cada frasco con número consecutivo.

DESCONTAMINACIÓN DE LA MUESTRA

Para aumentar las probabilidades de desarrollo de las micobacterias en el medio de cultivo debe realizarse el proceso de eliminación de organismos indeseables de la muestra, por la posible contaminación durante su obtención o transporte. Los nódulos linfáticos una vez en el laboratorio, se disecaron y sumergieron en una solución de hipoclorito ver apéndice 3. Se realizó el macerado de los nódulos linfáticos ver apéndice 3, se tomó una parte del homogenizado y se sometió a un segundo proceso denominado ácido-álcali; una vez

realizado dicho procedimiento se llevó a cabo el cultivo bacteriológico.

CULTIVO BACTERIOLÓGICO

Las muestras fueron sembradas en dos medios de cultivo denominados Lowenstein-Jensen y Stonebrink. Dichos medios fueron servidos en tubos de vidrio con tapón de rosca y sometidos a prueba de esterilidad. Cada muestra de las 101 disponibles fue sembrada por duplicado en los medios de cultivo e incubada durante 8 semanas ver apéndice 3.

TIPIFICACIÓN BIOQUÍMICA

Los medios de cultivo en los que se observó crecimiento de colonias al finalizar las 8 semanas, se llevaron al paso siguiente que fue la tipificación bioquímica ver apéndice 3, las pruebas que se realizaron son:

- ✓ Determinación de foto-reactividad de micobacterias (Figura 2).
- ✓ Acumulación de niacina (Figura 3).
- ✓ Reducción de nitratos a nitritos (Figura 4).
- ✓ Actividad de catalasa (Figura 5).
- ✓ Hidrólisis de Tween 80 (Figura 6).
- ✓ Resistencia a la Pirazinamida (Figura 7).

Además de las pruebas ya mencionadas se tomó en cuenta para su tipificación otras características que se evaluaron a lo largo de esas 8 semanas como: la morfología colonial (Figura 8), velocidad de crecimiento, y frotis teñidos con la técnica de Zielh Neelsen ver apéndice 3.

EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó el proceso de extracción de ADN con la técnica de CTAB (N-Cetyl-N-N-N,-trimethyl ammonium bromide) en las muestras siguientes:

- macerado de cada una de las 101 muestras ver apéndice 3.
- cultivos bacteriológicos que presentaron crecimiento de colonias ver apéndice 3.

El ADN extraído se resuspendió en agua inyectable, se identificó y almacenó hasta su uso a -20°C (Cousins 1992, Millán 2010).

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

PCR MPB70

El ADN que se extrajo de los nódulos linfáticos fue sometido a la prueba de PCR y el fragmento a amplificar corresponde al gen Rv2875 de una proteína antigénica presente en cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, denominada MPB70. El producto de amplificación esperado es de 372 pares de bases la técnica utilizada está basada en la reportada por Cousin *et al.* La reacción se hizo en un volumen final de 25 μ l que comprendió 2 μ l de ADN de la muestra, 14.25 μ l de agua, 2.5 μ l de buffer 10X, 2 μ l de MgCl₂ 25mM, 1 μ l de Mix d NTP 10mM, 1 μ l de primer TB-1A, 1 μ l de primer TB-1B, 0.25 μ l de Taq Gold, 1 μ l de BSA. Las muestras fueron sujetas a 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, alineación a 58°C por 1 minuto y extensión 72°C por 1 minuto. Para visualizar el producto de amplificación se tomaron 8 μ l del producto de reacción y se mezcló con buffer de carga y se sometió al proceso de electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 90 V por 40 minutos ver apéndice 3. (Cousin 1992, Charlet 2005).

PCR DR

El ADN que se extrajo tanto de las muestras de tejido como de las cepas aisladas fue sometido a PCR de la región de repetición directa (DR) del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el volumen final de reacción fue de 25 μ l, que comprendió 2.5 μ l de ADN cuando la muestra corresponde a cepa y 5 μ l cuando es ADN de muestra clínica, 12.75 μ l y 10.25 μ l de agua para muestra de cepa y tejido respectivamente, 2.5 μ l de buffer 10X, 2 μ l de MgCl₂ 25mM, 1 μ l de Mix dNTP 10mM, 2 μ l de primer DRa, 2 μ l de primer DRb, 0.25 μ l de Taq Gold. Las muestras fueron sujetas a 30 y 40 ciclos (cepas y tejido respectivamente) de desnaturalización a 96°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 1 minuto y extensión 72°C por 30 segundos. Los productos de amplificación de ambos tipos de muestra dieron inicio a la metodología de Spoligotyping (kamberbeek, 1997).

SPOLIGOTYPING

Los productos de amplificación del PCR DR se diluyeron en una solución de 2XSSPE/0.1% SDS y se desnaturalizaron mediante calor 99°C por 10 minutos y se enfriaron en un contenedor con hielo. Se lavó la membrana 5 minutos a 60 °C en SSPE 2X/0.1% SDS. Se colocó la membrana en el miniblotter y se cargó cada una de las canaletas con una muestra diferente se selló la cámara y se colocó en el horno de hibridación durante 1 hora a 60°C, transcurrido dicho lapso se retiraron las muestras de cada canaleta por aspiración y se colocó la membrana en una botella de vidrio con tapón de rosca para lavarla dos veces con SSPE 2X/0.5% SDS durante 10 minutos a 60°C. Se dejó enfriar y se le adiciono un conjugado de estreptavidina-peroxidasa y se incubo 60 minutos a 42 °C, se enjuago 2 veces en SSPE 2X 5 minutos a temperatura ambiente. Se incubo 1 minuto con líquido de detección ECL. Se cubrió la membrana con dos acetatos uno por la cara anterior y otro en la cara posterior, se expuso la membrana sobre una película radiográfica 20 minutos y se revelo en un cuarto oscuro ver apéndice 3 (Kremer 2002).

Los patrones obtenidos de las muestras se capturaron y se tipificaron en base a la ausencia de los espaciadores (3, 6, 9 y 39-43) en la región DR para las cepas de *M. bovis*. Una vez tipificados, los espoligotipos se compararon entre sí (espoligotipos de tejido vs espoligotipo de cepa) y se comparó el resultado de los espoligotipos de tejido vs tipificación bioquímica ver apéndice 2, Cuadros 7, 8 (Kamerbeek 1997).

ÁNÁLISIS FILOGENÉTICO

Los patrones capturados también se procesaron mediante el programa IBM SSPS Statistics 22, por medio del cual se desarrollaron los dendogramas tanto de las muestras de tejido como de cepa ver apéndice 1 Figuras 9, 10.

RASTREO

Otro de los usos que se les dio a los patrones de Spoligotyping fue conocer en que otras partes del mundo han sido ubicados dichos aislamientos, existe una página de internet del Instituto Pasteur (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/>) la cual cuenta con una base datos en la cual cada país tiene la posibilidad de informar los patrones que se han obtenido de los aislados ver apéndice Cuadro 8,9.

RESULTADOS

De las 101 muestras clínicas (macerado de tejido) sembradas por duplicado en los medios de cultivo Lowenstein–Jensen y Stonebrink, al cabo de 8 semanas se obtuvieron 43.56% (44/101) muestras positivas a *Mycobacterium spp.* y 56.43% (57/101) muestras negativas ver apéndice 2, Cuadro 1. La mayoría de los cultivos tuvieron poco crecimiento de colonias (de una a dos colonias) y al hacer la resiembra en medio sólido o líquido, el crecimiento fue pobre o incluso se perdían.

Los aislados fueron tipificados mediante pruebas bioquímicas y los resultados son: *M. bovis* 75% (33/44), *M. tuberculosis* 0% (0/44), *Mycobacterium spp* 22.72% (10/44) y 1 muestras fue insuficiente para su tipificación ver apéndice 2, Cuadro 1. Las imágenes de las pruebas bioquímicas están disponibles en el apéndice 1, Figuras 1-8.

De los macerados se hizo extracción de ADN para realizar el PCR MPB70 para el diagnóstico de Tuberculosis y se obtuvieron 28.71% (29/101) muestras positivas y 71.28% (72/101) muestras negativas ver apéndices 1,2, Cuadro 1, Figura 1.

Con las muestras de ADN de tejido se realizó un PCR DR para llevar a cabo la técnica de Spoligotyping misma que detectó 53.46% (54/101) positivas y 46.53% (47/101) negativas. Además dicha prueba permite la tipificación de las muestras y los resultados corresponden a 66.66% (36/54) como *M. bovis* y 33.33% (18/54) como *M. tuberculosis* ver apéndices 1,2, Cuadro 2,7, Figura 9.

Se adoptó la siguiente nomenclatura para diferenciar los perfiles obtenidos: PAATT, PAATC, las dos primeras letras (PA) corresponden a Palo Alto por la ubicación del centro de trabajo donde se desarrolló el experimento, las siguientes dos corresponden al nombre y apellido de la tesista Aritzel Toledo (AT) y la última letra era para tejido (T) o cepa (C) y finalmente el número fue otorgado en orden ascendente en base al número de DRs presentes en el patrón. Al realizar el análisis del Spoligotyping de tejido, se encontraron 50 espilogotipos diferentes, de los cuales 32 espilogotipos fueron *M. bovis*, dos de estos espilogotipos agrupan varias muestras: el espilogotipo PAATT10 engloba las muestras 33, 37, 43, 45 y el espilogotipo PAAT16 las muestras 22 y 31; por su parte *M. tuberculosis* contó con 18 espilogotipos todos únicos ver apéndice 2 Cuadro7.

En el rastreo de los patrones, se encontró que 10 de los 54 patrones de Spoligotyping de tejido se han aislado o ubicado en otros países ver apéndice 2 Cuadro 5.

Con el ADN extraído de las cepas se realizó la prueba de Spoligotyping como se hace de manera convencional (usando ADN de cepas no de tejido) y los resultados fueron los siguientes: *M. bovis* 75% (33/44), *M. tuberculosis* 22.72% (10/44) y 1 muestra insuficientes, ver apéndice 1,2 Cuadro 2,8, Figura 10.

En el análisis de los patrones del Spoligotyping de cepa existieron 28 espoligotipos en 44 muestras, en el caso de *M. bovis* fueron 18 los espoligotipos en 33 muestras, el espoligotipo PAATC1 cuenta con dos muestras 60, 93, PAATC6 contiene las muestras 70 y 58, PAATC8 lo comparten las muestras 27, 30, 45, 73,74, PAATC9 lo poseen las muestras 99, 100,101, y PAATC10 es el espoligotipo principal ya que se presenta en el mayor número de muestras 5, 26, 31, 72, 80, 84, 76 y 81; *M. tuberculosis* se encontró en 10 espoligotipos únicos ver apéndice 2 Cuadro 8.

De los 43 patrones obtenidos de la prueba de Spoligotyping de cepa (recordando que la muestra número 4 no tuvo crecimiento suficiente), 24 han sido aislados y tipificados en otros países, ver apéndice 2 Cuadro6.

Al observar los resultados de aislamiento y Spoligotyping a partir de tejido, 16 muestras fueron positivas a ambas pruebas. Al comparar las clasificaciones otorgadas a dichas muestras por las pruebas bioquímicas y el Spoligotyping a partir de tejido hubo 11 coincidencias identificadas como *M. bovis*. De las 5 muestras restantes, dos muestras fueron clasificadas por el Spoligotyping a partir de tejido como *M. tuberculosis* y en las pruebas bioquímicas como *M. spp.*, (muestras 26 y 27). Las muestras 43 y 72 se clasificaron bioquímicamente como *M. spp* mientras que con el Spoligotyping a partir de tejido como *M. bovis* y *M. tuberculosis* respectivamente. Finalmente la muestra 74 se ubicó como *M. tuberculosis* para el Spolygotyping a partir de tejido y como *M. bovis* para las pruebas bioquímicas ver apéndice 2 Cuadro 3.

Al comparar los patrones de las 16 muestras antes mencionadas obtenidos de los Spoligotypings a partir de tejido y cepas, hubo diferencias que iban desde un solo DR como es el caso de las muestras 31 y 45 hasta 13 DR diferentes como es el caso de la muestra 72. La muestra con el cambio más drástico en su patrón fue la 32 que en Spoligotyping de tejido solo presentaba los DR 23, 29, 35 y 36 considerada como *M. bovis*, pero en el Spoligotyping de cepa solo careció del DR 16 obteniendo la clasificación de *M. tuberculosis*.

En el caso de la muestra 26 en el patrón del Spoligotyping a partir de tejido, tuvo el DR 3 y careció del DR 20 por lo que se clasificó como *M. tuberculosis* y en el patrón de Spoligotyping de cepa se invirtió careciendo del DR 3 y teniendo el DR 20 lo que la clasificó como *M. bovis*, también tuvieron diferencias en el DR 2 y 10. La muestra 74 en su patrón de Spoligotyping de tejido careció del DR 20 y presentaba los DR 42, 43 ubicándose como *M. tuberculosis*, dentro del patrón de Spoligotyping de cepa careció de los DR 3, 9, 16, 39-43 siendo tipificada como *M. bovis* ver apéndice 2 Cuadro 4.

Por otra parte de las 101 muestras, 19 fueron las coincidencias con resultado negativo para el aislamiento y el Spoligotyping a partir de tejido.

DISCUSIÓN

El porcentaje de aislamiento en este estudio fue de 43.56% considerado relativamente bajo, pero el aislamiento de las micobacterias depende de muchos factores entre ellos que el agente causal esté presente en la muestra, su viabilidad y adaptabilidad, por otro lado, algunos investigadores refieren que *M. bovis* es más susceptible a los métodos de descontaminación que *M. tuberculosis*. Por lo tanto, el número bajo de organismos en la muestra y los métodos de descontaminación drásticos para este organismo, serían las causas para explicar el fracaso de muchos laboratorios para obtener aislamientos de *M. bovis* (Alcaide, 2005, Romano, 2012).

Durante la revisión de los medios de cultivo, algunos se contaminaron ya que como lo reporta la literatura, los microorganismos contaminantes pueden sobrevivir y causar problemas en los cultivos procedentes de tejido, por lo que se utilizó el método de descontaminación zephiran en sustitución del método ácido-alkali. El zephiran actúa eficazmente contra algunas bacterias con un efecto mínimo sobre las micobacteria. Dicha afirmación fue avalada en este estudio por el menor número de muestras contaminadas con el uso del Zephiran (Payeur, 1994).

Spoligotyping no solo puede ser utilizada para la diferenciación de cepas de *M. bovis* sino para distinguir estas cepas de las de *M. tuberculosis*, una distinción que es comúnmente difícil de hacer utilizando las técnicas bacteriológicas convencionales, situación a la que se enfrentó el presente estudio al realizar la tipificación mediante pruebas bioquímicas, ya que 10 de los aislamientos se clasificaron de manera genérica como *Mycobacterium* spp., debido a que los resultados obtenidos en dichas pruebas requieren de un cultivo puro y abundante para dar una clasificación donde se identifique género y especie (Payeur, 1994). Otra situación que ejemplifica esta dificultad fue observada en un estudio en Reino Unido, en el cual mencionan que los espiligotipos de *M. bovis* generalmente no contienen los espaciadores 39 al 43, sin embargo, un espiligotipo que obtuvieron contenía espaciadores 40 al 43, que se observan con mayor frecuencia en *M. tuberculosis*. Al analizarlo fenotípicamente y mediante pruebas bioquímicas, este aislado tenía características típicas de *M. bovis*; era microaerofílico, TCH (hidrazida del ácido tiofen-2-carboxílico) negativo, y resistente a pirazinamida, creció mejor en Lowenstein-Jensen con piruvato que con glicerol lo que evidencia lo imprecisos que pueden ser las pruebas bioquímicas sobre todo cuando

un cultivo no cumple las características antes mencionadas, a diferencia del Spoligotyping (Kamerbeek, 1997, Gibson, 2004).

Con respecto a la prueba PCR MPB70 en el presente estudio fue aparentemente menos sensible para el diagnóstico de la tuberculosis bovina ya que de las 101 muestras solo el 28.71% fueron positivas. Las proteínas MPB70 y MPB83 se identifican como los principales antígenos de *M. bovis*. Se menciona que *M. tuberculosis* expresa bajos niveles de MPB70 y algunas cepas virulentas de *M. bovis* expresan altos niveles de MPB70. Las propiedades inmunológicas de MPB70, así como los altos niveles de MPB70 en *M. bovis* indicaron que esta proteína podría ser utilizada para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. (Mostowy 2005, Wiker 2009). En un estudio realizado por Cousins et al. (1992) se indica que el PCR MPB70 fue más sensible que los métodos de cultivo tradicionales para pacientes que se sabía tenían tuberculosis. En el presente estudio se obtuvieron 44 aislamientos de 101 muestras y 29 muestras positivas al PCR-MPB70 lo cual difiere con lo afirmado por Cousins et al. (1992) esto debido a que ellos realizaron la prueba de PCR-MPB70 después de la extracción de ADN a partir de frotis positivos o de cultivos lo cual hace que las probabilidades de obtener un resultado positivo en la PCR-MPB70 aumenten. En otro estudio en el cual se buscó evaluar la sensibilidad y la especificidad relativa de dos PCR's (MPB70 e IS6110) y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco, mencionan al igual que el presente estudio, que la sensibilidad que obtuvieron en la prueba de PCR-MPB70 fue menor a la informada por Cousins et al. (1992) incluso cuando en el estudio trabajaron con un PCR anidado que se dice demostró alta sensibilidad y especificidad cuando se usó la presencia/ausencia de lesiones sospechosas de TB como "prueba de oro" en 21 animales provenientes de una zona endémica y 20 animales de una zona libre de tuberculosis bovina (Millián, 2010).

En un estudio realizado en el estado de Querétaro, México, para evaluar el papel de la tuberculosis bovina en la presentación de tuberculosis humana, incluyeron 255 muestras de las cuales 46 (18.03%) fueron positivas a BAAR, 20 (7.8%) a aislamiento, 74 (29.01%) positivas a la PCR-MPB70 anidado, Pérez-Guerrero et al. (2008) mencionan que no siempre se identificó una coincidencia del diagnóstico entre pruebas con la misma muestra. En el presente trabajo, de las 101 muestras procesadas, el 43.56% fueron positivas al aislamiento, 28.71% positivas a PCR MPB70 (aunque difiere con el estudio en comparación

en que este es un PCR simple, no anidado que se considera, es menos sensible) concuerda con lo afirmado por Pérez-Guerrero et al. (2008), siendo pocos los resultados que coinciden entre pruebas de la misma muestra, lo cual puede deberse a las características propias del agente etiológico o los requerimientos mínimos necesarios de cada muestra para la prueba correspondiente, lo que resalta la dificultad de establecer un diagnóstico.

Kamerbeek et al. (1997) diseñaron la prueba de Spoligotyping que es un método simple, rápido, reproducible y fácil, dichas características son avaladas por trabajos realizados por otros investigadores como Aranaz et al. (1996), Zumárraga et al. (1999) y Gibson et al. (2004) entre otros, que determinaron el potencial de Spoligotyping para la diferenciación de cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* y que compararon los resultados con aquellos obtenidos por la prueba de RFLP- IS6110 el cual es el principal método utilizado mundialmente para la diferenciación de cepas de *M. tuberculosis*. Estos investigadores mencionan que Spoligotyping es valioso en los análisis de cepas de regiones geográficas donde las cepas con un bajo número de copias de IS6110 son prevalentes y para la diferenciación de *M. bovis*, que comúnmente contiene un solo elemento IS6110. Lo que convierte a esta prueba útil para el diagnóstico de la tuberculosis bovina que como se mencionó tiene como agente causal a *M. bovis*.

La prueba de Spoligotyping detectó 54 muestras positivas mientras que el aislamiento detectó 44, de las 101 muestras procesadas. De estos 43 aislamientos, (recordando que una de las muestras se perdió) al ser sometidos a la prueba de Spoligotyping todos mostraron patrón, Gori et al. (2005) demostraron que en comparación con los resultados del cultivo, la sensibilidad de Spoligotyping fue del 98% para las muestras clínicas, 91% para las muestras obtenidas a partir de medio líquido, y 100% para las muestras obtenidas directamente a partir de una colonia de micobacterias en medio sólido de Lowenstein-Jensen. Las especificidades correspondientes fueron 96% (muestras clínicas), 98% (medio líquido), y 94% (medio sólido). Si bien la sensibilidad y especificidad obtenida en el presente estudio no son tan elevada como las reportadas por Gori et al. el Spoligotyping obtuvo un mayor número de resultados positivos que el aislamiento.

Una de las características o ventaja que presenta el Spoligotyping es la rapidez para la obtención de resultados. Los datos obtenidos por Gori et al. (2005) con respecto al tiempo de respuesta dicen que Spoligotyping requiere menos de 24 horas para dar resultados,

teniendo en cuenta el tiempo de procesamiento de rutina en el laboratorio. El tiempo de recepción de muestras clínicas a la obtención de resultados en Spoligotyping fue de 1.26 días (mediana de 6 días). Sin embargo, los resultados del Spoligotyping de las muestras clínicas se obtuvieron en una media de 20 días (media \pm de, 22.9 ± 18.6) más rápido que los obtenidos por la confirmación de cultivo de la tuberculosis y una mediana de 29 días (35.0 ± 25.2) antes de los obtenidos por las pruebas de susceptibilidad. En contraste, se obtuvieron resultados de la tipificación de RFLP después de una mediana de 75 días (rango 24 a 160) (Gori 2005). En México para llegar al diagnóstico definitivo se envían al laboratorio muestras de tejido sospechoso para el cultivo, el cual toma entre 4 y 8 semanas (Millián, 2010). El presente estudio, no fue la excepción, tomó entre 8-10 semanas el aislamiento y 4-5 semanas la tipificación bioquímica en las muestras que el crecimiento de colonias fue suficiente para dicho proceso y un promedio de tres días realizar la prueba de Spoligotyping. Por lo que a fin de disminuir el tiempo requerido para la detección y tipificación de *M. bovis*; y probar si existe diferencia en los patrones o espoligotipos, se trabajó en este estudio directamente con ADN extraído de las muestras clínicas así como ADN extraído de las cepas.

En términos generales los estudios en los cuales se ha trabajado con la técnica de Spoligotyping con fines de diagnóstico o tipificación; el común denominador a informar es el número de espoligotipos o clusters presentes en las muestras, y si alguno de ellos fue aislado o identificado en otro país. De tal forma que, la revisión de los resultados obtenidos se desglosó de esa manera, este estudio detectó 54 muestras positivas de tejido con Spoligotyping, que albergan 50 espoligotipos diferentes de los cuales, 32 espoligotipos fueron de *M. bovis*, dos de estos espoligotipos agrupan varias muestras (espoligotipos PAATT10 y PAAT16); por su parte *M. tuberculosis* contó con 18 espoligotipos todos únicos. En el análisis del Spoligotyping de cepa existen 28 espoligotipos en 44 muestras, en el caso de *M. bovis* son 18 los espoligotipos en 33 muestras, son comunes a varias muestras los espoligotipos PAATC1, PAATC6, PAATC8, PAATC9 y PAATC10 siendo este último el espoligotipo principal ya que lo comparten un mayor número de muestras; *M. tuberculosis* se encontró en 10 espoligotipos únicos. Los estudios epidemiológicos se basan en la premisa de que animales infectados con cepas de patrón molecular idéntico son el resultado de transmisión reciente, mientras que aquéllos infectados por cepas de patrón único, se consideran cepas nuevas resultantes de mutaciones no letales. Sin embargo, es importante

resaltar que patrones moleculares idénticos no necesariamente indican relación epidemiológica, y casos epidemiológicamente ligados no siempre tienen el mismo patrón molecular, lo que hace indispensable sustentar los hallazgos moleculares con información epidemiológica rutinaria (Millián, 2012). Dicho lo anterior, los espoligotipos encontrados con Spoligotyping de tejido casi en su totalidad son espoligotipos únicos, atribuible a cepas con mutaciones nuevas, por el contrario, algunos de los espoligotipos de cepa tiene patrones iguales que se atribuyen a transmisión reciente. Pero estas diferencias entre patrón de tejido y cepa de la misma muestra pueden deberse a lo afirmado por Millián et al. (2012) que no por ser casos ligados presentan mismo patrón. Debido a que el objetivo de esta tesis no es el estudio epidemiológico de las muestras procesadas sino probar el potencial de Spoligotyping como prueba diagnóstica complementaria no se puede comprobar los supuestos antes mencionados por la falta de información sobre las muestras y los animales de los que provienen.

Por otro lado, en un estudio realizado por Millián et al. (2012) afirman que la mayoría de los Estados con ganadería predominantemente lechera muestran espoligotipos comunes, lo que sugiere intercambio regional frecuente de ganado. Algunos espoligotipos son comunes en ganado lechero y ganado productor de carne, lo que sugiere transmisión entre estas dos poblaciones. En el presente estudio las muestras fueron obtenidas de una región predominantemente lechera, lo que explica que varias muestras de Spoligotyping de cepa estén agrupadas en un espoligotipo. También en su estudio Millián et al. (2012) en el análisis de clusters encontró alta similitud de espoligotipos dentro de los grupos, lo que sugiere que la mayoría de éstos son derivados de los espoligotipos de mayor frecuencia en cada uno de los grupos. La distribución de un mismo espoligotipo en diferentes regiones puede ser un indicativo de alta movilización de ganado. De acuerdo a la frecuencia de los espoligotipos, esta movilización es más frecuente entre cuencas lecheras del centro del país y la región de La Laguna (Millián, 2012). En el presente estudio con respecto a los patrones obtenidos de cepa hubo alta similitud en las diferentes muestras y dentro de los grupos, recordando que las muestras fueron obtenidas en la Región Lagunera.

Haddad et al. (2001) mencionan que los datos que comparan la biodiversidad de cepas de *M. tuberculosis* en los países desarrollados y en desarrollo sugieren que cuando la prevalencia de la tuberculosis es alta, una cepa dominante tiende a excluir a los demás. Por el contrario, en los países donde la prevalencia de la tuberculosis humana es baja,

tipos pueden estar presentes (Haddad, 2001). En el presente estudio para el caso de los espoligotipos de tejido, la mayoría eran únicos es decir existen casi tantos tipos como muestras procesadas y en el caso de los espoligotipos de cepas hay más grupos o clusters y por consiguiente se observa dominancia de algunas cepas de *M. bovis*, recordando que la prevalencia de la Región Lagunera es de aproximadamente 16%.

Existen dos bases de datos internacionales, la primera es exclusivamente para el reporte de aislados de *M. bovis* disponible en <http://www.Mbovis.org> y la segunda es una página del Instituto Pasteur en la que se pueden ubicar tanto patrones de *M. bovis* como de *M. tuberculosis* disponible en (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/>). El rastreo para el presente estudio como se mencionó con anterioridad fue a través de la base del Instituto Pasteur ya que se obtuvieron patrones para ambas micobacterias. De los patrones obtenidos directamente de tejido, se encontró que 10 de los 54 patrones de Spoligotyping se han aislado en otros países, y de los 43 patrones obtenidos de la prueba de Spoligotyping de cepa (recordando que la muestra número 4 no tuvo crecimiento suficiente), 24 han sido aislados y tipificados en otros países. Los más relevantes son: México 21 aislados de los espoligotipos PAATT1, PAATT2, PAATT3, PAATT16, PAATT17, PAATC1, PAATC6, PAATC8 y PAATC10; Argentina están informados 274 aislamientos que comprenden los espoligotipos PAATT2, PAATT16, PAATC3, PAATC6, PAATC8, PAATC10 y PAATC12; Brasil registró 44 aislamientos entre los que se encuentran los espoligotipos PAATT1, PAATT3, PAATT16, PAATC1, PAATC3, PAATC8, PAATC10 y PAATC15; en Francia se reportan 14 que corresponden a los espoligotipos PAATT1, PAATT2, PAATC1 y PAATC8; EUA informó el aislamiento de 16 espoligotipos que corresponden a PAATT3, PAATT17, PAATC1, PAATC8 y PAATC12; España solo PAATT3 y este espoligotipo carece de los DR 3, 9, 15, 16, 21, 39-43; Australia aisló el espoligotipo PAATC8; Londres informa 486 aislamientos que corresponden a los espoligotipos PAATT2, PAATT8, PAATT10, PAATT16, PAATT17, PAATC7, PAATC8 y PAATC10. Todos estos países han realizado estudios utilizando Spoligotyping para la tipificación de cepas del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

En el año de 1900 un estimado del 30% de los casos de tuberculosis en Europa fueron causadas por el patógeno de la tuberculosis del ganado, *M. bovis*, una especie de *Mycobacterium* estrechamente relacionado con *M. tuberculosis*, transmitido en gran medida a los seres humanos a través de la inhalación de aerosoles provenientes de animales

infectados y el consumo de alimentos contaminados como productos lácteos sin pasteurizar (Rodwell, 2010). En un estudio realizado en Estados Unidos de América (EUA) ,106 espoligotipos de *M. bovis* en humanos se compararon con 496 espoligotipos de ganado mexicano y 219 de ganado de EUA. Más del 91% (97/106) de los aislados humanos de *M. bovis* tenía espoligotipos que eran idénticos a los encontrados en ganado mexicano. Cuatro casos humanos tenían espoligotipos que coincidían con ambos, bovinos nacidos en México y en los EUA, lo que habla de la transmisión de bovinos hacia los humanos (Rodwell, 2010). En un estudio en el cual utilizaron 224 aislados de *M. bovis*, principalmente de los países de América del Sur, encontraron que en diecinueve aislados de *M. bovis* provenientes de muestras de origen humano en Argentina tuvieron espoligotipos y secuencia repetidas ricas en GC (PGRS) que representaban los tipos más comunes encontrados entre los aislamientos de ganado (Zumárraga, 1999). En un estudio de Pérez-Guerrero et al. (2008) detectaron 25 espoligotipos de los cuales 13 corresponden a muestras de tejido humano y 12 de tejido bovino. Cuatro de los espoligotipos humanos son iguales a los de origen bovino y 2 espoligotipos humanos difieren en un DR con los espoligotipos de origen bovino ambos procedentes de la misma región. En el presente trabajo los espoligotipos de tejido fueron 17.82% *M. tuberculosis* y 35.64% *M. bovis*, y los espoligotipos de cepa fueron 9.9% *M. tuberculosis*, 32.67% *M. bovis*, la principal especie detectada fue *M. bovis* debido a que el origen de las muestras es bovino siendo *M. bovis* el principal agente causal de la tuberculosis bovina; mientras que las muestras procesadas por Pérez-Guerrero et al (2008) son de origen humano y el principal agente causal de la tuberculosis en humanos es *M. tuberculosis* (Palmer, 2013). La tuberculosis en los seres humanos es causada principalmente por *M. tuberculosis*, pero esto no ha sido siempre el caso. Si bien está documentada y estudiada la transmisión de la tuberculosis bovina al humano, y muestra de ellos son las investigaciones de Rodwell et al. 2010, Zumarraga et al. (1999) y Pérez-Guerrero et al. 2008 no debe descartarse que también se da la transmisión de humanos a bovinos situación que explicaría la presencia de patrones de *M. tuberculosis* en las muestras del presente estudio. O'Reilly et al. (1995) mencionan que la infección por *M. bovis* de los seres humanos al ganado es generalmente directa y por vía respiratoria, mientras que de humano al bovino se ha reportado como propagación indirecta, a través de heno contaminado con orina de excretos renales humanos informado por Huitema en 1969 en los Países Bajos y por Schliesser en 1974 en Alemania.

Aranaz et al. (1997) tipificaron mediante la prueba de Spoligotyping aislados de *M. bovis* de animales domésticos (bovinos, cabras, borregos y gatos) y animales salvajes (ciervos y jabalíes). Los espoligotipos de *M. bovis* que se encuentran en los animales salvajes españoles (ciervos y jabalíes) fueron también encontrados en aislados bovinos, lo que sugiere la transmisión entre estos animales y el ganado distribuidos por toda España. En un estudio realizado en Francia, se buscó evaluar la biodiversidad y la distribución de las poblaciones de *M. bovis* aisladas, los 1349 aislados de especies animales procesadas, se presentaba de la siguiente manera: 1230 correspondientes a bovinos (91,2%), los 119 representaron las otras especies: 38 cabras, 29 venados, 12 mascotas (3 perros, 9 gatos, 1 hurón, 1 conejo), 3 ovejas, 1 cerdo, y 14 animales salvajes (Haddad, 2001). Los hallazgos de ambos estudios muestran como la prueba de Spoligotyping es una herramienta en la epidemiología de la tuberculosis bovina, evidenciando el papel de la fauna silvestre como reservorio de la enfermedad.

En el estudio de Aranaz et al. (1997) todas las cepas de origen bovino tenían deletados los espaciadores 3, 9 y 16 y albergaron los espaciadores 1, 13, 18, 23, 25, 30 y 38. En el presente estudio las cepas de *M. bovis* albergan los DRs 4, 5, 7, 13, 19, 20, 22-26,32,34,37 y 38; encontrándose coincidencias para ambos estudios en 4 de los DR (13, 23, 25 y 38). Zumárraga et al. (1999) encontraron que la comparación de los espoligotipos de las cepas de *M. bovis* aisladas en América del Sur y España reveló cuatro espoligotipos que se encontraron en ambas regiones. Todas las cepas de América del Sur albergaban espaciadores 24 y 25, mientras que el espaciador 38 estuvo presente en todos los aislados de América del Sur, pero sólo en algunas cepas de España. El espoligotipo más común que se encuentra entre los aislados de Australia es idéntico al espoligotipo más común que se encuentra entre los aislados de Argentina, Uruguay y Paraguay. Las coincidencias de los DRs del presente estudio con los reportados por Zumarraga et al. (1999) son solo dos DR 25 y 38. Para conocer la importancia de dichos DR es necesario realizar otros estudios para determinar si estas deleciones o presencia de las regiones variables, son debidas a adaptabilidad de la bacteria al huésped o al medio de cultivo, a factores de virulencia o resistencia a fármacos como en el caso de cepas de *M. tuberculosis*.

Haddad et al. (2001) mencionan que para los aislados franceses, la técnica de Spoligotyping ofrece un nivel bastante alto de discriminación, que parece ser muy útil e incluso se puede utilizar para la trazabilidad espacial (geotipificación) y temporal

(cronotipificación) de los brotes, en cierta medida, al menos si los espoligotipos raros están involucrados. Un banco de datos internacional y el desarrollo de estudios de colaboración que permitieran la elaboración de un mapa de evolución de la tuberculosis bovina en el mundo, ayudaría a entender mejor la dinámica de esta enfermedad mediante la integración de los datos del comercio, la especificidad regional, al igual que la participación de los reservorios silvestres, y algunos factores intrínsecos, como la capacidad de la región DR de evolucionar con el tiempo.

Además, el método de Spoligotyping permitirá la rápida identificación de las familias de cepas bacterianas emergentes. La identificación de espoligotipos también será una herramienta importante en el seguimiento de los ensayos de medicamentos y vacunas, ya que permitirá la detección de las familias de cepas que pueden tener una mayor propensión a adquirir resistencia a los medicamentos o para escapar de la inmunidad protectora (Streicher 2007).

Haddad et al (2001) y Kamerbeek et al (1997) mencionan que el Spoligotyping podría llevarse a cabo con el ADN de muestras clínicas sin la necesidad del aislamiento del agente o purificar el ADN. En el estudio realizado por Kamerbeek et al. (1997) mencionan que los espoligotipos obtenidos de las muestras clínicas fueron idénticos a los obtenidos a partir de las correspondientes micobacterias cultivadas, lo que indicó que ni el procedimiento de extracción de ADN ni contaminantes en los extractos de ADN de las muestras clínicas afectan los resultados de Spoligotyping. En el presente estudio al comparar los patrones obtenidos de los Spoligotypings a partir de tejido y cepas de las 16 muestras aislamiento (+) / Spoligotyping de tejido (+), hubo diferencias que iban desde un solo DR como es el caso de las muestras 31 y 45 hasta 13 DR diferentes como es el caso de la muestra 72. Una situación similar se menciona en el estudio de Millán et al. (2010) donde se evaluó al Spoligotyping, entre otras pruebas, como métodos de diagnóstico rápido de la tuberculosis bovina en tejido fresco; dicho estudio menciona que Spoligotyping mostró baja sensibilidad y los patrones moleculares no fueron siempre los mismos cuando se usó tejido fresco o cultivo como fuente de ADN para la PCR (Millán, 2010). Gori et al. (2005) explican la diferencia en los patrones con la posibilidad de infecciones mixtas con 2 micobacterias diferentes, además demostraron la utilidad del Spoligotyping en el ámbito clínico para propósitos de diagnóstico, así como para los estudios epidemiológicos de transmisión de la

tuberculosis con muestras clínicas. Por otra parte, la posibilidad de combinar la información de diagnóstico rápido y de datos epidemiológicos moleculares representa un avance importante en el control epidemiológico de la tuberculosis.

Van der Zanden et al. (2002) menciona que pueden existir diferencias en los patrones obtenidos de muestras clínicas y cepa debido a la cantidad de ADN micobacteriano disponible.

CONCLUSIÓN

Spoligotyping fue desarrollado como una herramienta de genotipificación para proporcionar información sobre la estructura de la región DR en las cepas de *M. tuberculosis* y en diferentes miembros del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*. En el presente estudio, la prueba de Spoligotyping tuvo la capacidad para detectar y tipificar en 101 muestras a dos de las principales bacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. tuberculosis* causantes de la tuberculosis en bovinos y humanos respectivamente; por lo tanto demostró su capacidad como prueba diagnóstica complementaria directamente en muestras clínicas y mediante el uso de ADN de cepas. Además la tipificación rutinaria de aislados de *M. bovis* obtenidos en laboratorios de diagnóstico y mejorar la captura de información epidemiológica de los casos, ayudarían a obtener mejores conclusiones epidemiológicas de la distribución espacial de las cepas de este agente en el territorio nacional.

Por otra parte cuando se comparó los resultados obtenidos del aislamiento más la tipificación bioquímica y el Spoligotyping de tejido, este último fue más específico en la tipificación además de que no requiere de pureza ni abundancia de cultivos para discernir. Spoligotyping fue capaz también de detectar al agente en muestras que fueron negativas a aislamiento. El aislamiento es considerado la prueba de oro para el diagnóstico de tuberculosis aun cuando su sensibilidad es de 50%, con el uso del Spoligotyping se pretende complementar las carencias que todos los métodos de diagnóstico presentan para dicha tarea. De entre las ventajas del cultivo es que mejora los resultados de muchas de las pruebas utilizadas desde una bioquímica hasta pruebas moleculares. Cuando se compararon los resultados obtenidos de ambos Spoligotyping de tejido y cepa los patrones de las muestras en común de ambos no coincidieron; algunos autores mencionan que no se puede descartar la posible presencia de más de una especie de micobacteria detectada o posibles cambios de la bacteria al adaptarse al medio de cultivo que se refleje en patrones más homogéneos en el Spoligotyping de cepa.

Más que eso, Spoligotyping es de utilidad en cepas de *M. bovis* con pocas copias del elemento de inserción IS6110, como ocurre con *M. bovis* obtenido del ganado.

APENDICE 1

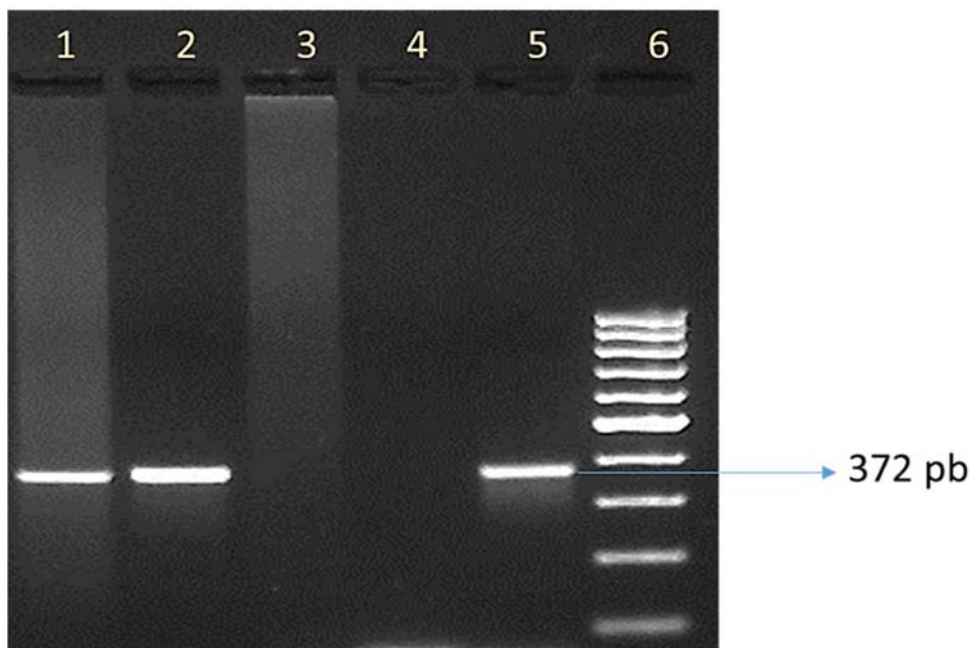


Figura 1. PCR de diagnóstico con MPB70. Gel de agarosa al 1.5%. Líneas 1 y 2 muestras positivas, línea 3 muestra negativa, línea 4 control negativo, línea 5 control positivo y línea 6 marcador de peso molecular de 100 pb.



Figura 2. Testigo positivo de *Mycobacterium phlei* para la prueba bioquímica de la determinación de fotoreactividad.

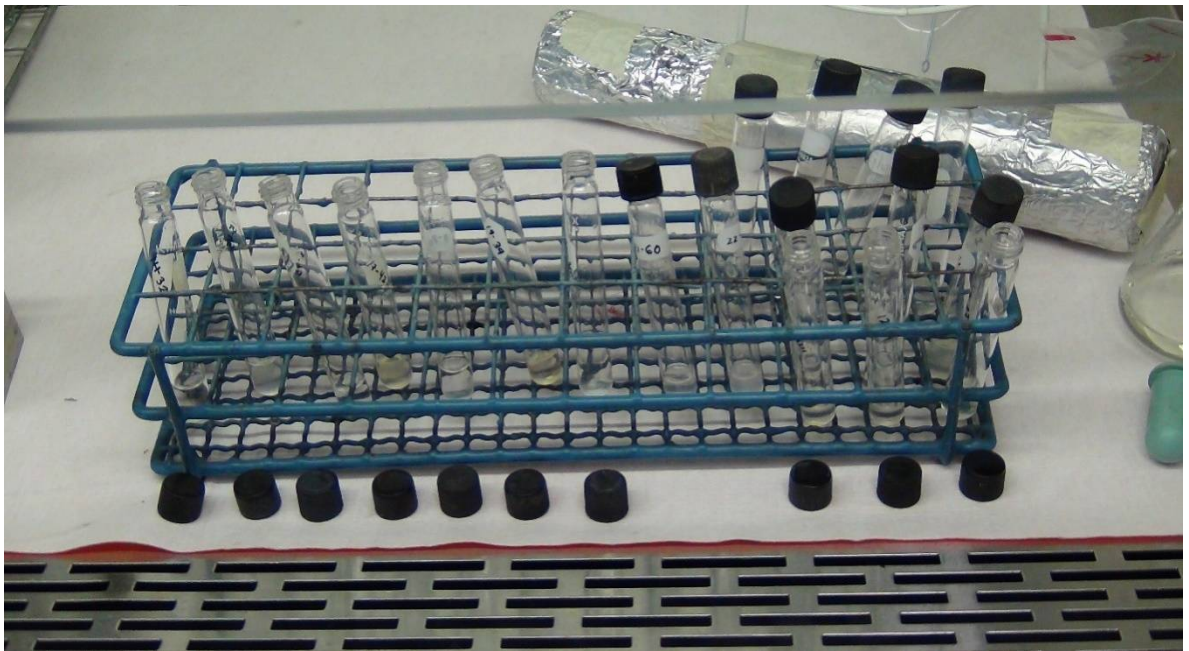


Figura 3. Prueba para detectar Acumulación de Niacina.

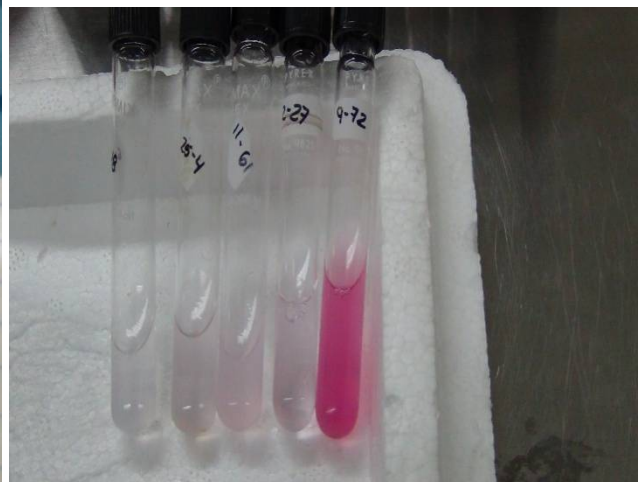


Figura 4. Prueba de reducción de Nitritos a Nitratos.

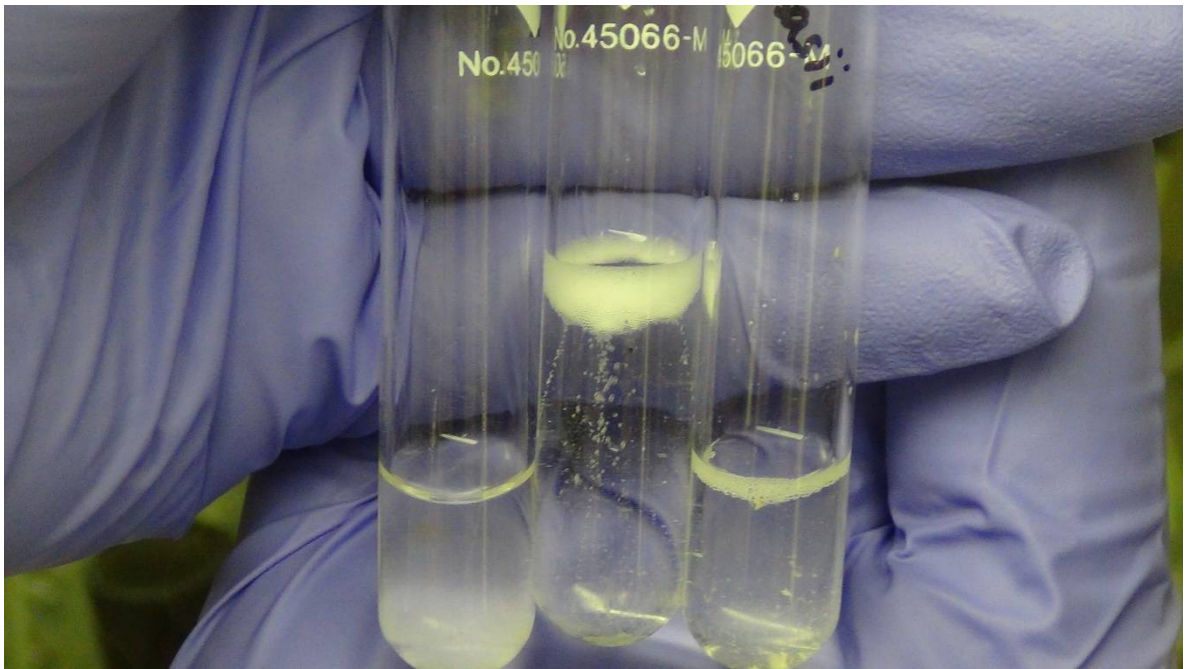


Figura 5. Actividad de la Catalasa.

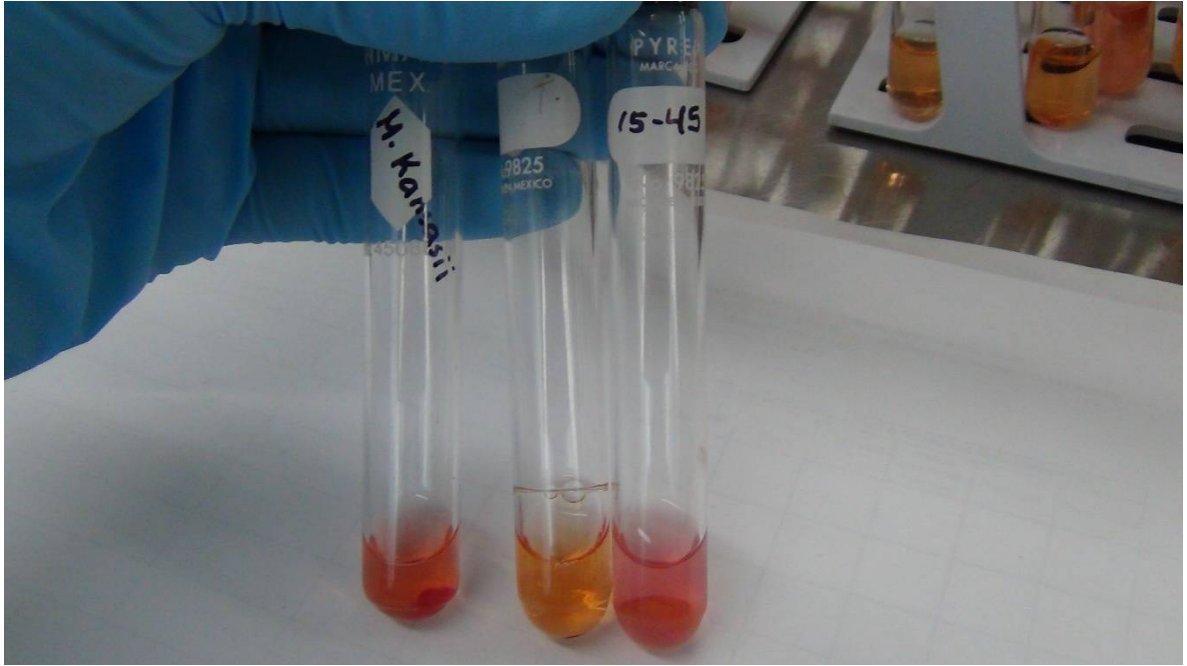


Figura 6. Prueba de Hidrólisis de Tween 80.

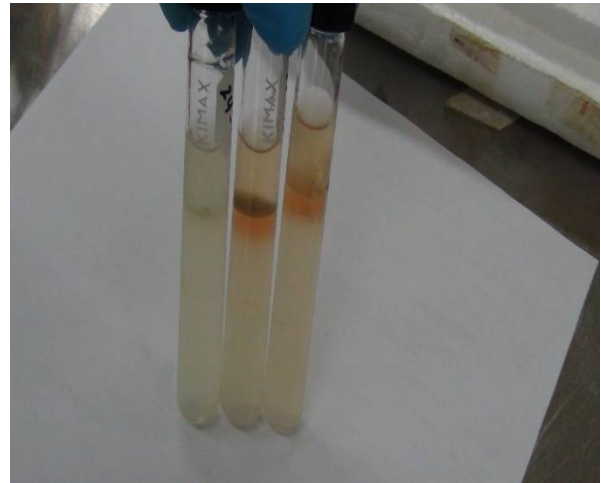
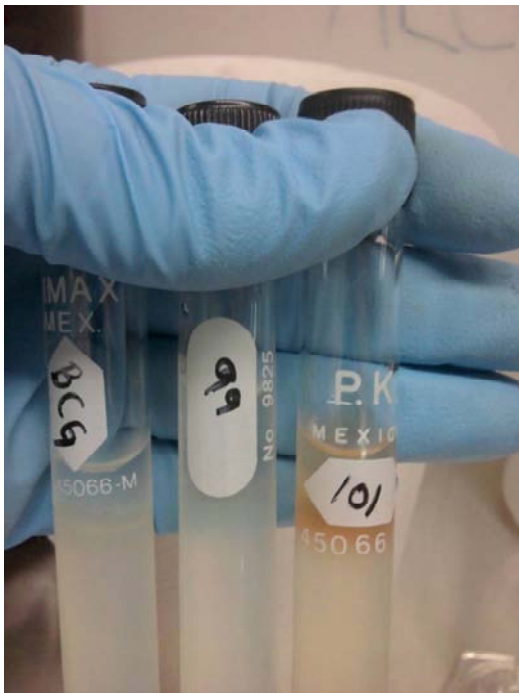


Figura 7. Prueba de pirazinamida.



Figura 8. Morfología colonial en medio de Lowenstein-Jensen.

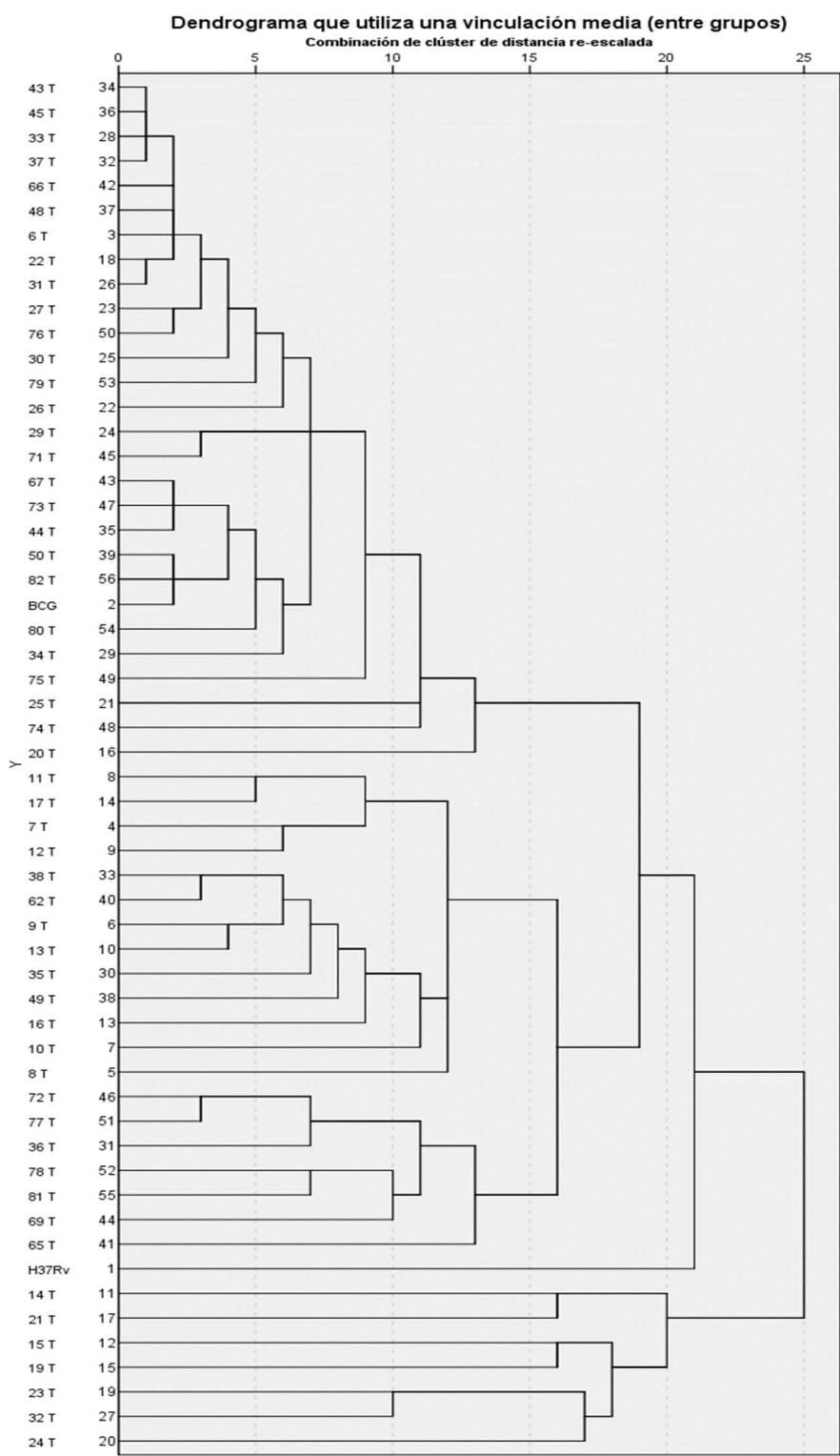


Figura 9. Dendrograma de patrones obtenidos en Spoligotyping de tejido.

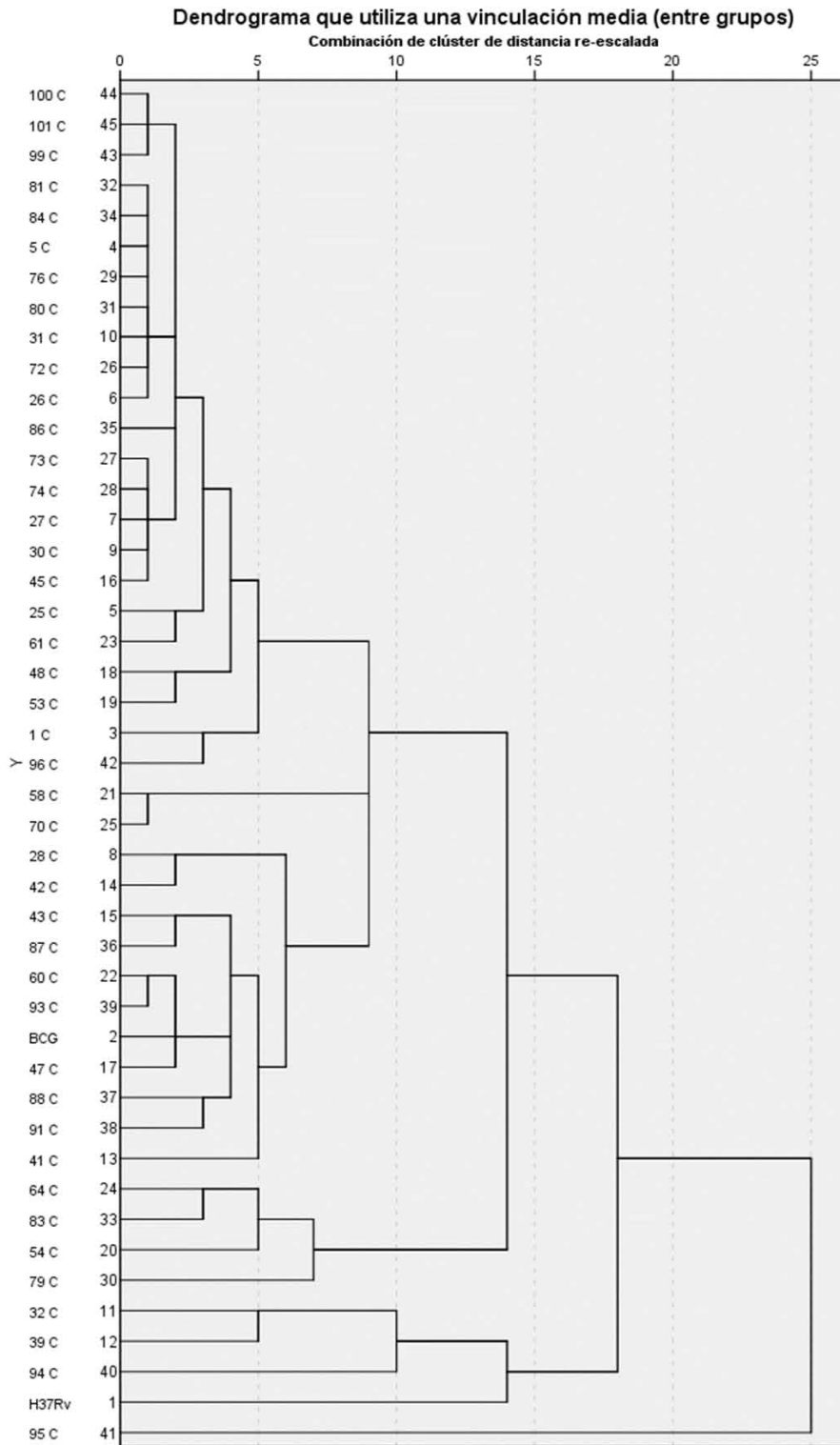


Figura 10. Dendrograma de patrones obtenidos en Spoligotyping de cepas.

APENDICE 2

Cuadro 1. Relación de los resultados de 101 muestras analizadas.

| PRUEBA | POSITIVO (%) | NEGATIVO (%) |
|---------------|--------------|--------------|
| AISLAMIENTO | 44 (53.56) | 57 (56.43) |
| PCR MPB70 | 29 (28.71) | 72 (71.28) |
| SPOLIGOTYPING | 54 (53.46) | 47 (46.53) |

Cuadro 2. Clasificación de los agentes por pruebas bioquímicas y Spoligotyping a partir de tejido y cepa.

| | <i>Mycobacterium</i> <i>spp.</i> | <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> | <i>M.</i> <i>bovis</i> | Negativas | Sin Clasificación | Total |
|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------|----------------------|-------|
| Spoligotyping de Tejido | 0 | 18 | 36 | 47 | 0 | 101 |
| Bioquímicas | 10 | 0 | 33 | 57 | 1 | 101 |
| Spoligotyping de Cepa | 0 | 10 | 33 | 57 | 1 | 101 |

Cuadro 3. Muestras positivas a aislamiento y a Spoligotyping de tejido

| ID | AISLAMIENTO | BIOQUÍMICAS | SPOLIGOTYPING/TEJIDO | SPOLIGOTYPING/CEPA |
|----|-------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| 25 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 26 | + | <i>M. spp</i> | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 27 | + | <i>M. spp</i> | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 30 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 31 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 32 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. tuberculosis</i> |
| 43 | + | <i>M. spp</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. tuberculosis</i> |
| 45 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 48 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 72 | + | <i>M. spp</i> | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 73 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 74 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. tuberculosis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 76 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 79 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 80 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |
| 81 | + | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> | <i>M. bovis</i> |

Cuadro 4. Patrones de Spoligotyping de tejido y cepas.*

*El número 1 representa la presencia del DR y el 0 la ausencia. En las letras que acompañan al número de identificación la T es de tejido y la C de cepa.

| ID | DR1 | DR2 | DR3 | DR4 | DR5 | DR6 | DR7 | DR8 | DR9 | DR10 | DR11 | DR12 | DR13 | DR14 | DR15 | DR16 | DR17 | DR18 | DR19 | DR20 | DR21 | DR22 | DR23 | DR24 | DR25 | DR26 | DR27 | DR28 | DR29 | DR30 | DR31 | DR32 | DR33 | DR34 | DR35 | DR36 | DR37 | DR38 | DR39 | DR40 | DR41 | DR42 | DR43 | clasificación | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------|----------|-----------------|-----------------|
| 26C | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | M. bovis | | |
| 26T | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | M. tuberculosis | |
| 32C | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | M. tuberculosis |
| 32T | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | M. bovis |
| 74C | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | M. bovis |
| 74T | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | M. tuberculosis | |

Cuadro5. Rastreo de los patrones obtenidos en la prueba Spoligotyping a partir de tejido.

| ID | OCTAL | NUMERO DE AISLADOS | AISLADO EN | REPORTA | ORIGEN |
|-------------|----------------|--------------------|--------------|---------|--------|
| 22 | 46406377777600 | 1 | LONDRES | GBA | |
| | | 1 | WELLINGTON | NZA | |
| 33,37,43,45 | 66406377777600 | 4 | BUENOS AIRES | ARG | |
| | | 3 | BRASILIA | BRA | |
| | | 3 | LONDRES | GBA | |
| | | 2 | LONDRES | GBR | |
| | | 1 | DUBLIN | IEA | |
| | | 1 | DUBLIN | IEB | |
| | | 1 | DUBLIN | IRL | |
| | | 1 | FIRENZE | ITA | |
| | | 4 | MÉXICO | MEX | |
| | | 1 | LONDRES | NLA | |
| 44 | 67656377777600 | 1 | WELLINGTON | NZA | |
| | | 3 | BUENOS AIRES | ARG | |
| | | 1 | PARIS | FXX | |
| | | 1 | LONDRES | GBA | |
| | | 1 | MÉXICO | MEX | |

Continuación del Cuadro 5.

| ID | OCTAL | NUMERO DE AISLADOS | AISLADO EN | REPORTA | ORIGEN |
|----|-----------------|--------------------|---------------------|---------|------------|
| 50 | 676763677777600 | 1 | BRUSELAS | BEA | |
| | | 1 | BRASILIA | BRA | BRASIL |
| | | 2 | BERLIN | DEU | |
| | | 1 | MADRID | ESP | |
| | | 2 | MÉXICO | MEX | |
| 66 | 264063777777600 | 3 | AMSTERDAM / LA HAYA | NLA | |
| | | 1 | WASHINGTON | USA | |
| | | 1 | LONDRES | GBA | |
| | | 1 | MÉXICO | MEX | |
| 76 | 674063777777600 | 1 | NUEVA YORK | | |
| | | 1 | LONDRES | GBA | |
| | | 1 | LONDRES | GBA | |
| 82 | 676763777777600 | 5 | BRASILIA | BRA | |
| | | 6 | BERLIN | DEU | |
| | | 26 | COPENHAGUE | DNK | DINAMARCA |
| | | 1 | COPENHAGUE | DNK | TURQUIA |
| | | 1 | COPENHAGUE | DNK | GROELANDIA |
| | | 1 | COPENHAGUE | DNK | |
| | | 3 | PARIS | FXX | |
| | | 1 | FIRENZE | ITA | |
| | | 1 | MÉXICO | MEX | |
| | | 2 | LILONGWE | MWI | |
| 1 | OLSO | NOR | NORUEGA | | |

Cuadro 6. Rastreo de los patrones obtenidos en la prueba Spoligotyping a partir de cepas.

| ID | OCTAL | NÚMERO DE AISLADOS | AISLADO EN | REPORTADO EN | ORIGEN |
|--------------------------------------|----------------|--------------------|--------------|--------------|-------------|
| 53 C | 26407377777600 | 5 | BUENOS AIRES | ARG | |
| | | 1 | LONDRES | GBA | |
| | | 1 | LONDRES | GBR | REINO UNIDO |
| | | 1 | LONDRES | GBR | |
| | | 3 | NUEVA YORK | USA | USA |
| | | 3 | NUEVA YORK | | |
| 25 C | 66406177777600 | 1 | BRASILIA | BRA | |
| 5,26,31,72,76, 80,81,84 C | 66406377777600 | 4 | BUENOS AIRES | ARG | |
| | | 3 | BRASILIA | BRA | |
| | | 3 | LONDRES | GBA | |
| | | 2 | LONDRES | GBR | |
| | | 1 | DUBLIN | IEA | |
| | | 1 | DUBLIN | IEB | |
| | | 1 | DUBLIN | IRL | |
| | | 1 | FIRENZE | ITA | |
| | | 4 | MÉXICO | MEX | |
| | | 1 | LONDRES | NLA | |
| | | 1 | WELLINGTON | NZA | |

Continuación Cuadro 6

| ID | OCTAL | NÚMERO DE AISLADOS | AISLADO EN | REPORTADO EN | ORIGEN |
|----------------------|----------------|--------------------|-------------------|--------------|-------------|
| 27,30,45,73, 74 C | 66407377777600 | 29 | BUENOS AIRES | ARA | |
| | | 11 | BUENOS AIRES | ARB | |
| | | 206 | BUENOS AIRES | ARG | |
| | | 1 | CANBERRA | AUA | |
| | | 2 | BRUSELAS | BEL | BELGICA |
| | | 25 | BRASILIA | BRA | |
| | | 10 | PARIS | FXX | |
| | | 45 | LONDRES | GBA | |
| | | 387 | LONDRES | GBR | |
| | | 2 | LONDRES | GBR | REINO UNIDO |
| | | 11 | DUBLIN | IEA | |
| | | 19 | DUBLIN | IEB | |
| | | 963 | DUBLIN | IRL | |
| | | 7 | MÉXICO | MEX | |
| | | 1 | FORT DE FRANCE | MTQ | |
| | | 1 | AMSTERDAM/LA HAYA | NLA | |
| | | 4 | BUENOS AIRES | NLA | |
| | | 32 | LONDRES | NLA | |
| | | 10 | WELLINGTON | NZA | |
| | | 10 | WELLINGTON | NZL | |
| 2 | ASUNCIÓN | PRY | | | |
| 3 | MONTEVIDEO | URY | | | |
| 6 | NUEVA YORK | USA | | | |
| 2 | WASHINGTON | USA | | | |
| 10 | PRETORIA | ZAA | | | |

Continuación Cuadro 6

| ID | OCTAL | NÚMERO DE AISLADOS | AISLADO EN | REPORTADO EN | ORIGEN |
|---------|----------------|--------------------|--------------|--------------|------------|
| 86 C | 67406377777600 | 1 | LONDRES | GBA | |
| 42 C | 67457377777600 | 5 | BUENOS AIRES | ARG | |
| | | 1 | BRASILIA | BRA | |
| 28 C | 67477377777600 | 1 | ROMA | ITA | ITALIA |
| 41 C | 67646377777600 | 1 | DUBLIN | IEB | |
| 58,70 C | 67657377707600 | 3 | BUENOS AIRES | ARG | |
| | | 2 | MÉXICO | NLA | |
| 60,93 C | 67676377777600 | 5 | BRASILIA | BRA | |
| | | 6 | BERLÍN | DEU | |
| | | 26 | COPENHAGUE | DNK | DINAMARCA |
| | | 1 | COPENHAGUE | DNK | GROELANDIA |
| | | 1 | COPENHAGUE | DNK | TURQUÍA |
| | | 1 | COPENHAGUE | DNK | |
| | | 3 | PARIS | FXX | |
| | | 1 | FIRENZE | ITA | |
| | | 1 | MÉXICO | MEX | |
| | | 1 | LILONGWE | MWI | |
| | | 1 | OSLO | NOR | NORUEGA |
| | | 2 | | USA | |

Cuadro8. Patrones de cepas ordenadas en base al número de deleciones y su identificación de espilgotipo.

| ID | DR1 | DR2 | DR3 | DR4 | DR5 | DR6 | DR7 | DR8 | DR9 | DR10 | DR11 | DR12 | DR13 | DR14 | DR15 | DR16 | DR17 | DR18 | DR19 | DR20 | DR21 | DR22 | DR23 | DR24 | DR25 | DR26 | DR27 | DR28 | DR29 | DR30 | DR31 | DR32 | DR33 | DR34 | DR35 | DR36 | DR37 | DR38 | DR39 | DR40 | DR41 | DR42 | DR43 | CLASIFICACION | ESPOLIGOTIPO | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|-----------------|---------|
| 60 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC1 | | | | | | | | |
| 93 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC2 | | | | | | |
| 28 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC2 | | | | | | |
| 42 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC3 | | | | | |
| 41 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC4 | | | | | |
| 96 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC5 | | | | | |
| 70 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC6 | | | | | |
| 58 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC6 | | | | |
| 86 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC7 | | | | |
| 27 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC8 | | | |
| 30 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC8 | | | |
| 45 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC8 | | | |
| 73 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC8 | | | |
| 74 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC8 | | | |
| 99 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC9 | |
| 100 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC9 | | |
| 101 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC9 | | |
| 5 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | | |
| 26 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | | |
| 31 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | | |
| 72 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | | |
| 80 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | |
| 84 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | |
| 76 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | | |
| 81 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC10 | | |
| 61 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC11 | | |
| 53 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC12 | |
| 25 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC13 | |
| 48 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC14 | |
| 54 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC15 | |
| 83 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC16 | |
| 64 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC17 | |
| 79 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. bovis | PAATC18 | | |
| 32 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC19 | |
| 39 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC20 |
| 87 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC21 | |
| 94 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC22 | |
| 43 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC23 | |
| 88 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC24 | |
| 91 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC25 | |
| 47 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC26 | |
| 1 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC27 | |
| 95 C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | M. tuberculosis | PAATC28 | |

APENDICE 3 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

FORMALINA AMORTIGUADA AL 10%

Formaldehído 37-40% 100 mL

Agua destilada 900 mL

Fosfato de sodio monobásico 4.0 g

Fosfato de sodio dibásico (anhidro) 6.5 g

DESCONTAMINACIÓN DE MUESTRAS ÁCIDO-ÁLCALI

1. Se utiliza un método de tratamiento ácido-álcali, que es una variante de la técnica de Petroff, por el cual la muestra se coloca en una solución antiséptica de hipoclorito de sodio, se transfiere a una solución de ácido clorhídrico, de neutraliza con hidróxido de sodio y se siembra en el medio.
2. Las muestras de órganos o de tejidos generalmente se encuentran en la solución de borato de sodio empleada para su transporte. Antes de sembrar, la muestra se debe limpiar y seleccionar la pieza o área más representativa para homogenizarla. Estas actividades deben realizarse en el interior de una campana de bioseguridad tipo II con vestimenta de protección como bata, guantes, lentes y cubrebocas.
3. La limpieza de la muestra puede o no realizarse, pero ayuda en el caso de muestras muy contaminadas. Para esto, la muestra íntegra se coloca en un frasco estéril con una solución de hipoclorito de sodio 1:1000 durante 30 minutos.
4. Para la selección, el órgano o tejido se disecciona con ayuda de material quirúrgico estéril (bisturí, tijeras y pinzas). Según el tamaño de la muestra, se puede diseccionar sobre un mortero de porcelana, una caja de Petri o una charola metálica estéril.
5. Se selecciona la parte con lesiones, necrosis o exudado caseoso y el resto del tejido se desecha. Debe eliminarse de la muestra la grasa o el tejido conectivo. Cuando la muestra es muy pequeña, no es necesario seleccionarla.
6. Para la homogenización, la porción seleccionada se macera en un mortero de porcelana estéril envuelto en papel, con una capacidad tres a cuatro veces mayor que el tamaño de la muestra.

7. Se agrega una pequeña cantidad de agua inyectable estéril y se tritura suavemente con la mano del mortero, cuidando de mantenerlo siempre tapado con el papel.
8. Cuando esté bien macerado el tejido, se agrega más agua inyectable estéril para hacer una suspensión y se trasvasa la suspensión a dos tubos de ensaye estériles con ayuda de una pipeta Pasteur o de un embudo de vidrio estéril.
9. Se rotulan los tubos con el número de muestra y uno se conserva a -20°C hasta la conclusión del estudio.
10. El segundo tubo de ensaye que contienen la muestra se utiliza para descontaminación.
11. Se añaden 5 partes de ácido clorhídrico al 10% de acuerdo al volumen del material y de 2 a 3 gotas de rojo de fenol al 1% (hasta que adquiera un color naranja).
12. Se agita ligeramente el tubo para que se mezcle su contenido y se deja en reposo durante 20 minutos.
13. Se añade una solución de NaOH 2N agitando el tubo, hasta que el indicador vire a un color entre morado y lila.
14. Se centrifuga la muestra a 3000 rpm durante 20 minutos, se decanta el tubo y el sobrenadante se desecha. El sedimento del tubo está listo para ser sembrado.

Reactivos para la descontaminación alcali-ácido.

- a) Solución de hipoclorito 1:1000
 - Se hace una dilución 1:200 de cualquier solución de cloro comercial, que generalmente viene al 5%, en agua destilada.
 - Se almacena a temperatura ambiente, protegida del sol.
- b) Ácido clorhídrico al 10%
 - En un matraz aforado de 1000 ml se colocan unos 800 ml de agua destilada.
 - Se añaden cuidadosamente 100 ml de ácido clorhídrico QP, se agita y se afora a 1000 ml con agua destilada.
- c) Hidróxido de sodio 2N

| | |
|--------------------|--------|
| Hidróxido de sodio | 80g |
| Agua destilada | 1000ml |

- Mezclar en matraz aforado de 1L, disolviendo el hidróxido primero en 500 ml de agua destilada y agregar finalmente los 500 ml restantes.
- Esterilizar y envasar en frasco color ámbar con tapa.-Conservar a temperatura ambiente.

d) Solución de rojo de fenol al 1%

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Rojo de fenol | 1g |
| Solución de hidróxido de sodio al 10% | 10 ml |
| Agua destilada | 1000ml |

- Mezclar hasta la total disolución, esterilizar y envasar en frasco color ámbar con tapa.
- Conservar a temperatura ambiente.

DESCONTAMINACIÓN CON ZEPHIRAN

Es importante que las muestras descontaminadas con zephiran se inoculen en medios que contengan huevo, ya que los fosfolípidos en el medio inactivan al cloruro de benzalconio evitando de esta manera que mate a las micobacterias.

1. Añadir 1 ml de zephiran al 0.2% a 1 ml de la suspensión de tejido no tratados con NaOH.
2. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos e inocular los medios Lowenstein-jensen y stonebrink.

CLORURO DE BENZALCONIO “ZEPHIRAN”

La solución de trabajo al 0.2% se prepara mezclando:

| | |
|------------------------|--------|
| Zephiran al 17% | 1.2 ml |
| Agua destilada estéril | 98 ml |

MEDIO DE LOWENSTEIN JENSEN

| Ingredientes: | Para 1612 ml de medio |
|---|-----------------------|
| Medio base Lowenstein-Jensen (Difco #0444) | 37.2 g |
| Agua destilada | 600 ml |
| Glicerina | 12 ml |
| Huevo fresco** preparado asépticamente (Aproximadamente 24 huevos grandes) | 1000 ml |

Equipo necesario:

Preparar y esterilizar:

1. Un frasco de 2 litros de capacidad con un aditamento que permita el vaciado del medio (Una pequeña campana de hule y una barra magnética para mezclar el medio).
2. Un embudo de tallo largo con una tela de muselina, amarrada al filo para sostenerla en su lugar. Una toalla de algodón doblada sobre la muselina. Tapar la abertura base del embudo con un cono de papel.
3. Dos recipientes de 1 litro de capacidad con cabeza para licuadora. Autoclavear en posición invertida. Envolver el embudo en papel para su esterilización.
4. Tubos de ensaye de 20 x 125 mm con tapón de rosca en cantidad suficiente. (aproximadamente 180 tubos son suficientes cuando se distribuyen 9ml / tubo.)

*Este medio también se prepara sin glicerina cuando así se especifica.

**Los huevos deberán ser frescos estrictamente. Deberán proceder de aves a las cuales no se les ha suministrado antibiótico o medicamentos en su alimentación.

Método de preparación:

1. Añadir medio base de Lowenstein-Jensen al agua destilada.
2. Mezclar en la licuadora para obtener una solución homogénea.
3. Colocar en el frasco de dos litros al que previamente se le ha colocado la glicerina.
4. Colocar en autoclave y esterilizar durante 20 minutos a 121°C.
5. Enfriar a temperatura ambiente.

Preparación de los huevos:

Lavar los huevos con agua tibia y detergente, enjuagar con agua limpia. Secar al aire sobre una toalla limpia. Sumergir 30 minutos en alcohol isopropílico al 75%. Colocar los huevos secos entre capas de toallas estériles. Humedecer la parte superior de un vaso de boca ancha con alcohol y flamear para esterilizar. Romper los huevos sobre el borde del vaso esterilizado y vaciarlos en el vaso de la licuadora estéril. Mezclar en la licuadora justo lo suficiente para homogenizar, pero evitar la formación excesiva de burbujas de aire. Filtrar a través de la tela muselina estéril usando el embudo dentro del frasco de 2 litros. (Poner un tapón de gasa en el frasco para guardar la esterilidad mientras los huevos se están filtrando). Mezclar suave pero totalmente en el mezclador magnético hasta que el medio se encuentre perfectamente homogéneo. Dejar el medio en reposo de 25 a 30 minutos antes de distribuirlo usando técnicas asépticas. El medio deberá fluir dentro del tubo sobre el lado marcado. No agitar el tubo después de vaciado el medio para evitar la formación de películas en las paredes opuestas. Colocar aproximadamente 9 ml de medio en los tubos de 20 x 125 mm. Colocar los tubos únicamente sobre el lado sobre el cual se hizo fluir el medio. Solidificar el medio colocando los tubos en posición inclinada durante 35 minutos a 82 °C. Enfriar ligeramente. Incubar de 24 a 48 horas en posición inclinada para que el exceso de agua sea reabsorbido por el medio.

MEDIO DE STONEBRINK

Ingredientes: Para 1200 ml de medio

Mezcla de sales:

| | |
|--|---------------|
| Piruvato de sodio | 5 g |
| Fosfato monobásico de Potasio KH_2PO_4 | 2 g |
| Agua destilada | 300 ml |
| Fosfato dibásico de sodio Na_2HPO_4 | 1.4 g (aprox) |

Para obtener un pH=6.5

Mezcla de colorantes:

| | |
|---|--------|
| Cristal Violeta | 100 mg |
| Verde de malaquita (forma oxalatada) | 800 mg |
| Agua destilada | 100 ml |
| Huevos frescos (preparados asépticamente) | 800 ml |

Con esto se prepara un promedio de 140 tubos.

Equipo para preparar y esterilizar:

1. 1 frasco con tapón de rosca de 250 ml.
2. 1 frasco de 2 litros con una barra magnética y una pequeña campana de hule para distribuir en los tubos asépticamente.
3. 1 embudo de tallo largo con una tela de muselina y cubierta con una toalla de algodón. Usar un cono de papel para cubrir la base del embudo.
4. 2 frascos de licuadora de 1 litro. Esterilizar en posición invertida.
5. 1 pipeta o varilla de vidrio para mezclar los huevos en el embudo.
6. Tubos de ensaye de 20 x 125 mm con tapón de rosca en cantidad suficiente.

Método de preparación:

Mezclar las sales hasta su completa disolución. Ajustar el pH a 6.5 con el fosfato dibásico de sodio. Colocar en el frasco de 2 litros. La mezcla de colorantes se agita hasta su disolución completa. Colocar en el frasco con tapón de 250 ml. Esterilizar en autoclave a 121°C. Enfriar a temperatura ambiente.

Preparación de los huevos:

Lavar con cepillo en agua con detergente, enjuagar con agua limpia y secar con la toalla estéril. Sumergirlos en alcohol isopropílico al 75% y dejarlos ahí durante 30 minutos. Secar colocando los huevos entre capas de toallas estériles. Empapar la parte superior de un vaso estéril en el alcohol y flamearlo, lo mismo para los vasos de la licuadora. Mezclar suavemente en la licuadora hasta que se homogenice la mezcla de huevo y evitar que se formen burbujas. Añadir la mezcla de colorantes a la mezcla de sales en el frasco de 2 litros. Filtrar los huevos a través de la muselina estéril dentro del frasco de 2 litros. Poner un tapón de gasa y algodón entre el embudo y el frasco hasta que los huevos estén filtrados. Cuando concluye la filtración, entonces reemplazar el tapón de algodón- gasa y mezclar con la barra magnética en el agitador magnético, hasta que el medio este homogéneo. Distribuir en los tubos asépticamente. No agitar los tubos después del vaciado. Colocar 9 ml del medio en cada tubo de 20 x 125 mm. Incubar 35 minutos a 82°C en posición inclinada para que el medio reabsorba el exceso de humedad.

PROCEDIMIENTO PARA LA SIEMBRA

1. En el interior de una campana de bioseguridad tipo II se coloca un par de gradillas, una con los tubos de la muestra neutralizada y centrifugada con el número de caso en cada tubo. En la otra gradilla se colocan los tubos con medio de cultivo identificados con los números de caso correspondientes. Es importante que el espacio de la izquierda de cada gradilla está vacío, para que durante la siembra se coloque en él el tubo ya utilizado; así, el espacio vacío se va desplazando hacia la derecha, sirviendo como punto de separación entre los tubos ya sembrados y los que están por sembrar.
2. Se puede utilizar una pipeta Pasteur y se toman de 3 a 5 gotas del sedimento de los tubos dejando escurrir sobre la superficie del medio sin tocarlo. Los tubos sembrados se incuban en posición horizontal los primeros días.
3. Para cada muestra se recomienda sembrar en dos tubos de medio Löwenstein-Jensen y medio Stonebrink. Para obtener un cultivo positivo, la muestra deberá contener por lo menos 10 bacilos viables por ml.
4. Una vez sembrados, los tubos se colocan en una bandeja con fondo inclinado, de manera que el líquido sembrado cubra toda la superficie del medio. Se llevan a la estufa de cultivo con la tapa floja para que se evapore la parte líquida de la siembra.
5. Los tubos se revisan diariamente durante los primeros 3 días, una vez transcurrido este periodo, siempre que no haya contaminación y el líquido de siembra se haya evaporado se ajusta el tapón y se colocan en posición vertical dentro de la estufa.
6. El resto de las revisiones se hacen cada semana, durante 8-9 semanas.
7. La incubación de los tubos sembrados debe hacerse a 37°C. Es necesario por lo tanto controlar regularmente la temperatura de la cámara.
8. En los tubos alcalinizados el medio adquiere un color blanco amarillento; en los acidificados toma un color verde azulado oscuro. Si hay contaminación por flora secundaria se aprecia el desarrollo de colonias. En ocasiones el medio puede estar licuado por la acción de gérmenes proteolíticos.

9. Cuando el tubo sembrado con alguna de las muestras se observa contaminado debe ser descartado inmediatamente y realizar de nuevo el procedimiento de descontaminación y cultivo con el segundo tubo de la misma muestra que se conservó en congelación tomando la mitad del contenido y almacenando la otra mitad en congelación hasta que se termine el estudio.
10. En los tubos de siembra en los cuales se observe colonias de crecimiento lento (a partir de la cuarta semana) es recomendable realizar un frotis y teñir con Ziehl-Neelsen, anotando en el formato si son bacilos ácido alcohol resistente o no.
11. Si en las revisiones aparecen cultivos contaminados tardíamente, sólo deben eliminarse aquellos en los que la contaminación ha cubierto la mayor parte de la superficie del medio, dejando para nueva observación los que conservan la mayor parte del medio sin contaminación. La contaminación tardía no excluye la presencia de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, por lo que siempre es conveniente realizar la tinción de un frotis con Ziehl-Neelsen a partir de los tubos que se desecharon por esta causa.

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO CON CTAB

1. a) Tomar 100 mg de tejido y macerarlo en 500 µl de PBS. Centrifugar a 12,000 g durante 1 min y decantar el sobrenadante.
b) Tomar 1.5 ml de orina y centrifugar a 12,000 g durante 1 min y decantar el sobrenadante
c) Tomar 10 ml de cultivo bacteriano, centrifugar a 12,000 g durante 5 min y decantar el sobrenadante
d) Tomar 3 colonias de bacterias, agregar 500 µl de PBS, homogenizar y centrifugar a 12,000 g durante 5 min y decantar el sobrenadante.
2. Agregar 400 µl de buffer TE 1X más 50 µl de lisozima (10mg/ml), agitar en vortex e incubar al menos 1 hora (puede ser toda la noche) a 37°C
3. Adicionar 75 µl de SDS 10% y 6 µl de proteinasa K (10mg/ml), agitar en vortex e incubar 10 min a 65°C
4. Adicionar 100 µl de NaCl 5M

5. Adicionar 100 μ l de una solución de CTAB/NaCl (precalentada a 65°C), agitar en vórtex hasta que la mezcla tome un aspecto lechoso. Incubar a 65°C durante 10 min.
6. Adicionar 750 μ l de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), agitar en vórtex durante 10 seg y centrifugar 5 min a 12,000 g
7. Transferir el sobrenadante en volúmenes de 200 μ l a un microtubo limpio y estéril (aproximadamente 600 μ l), con la precaución de **NO** tomar la interfase porque podría contaminar el ADN
8. Al volumen transferido agregar alcohol isopropílico en cantidad que represente el 60%. Ejemplo: Si el volumen transferido fue de 600 μ l agregar 360 μ l de alcohol isopropílico.
9. Dejar reposar la muestra a -20°C durante 30 min
10. Centrifugar a 12,000 g durante 15 min
11. Descartar el sobrenadante dejando aproximadamente 20 μ l sobre el precipitado
12. Adicionar 500 μ l alcohol etílico al 70 % invertir suavemente el tubo con la mano unas 10 veces. Centrifugar 5 min a 12,000 g. Descartar el sobrenadante dejando 20 μ l sobre el precipitado
13. Centrifugar a 12,000 g durante 1 min y descartar cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta. Observar que no queden rastro de etanol.
14. Permitir secar el ADN a temperatura ambiente durante 45 min o secar en una centrifuga de vacío durante 20 min a 40°C
15. Resuspender el ADN en agua inyectable (30-50 μ l) dependiendo del tamaño del botón.
16. Poner los tubos en baño María entre 55-60°C por 5 min
17. Almacenar en refrigeración ó congelación hasta su uso

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA EXTRACCIÓN

- **CTAB (N-Cetyl-N-N-N,-trimethyl ammonium bromide)/NaCl**

Disolver 4.1 g de NaCl en 80 ml de agua destilada agitando la solución. Calentar a 65°C e ir adicionando 10 g CTAB. Disuelta la solución aforar a 100 ml. Almacenar a temperatura ambiente. Caducidad 6 meses.

- **Etanol al 70%**

70 ml de Etanol absolutocbp 100 ml de agua destilada

- **NaCl 5M**

Disolver 29.2 g de NaCl en 100 ml de agua destilada. Esterilizar y almacenar a temperatura ambiente. Caducidad 1 año

- **Proteinasa K 10 mg/ml**

Disolver 10 mg de proteinasa K en 1 ml de agua destilada. Alicuotar y almacenar a -20°C. Caducidad 1 año.

- **SDS 10%**

Disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. Para disolver el soluto se puede calentar a 65°C durante 20 min. Caducidad un año.

- **Solución de Lisozima 10 mg/ml**

Disolver 10 mg. de lisozima en 1 ml de agua destilada. Almacenar en alícuotas a -20°C. Caducidad de un año

- **TE 10 X**

100 mM Tris-HCl pH 8.0

10 mM EDTA

Disolver en agua destilada, esterilizar y almacenar a temperatura ambiente. Caducidad hasta de un año. Diluir 10 veces para usarla como solución de trabajo.

PCR MPB70

| REACTIVOS Reactivos Applied Biosystems | VOLUMEN (reacción 25µl) |
|---|----------------------------|
| Agua | 14.25 µl |
| Buffer 10X | 2.5 µl |
| MgCl ₂ 25mM | 2.0 µl |
| Mix dNTPs 10mM | 1.0 µl |
| Primer TB-1A 20 pmol/µ | 1.0 µl |
| Primer TB-1B 20 pmol/µl | 1.0 µl |
| Taq Gold | 0.25 µl |
| BSA | 1.0 µl |
| Total | 23.0 µl |

Usar 2.0µl de ADN

PROGRAMA DE AMPLIFICACION

94°C ---- 5 min

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| 94°C ---- 1 min | } | 35 ciclos |
| 58°C ---- 1 min | | |
| 72°C ---- 1 min | | |
| 72°C ---- 7 min | | |

Primer TB-1A: 5' – GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA - 3' Conservar a -20°C

Primer TB-1B: 5' –AGC ACG CTG TCA ATC ATG TA - 3' Conservar a -20°C

Control Positivo: ADN de *M. bovis* AN5

PCR DRa y DRb Complejo Tuberculosis

| REACTIVOS Reactivos Applied Biosystems | VOLUMEN (reacción 25µl) |
|---|----------------------------|
| Agua | 12.75 µl |
| Buffer 10X | 2.5 µl |
| MgCl ₂ 25mM | 2.0 µl |
| Mix dNTPs 10mM | 1.0 µl |
| Primer DRa 20 pmol/µ | 2.0 µl |
| Primer DRb 20 pmol/µl | 2.0 µl |
| Taq Gold | 0.25 µl |
| Total | 22.5 |

Usar 2.5 µl de ADN (10-20 ng) cuando es de cepa y 5µl de ADN cuando es de muestra clínica.

PROGRAMA DE AMPLIFICACION

96°C ---- 3 min. 15 min en muestras clínicas.

| | | |
|------------------|---|--|
| 96°C ---- 1 min | } | 30 ciclos cepas/40 ciclos muestras de clínicas |
| 55°C ---- 1 min | | |
| 72°C ---- 30 seg | | |
| 72°C ---- 5 min | | |

Primer DRa: /BIOTIN/ 5' - GGT TTT GGG TCT GAC GAC -3' Marcado con biotina, conservar en refrigeración (4-6°C).

Primer DRb: 5' - CCG AGA GGG GAC GGA AAC - 3' Conservar a -20°C

Controles Positivos: ADN de *Mycobacterium bovis* AN5 y *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

NOTA: En ADN a partir de cepas hervidas (20 min 80 °C) usar 30 ciclos de amplificación.

PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA PRUEBA DE SPOLIGOTYPING

Nota: Antes de iniciar la prueba los buffers de trabajo se deben precalentar de la siguiente manera:

- 250 ml de Buffer SSPE 2X/0.1% SDS a 60°C.
 - 250 ml de Buffer SSPE 2X/0.5% SDS a 60°C.
 - 250 ml de Buffer SSPE 2X/0.1% SDS a 42°C.
 - 250 ml de Buffer SSPE 2X mantenerse a temperatura ambiente.
1. Adicionar 20 µl de producto de PCR a 150 µl de buffer SSPE 2X/0.1% SDS
 2. Desnaturalizar por calor los productos diluidos 10 min a 99°C e inmediatamente enfriar en hielo.
 3. Lavar la membrana durante 5 min a 60°C en 250 ml de SSPE 2X/0.1% SDS
 4. Colocar la membrana sobre un cojín de apoyo en la cámara de hibridación (minibloter) de tal manera que las ranuras queden perpendiculares a la línea patrón de los oligonucleótidos aplicados en la membrana.
 5. Extraer el líquido residual de las ranuras de la cámara de hibridación por aspiración.
 6. Llenar los espacios con el producto de PCR diluido (evitar hacer burbujas de aire) e hibridar 60 min a 60°C sobre una superficie horizontal, **no agitar** para evitar la contaminación de las ranuras vecinas.
 7. Retirar las muestras de la cámara de hibridación por aspiración y tomar la membrana de un extremo con unas pinzas.
 8. Lavar la membrana dos veces en 250 ml SSPE 2X /0.5% SDS durante 10 min a 60°C.
 9. Colocar la membrana en una botella redonda, dejar enfriar para evitar la inactivación de la estreptavidina en el siguiente paso.
 10. Añadir 2.5 µl de conjugado estreptavidina-peroxidasa (500 U / ml) en 10 ml de SSPE 2X/0.5% SDS. Incubar la membrana en esta solución durante 45- 60 min a 42°C con la botella en movimiento.
 11. Lavar la membrana dos veces en 250 ml de SSPE 2X/0.5 % SDS durante 10 minutos a 42 °C.
 12. Enjuagar la membrana dos veces con 250 ml de SSPE 2X durante 5 min a temperatura ambiente.

13. Para la detección de quimioluminiscencia de hibridación de ADN, se incuba la membrana durante 1 minuto en 20 ml de líquido de detección ECL.
14. Cubrir la membrana con plástico transparente (acetato) por ambos lados y exponer la membrana sobre una película radiográfica dentro de una casetera durante 20 min.
15. Revelar la radiografía en un cuarto oscuro.

Si la señal es demasiado débil o demasiado fuerte, la membrana puede ser usada de nuevo y exponerse directamente sobre otra película radiográfica durante un período más corto o más largo según sea el caso.

Una vez terminada la prueba, la membrana se lava para disociar los productos de PCR con el fin de regenerar la membrana para la hibridación siguiente. Una membrana puede ser usada hasta 10 veces.

1. Lavar la membrana dos veces por incubación en SDS al 1% a 80 °C durante 30 min.
2. Lavar la membrana en EDTA 20 mM pH 8, durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Guardar la membrana a 4°C hasta su uso con un poco de EDTA 20 mM pH 8.0 (usar una bolsa de plástico sellada para evitar la deshidratación de la membrana o un contenedor de plástico).

Comentarios:

- 1.- No reutilizar los cojines de apoyo.
 - 2.- Si el número de muestras es inferior a 45, llenar las ranuras vecinas con SSPE 2X /0.1 % SDS, para prevenir contaminación.
 - 3.- No usar los contenedores de plástico para otro propósito, ya que algunos reactivos disminuyen la intensidad de los patrones de Spoligotyping.
 - 4.- *Puntos Negros* (al fondo), posiblemente, se producen debido a la contaminación durante la manipulación (tocar con los dedos). Empezar de nuevo a partir del paso 7.
- Áreas en blanco* en los patrones de Spoligotyping indican posiblemente, que la membrana no fue completamente mojada con el líquido de detección ECL. Empezar de nuevo a partir del paso 12

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA SPOLIGOTYPING

- **SSPE 20X**

0.2 M Na₂HPO₄*2H₂O 35.6 g/l

3.6 M NaCl 210.24 g/l

20 mM EDTA 7.4 g/l

Ajustar el pH a 7.4. Conservar a temperatura ambiente.

- **SSPE 2X**

Diluir 10 veces el SSPE 20X con agua destilada.

- **SDS al 10%**

Disolver 10 g de SDS en 100 ml de agua destilada.

- **SDS al 1%**

Diluir 10 veces el SDS al 10%

- **SSPE 2X/0.1%SDS**

Adicionar 100 ml de SSPE 20X y 10 ml SDS al 10% en 890 ml de agua destilada.

- **SSPE 2X/0.5%SDS**

Adicionar 100 ml de SSPE 20X en 50 ml de SDS al 10% en 850 ml de agua destilada.

- **EDTA 20 mM pH 8.0**

Agregar 0.7445 g de EDTA en 80 ml de agua destilada, disolver y ajustar el pH con hidróxido de sodio.

Agregar agua destilada cbp 100 ml.

REACTIVOS Y SUMINISTROS ADICIONALES

Cámara de hibridación o minibloter.

Casetera de exposición para radiografías (24x30 cm)

Cojines de apoyo para cámara de hibridación (Minibloter)

Conjugado estreptavidina POD (500 U / ml)

Horno de Hibridación

Líquido de detección ECL

Líquido fijador y revelador para radiografías.

Película radiográfica para ECL preferentemente (18 X 24 cm)

Termociclador

PRUEBAS BIOQUÍMICAS

➤ **Determinación de fotoreactividad de micobacterias.**

Introducción

La pigmentación de colonias jóvenes de micobacterias, desarrollada en la oscuridad o inducida por exposición a la luz, puede ser una característica importante en la identificación de ciertas especies de micobacterias.

Principio

La presencia de pigmento amarillo en las micobacterias fotocromógenas es el resultado de la producción de cristales anaranjado amarillentos de caroteno por parte de las micobacterias de metabolismo activo, luego de haber sido expuestas a una luz brillante. No se conoce el tipo de pigmento producido por las micobacterias en la oscuridad.

Medios y reactivos

Resulta aceptable cualquier medio no inhibidor que promueva el desarrollo del organismo en estudio. No deben utilizarse medios selectivos o que contengan antimicrobianos, ya que pueden interferir en la formación de pigmentos. El medio de Lowenstein-Jensen es bueno para determinar fotocromogenicidad.

Técnica

Inocular 3 tubos con medio de Lowenstein-Jensen con un caldo de cultivo de los organismos en estudio, diluido de modo que se puedan obtener colonias aisladas. Envolver 2 de los tubos con una hoja de aluminio y dejar al tercero en la incubadora expuesto a la luz ambiente. Los cultivos que se sospechan fotocromógenos se deben incubar a 30 y 37 °C, mientras que los considerados escotocromógenos deben inocularse por duplicado e incubados a 24-26 °C y a 37 °C.

Varios días después de advertir la presencia de desarrollo en el tubo control expuesto a la luz, se examinan los tubos expuestos para comprobar si hay desarrollo. Si existe evidencia de formación de colonias o desarrollo temprano, exponer a unos de los dos tubos a una luz fuerte. Una lámpara de tungsteno de 100 vatios o fluorescente de potencia equivalente, resulta adecuada. Se debe aflojar la tapa del tubo de cultivo durante el tiempo de exposición de 3 a 5 días.

Luego de exponer el cultivo a la luz se vuelve a colocar en la incubadora y se examina 24 a 48 horas después para comprobar si hay desarrollo de un pigmento anaranjado o amarillo.

Interpretación

Los cambios de color producidos, especialmente los cambios sutiles, se comparan en el tubo expuesto a la luz ambiente y en el tubo envuelto que no ha sido expuesto a la luz.

Las micobacterias escotocromógenas, es decir, las que producen pigmentos cuando se incuban en la oscuridad, incluyen *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, *M. xenopi* y *M. szulgai*, esta última sólo cuando se incubaba a 37 °C.

Las especies fotocromógenas incluyen *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae* y *M. szulgai*, esta última sólo cuando se incubaba a 2-24 °C.

Muchas especies son por lo general ligeramente pigmentadas, como el *M. intracellulare-avium*. Runyon ha denominado a estos organismos “no fotocromógenos”, significando que la exposición a la luz no intensifica la pigmentación.

Las especies micobacterianas no pigmentadas o sólo ligeramente pigmentadas incluyen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, y ciertas especies de micobacterias no fotocromógenas del grupo III.

Controles

Control fotocromógeno: *M. kansasii*.

Control escotocromógeno: *M. scrofulaceum*.

Control fotocromógeno y escotocromógeno: *M. szulgai* a 24 y 37 °C.

Control negativo: *M. tuberculosis*.

➤ **Acumulación de niacina**

Introducción

La niacina se forma en todas las micobacterias como subproducto metabólico, pero la mayoría de las especies poseen una enzima que transforma la niacina libre en niacina ribonucleótido. El *M. tuberculosis*, el *M. simiae*, algunas cepas ocasionales de *M. marinum* y *M. chelonae*, como también varias cepas de *M. bovis*, carecen de esta enzima y acumulan niacina como subproducto hidrosoluble en el medio de cultivo. La cantidad de niacina presente en un pico de cultivo refleja en parte el número de colonias y la edad del cultivo.

Principio

En la prueba química para la detección de niacina descrita por Runyon, el ácido nicotínico reacciona con el bromuro de cianógeno en presencia de una amina primaria (anilina) formando un compuesto amarillo. Se han descrito otras variantes de la prueba, pero se consideran generalmente menos sensibles que la prueba de Runyon.

Medios y reactivos

1. Medio de Lowenstein- Jensen o medios 7H10 o 7H11 suplementados con aspartato de potasio al 0.1%.
2. Agua o solución salina al 0.85%, estéril.
3. Anilina al 4%.

A. Anilina incolora, 4 ml.

B. Etanol al 95%, 96 ml.

Conservar en un frasco color caramelo, en refrigerador. Si la solución se vuelve amarilla, descartarla y preparar una solución fresca.

4. Bromuro de cianógeno al 10%.

Bromuro de cianógeno, 5 g.

Disolver en 50 ml de agua destilada o desionizada. Conservar en el refrigerador en frasco color caramelo con tapa hermética. Si se forma un precipitado, calentar a temperatura ambiente y disolver antes de usar. La solución es volátil y puede perder fuerza durante su almacenamiento. (Nota: el bromuro de cianógeno es un gas lacrimógeno y se debe manipular en una cabina de seguridad con expulsión de gases al exterior. En soluciones ácidas el bromuro de cianógeno puede hidrolizarse a cianuro de hidrógeno, un gas muy tóxico. Descartar siempre la solución que contenga bromuro de cianógeno en germicidas con NaOH al 2 a 4%.)

Técnica

La prueba se lleva a cabo añadiendo 1 ml de agua o solución salina estéril al pico de Lowenstein-Jensen de un cultivo maduro o a la superficie de un medio 7H10 o 7H11 con varias colonias bien formadas. Dado que la niacina debe extraerse del medio de cultivo, el desarrollo no debe cubrir toda la superficie del medio. Si ello ha ocurrido, raspar parte del desarrollo bacteriano hacia un lado, a fin de permitir que el líquido de extracción esté en contacto directo con el medio. Dejar que el líquido cubra la superficie durante 15 a 30 minutos y luego transferir 0.5 ml a un tubo limpio

con tapa de rosca. Añadir 0.5 ml de anilina y luego 0.5 ml de bromuro de cianógeno. Si la niacina ha sido extraída del cultivo, aparece en el extracto un color amarillo en pocos minutos.

Se han desarrollado tiras de papel filtro impregnado de reactivo, que simplifican la prueba una vez realizada la extracción. Estas tiras son sensibles y funcionan bien si se siguen cuidadosamente las instrucciones. Al utilizar las tiras de papel, se debe colocar el extracto del medio de cultivo y la tira con reactivo en un tubo con tapa de rosca y cerrarlo herméticamente. El gas cloruro de cianógeno que se desprende de la parte superior de la tira, reacciona con la niacina del líquido de extracción que se encuentra en el fondo del tubo. Éste debe hallarse herméticamente cerrado para impedir cualquier pérdida de gas. No emplear tiras que se han decolorado, ya que los reactivos pudieron haber sufrido cierto grado de deterioro y no son confiables.

Interpretación

La aparición de un color amarillo en el líquido de extracción indica la presencia de niacina. Organismos niacina positivos pueden dar pruebas negativas si el desarrollo es insuficiente o temprano como para que se acumule bastante niacina detectable en el medio. Si el cultivo parece tener desarrollo insuficiente, volver a incubarlo durante 2 a 4 semanas adicionales o efectuar un subcultivo que tenga un mínimo de 50 o más colonias. También se puede obtener una prueba negativa si hay desarrollo bacteriano por toda la superficie del medio de cultivo, impidiendo la extracción de niacina del medio. Esto se puede controlar raspando parte del desarrollo bacteriano confluyente hacia un lado, mediante una espátula o aguja de inoculación.

Controles

Añadir controles de reactivo a un tubo con medio sin inocular.

Control positivo: *Mycobacterium tuberculosis*

Control negativo: *Mycobacterium intracellulare*

➤ Reducción de nitratos a nitritos

Introducción

La presencia de la enzima nitroreductasa es una importante característica de identificación. Las especies *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. fortuitum* reducen nitratos a nitritos. Otras especies nitroreductasas positivas incluyen *M. flavescens*, *M. terrae*, *M. triviale* y *M. chelonae*.

Principio

Las micobacterias que contienen nitroreductasa, pueden obtener oxígeno de nitratos y otros productos de reducción. La reacción química es:



La presencia de nitrito en el medio se detecta añadiendo sulfanilamida y n-naftiletildiamina en un pH ácido. Si hay nitritos, se forma un colorante rojo de diazonio.

Reactivos

1. NaNO₃ M/100 en buffer de fosfato M/45, pH 7

| | |
|---|----------|
| NaNO ₃ | 0.085 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.117 g |
| Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O | 0.485 g |
| Agua destilada | 100.0 ml |

2. Disolver 1:1 de HCl concentrado (añadir 10 ml de HCl a 10 ml de H₂O; siempre añadir ácido concentrado al agua).
3. Disolver 0.2 g de sulfanilamida en 100 ml de agua.
4. Disolver 0.1 g de diclorhidrato de n-naftiletildiamina en 100 ml de agua destilada.

Conservar los reactivos a 4°C y descartarlos ante cualquier cambio de color.

Técnica

1. Colocar varias gotas de agua destilada estéril en un tubo estéril con tapa de rosca.
2. Tomar un asa de cultivo de micobacterias en desarrollo activo y emulsionarla en el agua.

3. Añadir a la emulsión 2 ml de la solución buffer de nitrato de sodio, mezclar por agitación e incubar a 37 °C durante 2 horas.
4. Acidificar el cultivo añadiendo 1 gota de la dilución 1:1 de HCl
5. Añadir 2 gotas de solución de sulfanilamida.
6. Añadir 2 gotas de la solución de n-naftiletilendiamina.

Interpretación

El desarrollo de un color rojo en 30 a 60 segundos indica una prueba positiva. El color puede variar de rosa a rojo intenso. Se puede efectuar una cuantificación comparando con estándares de color. Si no hay desarrollo de color, confirmar la prueba como negativa añadiendo una pequeña cantidad de polvo de zinc con la punta de una varilla. Si aparece un color rojo, la prueba es realmente negativa. Si no hay desarrollo de color al agregar el zinc, la prueba era positiva, habiendo sido los nitratos de la solución reducidos a compuestos incoloros. Dado que no es común que las micobacterias reduzcan los nitratos a productos gaseosos como N₂O se deben repetir todas las pruebas falsas negativas.

Controles

Cada nuevo grupo de reactivos se debe comparar con reactivos establecido y convalidado antes de emplearlos con aislamientos clínicos. Se deben utilizar los siguientes organismos de control cada vez que la prueba se determina en aislamientos recientes:

M. tuberculosis H37R: fuertemente positivo.

M. kansasii: débilmente positivo.

M. intracellulare: negativo.

Ocasionalmente los colores pueden ser pálidos o difíciles de interpretar. Cuando esto ocurre, se pueden preparar estándares de color para ayudar a interpretar la prueba.

➤ **Actividad de catalasa.**

Introducción

La mayoría de las micobacterias producen la enzima catalasa, pero en cantidades variables. También algunas catalasas son inactivadas por calentamiento a 68°C durante 20 minutos, mientras que otras son estables. La semicuantificación de catalasa, y la susceptibilidad al calentamiento a 68°C a pH 7 son características útiles para la identificación de las micobacterias. Algunas veces se utiliza un tercer método, cualitativo, para investigar la actividad de catalasa, la “prueba de la mancha”.

Principio

Los organismos que producen la enzima catalasa, tienen la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre.



La prueba de la catalasa micobacteriana difiere de la que se utiliza para otros tipos de bacterias, ya que en lugar de la solución usual de peróxido de hidrógeno al 3%, se emplea peróxido de hidrógeno al 30% (Superoxal) en una fuerte solución detergente (Tween 80 al 10%). El detergente ayuda a que las micobacterias, hidrofóbicas, estrechamente agrupadas formando grandes agregados, se dispersen como bacilos individuales, facilitando la detección de la catalasa.

Medios y reactivos

Medios:

1. Para la prueba directa se recomienda un medio a base de huevo o agar.
2. Para la prueba semicuantitativa y de la catalasa termoestable, se aconseja un medio a base de huevo.

Reactivos:

1. Peróxido de hidrógeno, 30% (Superoxol).
2. Tween 80, 10%, esterilizado a 121°C durante 10 minutos y conservado a 4°C. Mezclar por rotación antes de usar si se observa un sedimento.
3. En el momento de utilizar, mezclar volúmenes iguales de peróxido de hidrógeno al 30% y Tween 80 en cantidad necesaria. Descartar toda mezcla Tween-peróxido sobrenadante, pues es inestable y no se debe volver a usar.
4. Buffer de fosfatos M/15.

A. Soluciones de reserva:

| | |
|--|------------|
| (1) Na ₂ HPO ₄ anhidro | 9.47 g |
| Agua destilada | 1000.00 ml |
| (2) Fosfato de potasio KH ₂ PO ₄ | 9.07 g |
| Agua destilada | 1000.00 ml |

B. Buffer de fosfatos, pH 7

Mezclar 61.1 ml de solución A (1) con 38.9 ml de solución B (2). Confirmar el pH con medidor.

Técnica

Prueba directa:

Colocar 1 a 2 gotas de una solución Tween-peróxido recién mezclada sobre una colonia micobacteriana desarrollada en una placa o tubo. Observar durante 4-5 minutos para ver si hay desprendimiento de burbujas. La aparición de burbujas puede ser rápida (fuertemente positiva) o lenta (débilmente positiva). La ausencia de burbujas indica una prueba de catalasa negativa.

Prueba semicuantitativa:

1. Inocular la superficie de un tubo con medio de Löwenstein-Jensen (preparado en “pico de flauta” como para sembrar en profundidad) con 0.1 ml de un cultivo de 7 días del organismo en medio líquido.
2. Incubar a 37°C durante 2 semanas. La tapa del tubo de cultivo debe ser floja para permitir un adecuado intercambio de aire.
3. Añadir 1ml de solución Tween-peróxido recién preparada y dejar en posición vertical durante 5 minutos.
4. Medir la altura de la columna de burbujas sobre la superficie del medio de cultivo y anotar los datos.

Prueba de la catalasa termoestable –pH 7/68°C, 20 minutos:

1. Emulsionar en un pequeño tubo varias colonias del organismo en 0.5 ml de buffer de fosfatos M/15, pH 7.
2. Colocar el tubo en un baño de agua o en un bloque termostático a 68°C durante 20 minutos.
3. Retirar el tubo y dejarlo enfriar a temperatura ambiente.
4. Añadir 0.5 ml de mezcla Tween-peróxido recién preparada.
5. Observar si hay burbujas en la superficie del líquido. No descartar como negativo hasta después de 20 minutos.
6. El desarrollo de burbujas indica una prueba positiva y su ausencia, una prueba negativa. No agitar el tubo pues la presencia de detergente en la mezcla puede producir una falsa impresión de burbujas.

Interpretación

En todas las pruebas, la presencia de catalasa está indicada por la aparición de burbujas. La prueba directa es un método fácil y rápido para detectar la presencia o ausencia de catalasa, pero sólo provee una somera idea de la cantidad existente. La determinación de la catalasa termoestable es una característica muy útil para la identificación de micobacterias no pigmentadas. La catalasa termolábil es característica de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gastri* y cepas ocasionales del complejo *M. intracellulare-avium*.

La prueba semicuantitativa es útil para distinguir cepas fuertemente catalasas positivas de las que tienen pequeñas cantidades de catalasa y es particularmente valiosa para la identificación de *M. tuberculosis* INH resistente (negativo).

Una columna de burbujas de 5 a 50 mm de altura se considera débilmente positiva. Si la columna de burbujas es mayor de 50 mm, la prueba es fuertemente positiva. La ausencia de burbujas indica una prueba de catalasa negativa.

Controles

Mycobacterium kansasii para catalasa semicuantitativa fuertemente positiva y termoestable.

Mycobacterium tuberculosis H37Rv para catalasa semicuantitativa débilmente positiva y termolábil.

Mycobacterium tuberculosis resistente a la INH para catalasa semicuantitativa y directa negativa.

➤ **Hidrólisis del Tween 80**

Introducción

La capacidad de hidrolizar al Tween 80 es una característica importante para la diferenciación de las micobacterias. Con raras excepciones, las cepas que hidrolizan el Tween 80 son clínicamente insignificantes (por ejemplo, los bacilos del “agua de la canilla”, *M. gastri*, el complejo *M. terrae* y *M. triviale*), en tanto que las especies clínicamente importantes (*M. scrofulaceum* y miembros del complejo *M. intracellulare-avium*) son Tween 80 negativas.

Principio

Tween 80 es el nombre comercial del detergente monooleato de polioxietilensorbitán. Ciertas micobacterias poseen una lipasa que desdobla en Tween 80 en ácido oleico y sorbitol polioxietilado, que modifica las características ópticas de la solución, del amarillo pajizo (producido cuando la luz atraviesa la solución de Tween 80 intacta) al rosa. Si bien el indicador rojo neutro es rosado, el cambio de color no obedece a un cambio de pH, ya que el ácido oleico que se forma es neutralizado por la solución buffer. El cambio de color indica directamente la hidrólisis o destrucción de la molécula de Tween 80.

Medios y reactivos

1. Buffer de fosfatos, 0.067 M, pH 7 100 ml
61.1 ml de Na₂HPO₄ M/15 (9.47 g/l)
38.9 ml de KH₂PO₄ (9.09 g/l)
2. Tween 80 0.5 ml
3. Rojo neutro al 1%, acuoso 2.0 ml

Nota: es importante preparar la solución del rojo neutro en base a su actividad colorante. Los productos comerciales tienen con frecuencia menos del 100% de actividad. Por ejemplo, si el contenido real de colorante es de 85%, disolver 0.1 g en 85 ml de agua en lugar de 100 ml, a fin de lograr una solución al 0.1 %.

Mezclar los tres reactivos y distribuir en volúmenes de 3 a 5 ml en tubos con tapa de rosca. Se esteriliza en autoclave y conservar en el refrigerador en un envase a prueba de luz para impedir la hidrólisis espontánea. Este sustrato es estable sólo durante 2 a 4 semanas.

Técnica

1. Colocar un asa de bacilos en desarrollo activo en el sustrato Tween 80. (En razón de que el sustrato no contiene una fuente de nitrógeno, el organismo utilizado en la prueba debe ser maduro y metabólicamente activo.)
2. Incubar a 35-37°C durante 10 días.
3. Observar si hay cambio de color, primero a los 3 días y luego diariamente. (La excepción es cuando se sospecha *M. kansasii*, que puede producir una reacción positiva en 3 a 6 horas)

Interpretación

Una prueba positiva está indicada por un cambio del color del sustrato, de amarillo pajizo a rosa.

Controles

Positivo rápido: *M. kansasii*

Positivo tardío: *M. gastri*

Negativo: *M. scrofulaceum*

- Morfología colonial *M. tuberculosis*
 - Medio de Lowenstein-Jensen: Colonias típicas blancas a color crema, de aspecto rugoso a seco, que con el tiempo toman forma de coliflor. Se desarrollan en la superficie del medio y el sitio en que se implantan no cambia de color. El crecimiento es eugónico.
 - Medio de Stonebrink: Colonias generalmente de color blanco a crema, lisas a rugosas de aspecto harinoso. Por lo común no crece muy bien en este medio.
- Morfología colonial *M. bovis*
 - Medio de Lowenstein-Jensen: Colonias muy pequeñas (1.0 a 1.5 mm), translúcidas; con el tiempo toman la forma piramidal.
 - Medio de Stonebrink: Colonias generalmente pequeñas, blancas, como pezones, que suelen estar dispersas (crecimiento disgónico)

REFERENCIAS

1. Abalos P, Retamal P. 2004. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 23 (2), 583-594.
2. Pierre-Charles L, Blancou J, Chermette R, Uilenberg G. 2010. Infectious and Parasitic Diseases of livestock. 1° ed. Volumen 2. Editorial Lavoisier.1075-1096.
3. [OMS] Organización Mundial de la Salud. 2015. Tuberculosis. Nota descriptiva No. 104. Disponible: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
4. [SENASICA] Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2015. Disponible: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4367>
5. Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesselting A, Engelke E, de Kock M, Gutierrez MC, Chege GK, Victor TC, Hoal EG, van Helden PD. 2006. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex by PCR amplification of genomic regions of difference. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 10(7):818–822.
6. Singh S, Kumar M, Singh P. 2015. Evolution of M. bovis BCG Vaccine: Is Niacin Production Still a Valid Biomarker? Tuberculosis Research and Treatment. 2015; 2015:957519.
7. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. 2003. The complete genome sequence of Mycobacterium bovis. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(13):7877-82.
8. Madigan TM, Martinko MJ, Dunlap PV, Clark DP. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. Duodécima Edición Illinois, EUA: Pearson Prentice Hall
9. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. 2012. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2a ed. Wiley Blackwell.
10. Harvey RA, Nau CC, Fisher DB. 2013. Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology. 3a ed. New York, EUA.
11. [CFSPH] The Center for Food Security and Public Health. Iowa State University. 2009. Tuberculosis bovina. Disponible: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/tuberculosis_bovina.pdf

12. Alcaide FF, Esteban MJ, González MJ, Palacios GJJ. 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica. 9ª ed. España: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Disponible: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap9a.htm>
13. Jawetz E, Melnick J, Aldelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Sánchez FF. 2008. Microbiología médica. 18º ed. México. Editorial El Manual Moderno.
14. Rosário TR, Dib CC, Roxo E, Pinheiro SR, Vasconcellos SA, Benites NR. 2014. Thin layer microcolony culture associated with PCR for early identification of *Mycobacterium bovis*. *Braz J Microbiol.* 2;45(1):225-30.
15. Varello K, Pezzolato M, Mascarino D, Ingravalle F, Caramelli M, Bozzetta E. 2008. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *J Vet Diagn Invest.* 20(2):164-9.
16. Gutiérrez CMM, García MJF. 1993. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *J Comp Pathol.* 109(4):361-70.
17. Palmer MV. 2013. *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound Emerg Dis.* 60(1):1-13.
18. Sanou A, Tamagda Z, Kanyala E, Zingue D, Nouctara M, et al. 2014. *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: Epidemiologic and Genetic Links between Human and Cattle Isolates. *PLoS Negl Trop Dis* 8(10): e3142.
19. Di Marco V, Mazzone P, Capucchio MT, Boniotti MB, Aronica V, Russo M, Fiasconaro M, Cifanie N, Corneli S, Biasibetti E, Biagetti M, Pacciarini ML, Cagiola M, Pasqualif P, Marianelli C. 2012. Epidemiological Significance of the Domestic Black Pig (*Sus scrofa*) in Maintenance of Bovine Tuberculosis in Sicily. *Journal of Clinical Microbiology.* 50(4):1209-18.
20. Livingstone PG, Hancox N, Nugent G, de Lisle GW. 2015. Toward eradication: the effect of *Mycobacterium bovis* infection in wildlife on the evolution and future direction of bovine tuberculosis management in New Zealand, *New Zealand Veterinary Journal*, 23:1-15.

21. Good M, Duignan A. 2011. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Veterinary Medicine International*. 17:2011:410470:11
22. [OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2008. Tuberculosis aviar. Disponible:http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.03.06.%20Tuberculosis%20aviar.pdf
23. Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodríguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:1305–1314
24. Dean GS, Rhodes SG, Coad M, Whelan AO, Cockle PJ, Clifford DJ, Hewinson RG, Vordermeier HM. 2005. Minimum infective dose of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun*. 73(10):6467-71.
25. Rivera PS, Giménez JF. 2010. La Tuberculosis Bovina en Venezuela: patogénesis, epidemiología, respuesta inmunitaria y nuevas alternativas para el diagnóstico. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*. 11(9):1695-7504.
26. Sanou A, Tarnagda Z, Kanyala E, Zingué D, Nouctara M, et al. 2014. *Mycobacterium bovis* in Burkina Faso: Epidemiologic and Genetic Links between Human and Cattle Isolates. *PLoS Negl Trop Dis* 8(10): e3142.
27. Lugo-Villarino G, Hudrisier D, Benard A and Neyrolles O. 2013. Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas. *Front. Immun*. 3:405. doi: 10.3389/fimmu.2012.00405
28. Saunders BM1, Britton WJ. 2007. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 85(2):103-11.
29. [NOM] Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
30. Milián SF, Harrisb B, Arriaga DC, Thomsenb B, Stuberb T, González SD, Álvarez OD, Santillán FA, Morales LA, Estrada CC. 2010. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Revista México Ciencia Pecuaria* 1(4):403-415.

31. Payeur BJ, Jarnagin JL, Marquardt JG, Schaper LA, Martin BM. 1994. Métodos de Laboratorio en Micobacteriología Veterinaria para el Aislamiento e Identificación de Micobacterias. Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios Servicios de Inspección de salud en plantas y animales. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA); Ames, Iowa. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
32. Prat AC, Domínguez BJ, Ausina RV. Mycobacterium bovis. 2004. SEIM. Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. Facultat de Medicina, Universidad Autònoma de Barcelona. Disponible:<http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micobacterias/Mbovis.pdf>
33. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. 2013. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. AKMMC J 2013: 4(1): 30-36
34. Cousin DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology. 30(1): 255-258.
35. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, Van Agterveld M, Van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, Van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. Journal of Clinical Microbiology. 35(4): 907-914.
36. Kremer K, Bunschoten A, Schouls L, Van Soolinger D, Van Embden J. 2002 "SPOLIGOTYPING" a PCR-based method to simultaneously detect and type Mycobacterium tuberculosis complex bacteria. National Institute of Public Health and the Environment. 4^a ed. Bilthoven, The Netherlands.
37. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L, Vidal D, Domingo M, Gonzolez O, Rodriguez-Ferri EF, Bunschoten AE, Van Embden JD, Cousins D. 1996. Spacer oligonucleotide typing of Mycobacterium bovis strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. Journal Clinical Microbiology. 34(11):2734-40.
38. Acosta SR, Estrada CC, Milián SF. 2009. Tipificación de cepas de Mycobacterium bovis. Revisión. Genotyping methods for Mycobacterium bovis. Review Técnica Pecuaria México. 47(4):389-412

39. Haddad N, Ostyn A, Karoui C, Masselot M, Thorel MF, Hughes SL, Inwald J, Hewinson RG, Durand B. 2001. Spoligotype Diversity of Mycobacterium bovis Strains Isolated in France from 1979 to 2000. 39(10):3623-3632
40. Huard RC1, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions. J Clin Microbiol. 41(4):1637-50.
41. Charlet D, Mostowy S, Alexander D, Sit L, Wiker HG, Behr MA. 2005. Reduced expression of antigenic proteins MPB70 and MPB83 in Mycobacterium bovis BCG strains due to a start codon mutation in sigK. Molecular Microbiology. 56(5):1302-13.
42. Talarmin A (director), Sigiscar M. (director administrativo y financiero). 1993. Instituto Pasteur de Guadalupe. [Página web actualizada 2014]. Disponible:[http://www.pasteur-guadeloupe.fr/](http://www.pasteur-guadeloupe.fr)
43. Romano IM, Paolicchi F. 2012. Nuevas técnicas para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Instituto de Biotecnología, INTA Castelar. Laboratorio de Bacteriología, INTA. Balcarce. Disponible:http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Prod_Animal/Documentos/2012/Sanidad%20Ganadera/DIAGN%C3%93STICO%20de%20tuberculosis%20bovina.pdf
44. Gibson AL, Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A, Inwald J, Drobniewski FA. 2004. Molecular Epidemiology of Disease Due to Mycobacterium bovis in Humans in the United Kingdom. Journal of Clinical Microbiology. 42(1):431-434.
45. Mostowy S, Inwald J, Gordon S, et al. 2005. Revisiting the Evolution of Mycobacterium bovis. Journal of Bacteriology. 187(18):6386-6395.
46. Wiker HG. 2009. MPB70 and MPB83--major antigens of Mycobacterium bovis. Scand J Immunol. 69(6):492-9.
47. Pérez-Guerrero L, Milián SF, Arriaga DC, Romero TC, Escartín CM. 2008. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. Salud pública México, Cuernavaca. 50(4):288-291.
48. Zumárraga MJ, Martín C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta ME, Errico F, Castro RM, Cataldi A, Van soolinger D, Romano MI. 1999. Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of Mycobacterium bovis-Related Infections in South America. Journal Clinical Microbiology. 37(2):296-303.

49. Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli EA, Catozzi L, Piero NG, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JDA, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F. 2005. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Infectious Diseases*. 11(8):1242-1248.
50. Millían SF, García CL, Romero CT, Cantó AGJ, Gutierrez RJA, Gallegos SS, Mercado PM, Mejía EF, Peña CAL, Estrada CC, Pizano MO. 2012. Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* de ganado en México. *Rev Mex Cienc Pecu*. 3(4):459-471.
51. Rodwell TC, Kapasi JA, Moore M, Milian SF, Harris B, Guerrero LP, Moser K, Strathdee SA, Garfein SR. 2010. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using. Spoligotyping. *International Journal of Infectious Diseases*. 14(3):e129-e135.
52. O'Reilly LM, Daborn CJ. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber Lung Dis*. 76(1):1-46.
53. Streicher EM, Victor TC, Van der Spuy G, Sola C, Rastogi N, Helden V, Warren RM. 2007. Spoligotype Signatures in the *Mycobacterium Tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(1): 237-240
54. van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, Caimi K, Cataldi A, Hulleman A, Nagelkerke NJ, van Soolingen D. 2002 Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(12):4628-39.