



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* DE MUESTRAS DE
GANADO BOVINO DE UNA CUENCA LECHERA.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

SANDRA JAQUELINE RETIS SÁNCHEZ DE LA BARQUERA



CDMX, 31 DE ENERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Mejía Chávez Adriana Guadalupe**

VOCAL: **Profesor: Plasencia de la Parra Francisco Javier**

SECRETARIO: **Profesor: Bobadilla del Valle Judith Miriam**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Ortega Vázquez Alberto**

2° SUPLENTE: **Profesor: Plett Torres Tanya**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS
MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”**

ASESOR DEL TEMA:

JUDITH MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE

SUSTENTANTE:

RETIS SÁNCHEZ DE LA BARQUERA SANDRA JAQUELINE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 Género <i>Mycobacterium</i>	7
2.2 <i>Mycobacterium bovis</i>	8
2.3 <i>Mycobacterium bovis</i> como agente zoonótico	8
2.4 Impacto Económico	9
2.5 Tuberculosis bovina	11
2.51 Transmisión	11
2.52 Diagnóstico clínico en bovinos.....	12
2.53 Diagnóstico bacteriológico.	12
2.6 Cultivo	12
2.61 Cultivo en medio MGIT	13
2.7 Identificación del CMTB	14
2.8 Epidemiología molecular	15
2.9 Métodos de caracterización molecular	16
2.91 Análisis del Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción de la Secuencia de Inserción <i>IS6110</i> (<i>IS6110</i> -RFLP).....	16
2.92 Espoligotipificación.....	17
2.93 Análisis del Número Variable de Repeticiones en Tándem de las Unidades Repetitivas Intercaladas del genoma de las Micobacterias, MIRU-VNTR	19
2.8 Bases de datos	21
3. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	23
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos particulares	26
6. HIPÓTESIS.....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
7.1 Método	27
8. METODOLOGÍA.....	27
8.1 Recuperación de los aislados de <i>M. bovis</i>	27
8.2 Inactivación de cepas	28

8.3 Extracción de DNA	28
8.4 Cuantificación y dilución de DNA	28
8.5 Estandarización de PCR	29
8.6 Electroforesis en Gel de Agarosa	31
8.7 Electroforesis capilar	31
8.8 Interpretación de resultados	32
9. RESULTADOS	34
9.1 Extracción y cuantificación de DNA	34
9.2 Estandarización de PCR	34
9.4 Electroforesis Capilar. Análisis de Fragmentos	36
9.5 Interpretación de Resultados	41
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
11. CONCLUSIONES	51
12. REFERENCIAS	53
ANEXO A	61
ANEXO B	62
ANEXO C	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proporción de aislamientos de <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	5
Figura 2. Estatus zoonosario de México, de la Campaña Nacional contra la TBb.....	10
Figura 3. A) Representación del cromosoma de <i>M. bovis</i> B) Resultados ejemplo de la técnica RFLP- <i>IS6110</i>	17
Figura 4. Estructura del locus DR en el genoma micobacteriano.....	18
Figura 5. Ejemplo de resultado de técnica de Espoligotipificación.....	19
Figura 6. Locus de 41 MIRU identificados en el cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> con su nomenclatura.....	20
Figura 7. Algoritmo del estudio.....	33
Figura 8. Resultados de la amplificación de cada uno de los <i>loci</i> probados. Gel de agarosa al 2% con el producto de PCR de los marcadores MIRU 4, MIRU 26, MIRU 31, ETR-A y ETR-B.....	35
Figura 9. Resultados de la amplificación de cada uno de los <i>loci</i> probados. Gel de agarosa al 2% con el producto de PCR de los marcadores: Qub 11a, Qub 11b, Qub 26, Qub 3232.....	35
Figura 10. Resultados del Electroferograma del patrón MIRU-VNTR del <i>loci</i> ETR-B de las cepas control.....	37
Figura 11. Dendograma de los 132 aislados y 3 cepas control.....	42
Figura 12. Resultados del análisis del árbol de expansión mínima (MST). Resultado de los clusters formados con el espoligotipo y la técnica de MIRU-VNTR.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de medios de cultivo empleados en el aislamiento y proliferación de <i>M. bovis</i>	13
Tabla 2. Condiciones de Master mix.....	29
Tabla 3. Condiciones de Master mix marcadores Qub 11a y Qub 3232.....	30
Tabla 4. Programa de PCR empleado para la amplificación de los nueve <i>loci</i> ...30	
Tabla 5. Optimización de la concentración de MgCl ₂	34
Tabla 6. Resultados del Patrón de MIRU-VNTR de las cepas control <i>M. bovis</i> AN5, <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y <i>M. bovis</i> BCG Pasteur.....	36
Tabla 7. Patrones de MIRU-VNTR obtenidos en los 132 aislados de <i>M. bovis</i> probados.....	38
Tabla 8. Resultados de la relación entre el espoligotipo y el patrón MIRU-VNTR de los aislados de <i>M. bovis</i> probados.....	39
Tabla 9. Resultados de la Variabilidad alélica (VA).....	40
Tabla 10. Resultados de índice de Discriminación de Hunter- Gaston, para ambas técnicas.....	45
Tabla 11. Descripción de los espoligotipos detectados en las cepas aisladas de CAIT.....	61
Tabla 12. Descripción de los nueve <i>loci</i> empleados en la técnica de MIRU-VNTR.....	62
Tabla 13. Resumen de Tabla de tamaños correspondientes a cada número de repetidos de los nueve <i>loci</i> empleados en la técnica de MIRU-VNTR.....	63

ABREVIATURAS

BAAR: Bacilos Ácido Alcohol Resistentes
BCG: Bacilo de Calmette y Guerin
BSL2: Laboratorio de Bioseguridad nivel 2
BSL3: Laboratorio de Bioseguridad nivel 3
CAIT: Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca
CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
CMTB: Complejo *Mycobacterium tuberculosis*
CONETB: Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis y
Brucelosis
CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DR: Repeticiones Directas
HGDÍ: Índice de Discriminación de Hunter- Gaston
MGIT: Tubo Indicador de Crecimiento de Micobacterias
MIRU: Unidades de Repetición Intercaladas en el genoma de las Micobacterias
MST: Árbol de Expansión Mínima
M. bovis: *Mycobacterium bovis*
M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPD: Derivado Proteico Purificado
RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y
Alimentación.
SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SUIVE: Sistema Único para la Vigilancia Epidemiológica
TB: Tuberculosis
TBB: Tuberculosis Bovina
VA: Variabilidad Alélica
VISAVET: Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria
VNTR: Secuencias Repetidas en Tándem de Número Variable
Zn: Ziehl Neelsen

RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una zoonosis de distribución mundial, con serias implicaciones en salud pública, además de afectar a la industria ganadera. Es producida por *Mycobacterium bovis*, que pertenece al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) y afecta a ganado bovino y humanos. Para la detección y control de brotes epidemiológicos, se implementaron técnicas de epidemiología molecular como RFLP-*IS6110*, espoligotipificación y MIRU-VNTR. Debido a que la primera, no presenta buenos resultados para *M. bovis*, en el presente trabajo, se han empleado las dos últimas para determinar la variabilidad genética de la población de *M. bovis* del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT).

Para MIRU-VNTR, se emplearon nueve *loci*, MIRU 4, MIRU 26, MIRU31, ETR-A, ETR-B, Qub 11a, Qub 11b, Qub 26 y Qub 3232. Mientras que los resultados de espoligotipificación fueron tomados de un estudio previo realizado en el Instituto Nacional de Nutrición. Se detectaron 21 espoligotipos y 37 patrones (M1) MIRU-VNTR, 81% de los aislados formaron cluster por MIRU-VNTR.

Se detectaron espoligotipos presentes en Europa, Latinoamérica y en diversos estados de la República Mexicana, lo cual refleja la relación comercial de ganado entre estas entidades. El espoligotipo más frecuente fue SB0121 y su patrón MIRU-VNTR más frecuente (M1), se identificó en el 67.3% de sus aislados. Se observó similitud del 100% entre espoligotipo y MIRU-VNTR en: a) SB0121 con M1, b) SB0673 con M2 y c) SB0971 con M3, con estos resultados se puede inferir que existió la transmisión de *M. bovis* entre los bovinos con ambos genotipos iguales.

Los valores de variabilidad alélica (VA) de los *loci* empleados oscilaron entre 0.02 a 0.79, siendo MIRU 4 y Qub 3232 el menos y más variable respectivamente. El poder de discriminación aumentó con el empleo conjunto de técnicas a 0.90 de valores de 0.78 con espoligotipificación y 0.88 con MIRU-VNTR.

Por tanto, la combinación de estas técnicas corroboró que la cuenca lechera del CAIT presenta una alta diversidad genotípica, además de que el empleo de la espoligotipificación como técnica de escrutinio, seguida del análisis por MIRU-VNTR, aumenta la capacidad de distinguir si dos cepas están ligadas epidemiológicamente o no.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico y progresivo, causada por las micobacterias pertenecientes al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), que afecta al sistema respiratorio (85%), así como otros órganos y tejidos (ganglios linfáticos, riñones, huesos entre otros) (Hopewell et. al., 2005).

La TB se mantiene como una de las enfermedades infecciosas de mayor mortalidad en el mundo. De acuerdo con el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), una cuarta parte de la población mundial se encuentra infectada con alguno de sus agentes etiológicos (CDC, 2017).

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró 10.4 millones de enfermos en el mundo, se registraron 1.7 millones de muertes; 490 000 casos con TB multi-drogo-resistente (MDR). En México, en el año 2017, la OMS registró una tasa de incidencia de TB de 22 casos por 100 mil habitantes (WHO, 2017).

La tuberculosis bovina (TBb) es una zoonosis de distribución mundial con serias implicaciones en la salud pública. Aunque en los países desarrollados está erradicada o se encuentra en una fase avanzada de erradicación, en muchos países en vías de desarrollo es considerada como una enfermedad endémica (Hauer et. al., 2015).

Esta infección es producida por el agente etiológico *Mycobacterium bovis*, que pertenece al Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) cuyo principal hospedero es el ganado bovino, sin embargo, se ha adaptado a vivir en otras especies, como caballos, perros, gatos, liebres, y primates, incluido el humano, por ello se considera una zoonosis clásica, que se transmite entre dichas especies y al ser humano (Müller et. al., 2013).

Posterior a la infección, el riesgo de desarrollar TB activa es del 10%, con un 90% de probabilidad de mantener la infección latente (Hopewell, 2005). Se caracteriza por el desarrollo progresivo de lesiones granulomatosas específicas o tubérculos en el tejido pulmonar, los nódulos linfáticos u otros órganos, con un periodo de incubación de meses a años.

En países en vías de desarrollo, es difícil determinar la incidencia de TB humana por *M. bovis*, debido a limitaciones en el aislamiento del microorganismo y en su diferenciación con *M. tuberculosis*, puesto que las lesiones producidas por estas dos especies del CMTB, no pueden ser diferenciadas mediante la observación morfológica o histológica, por lo que la identificación de las especies se debe realizar por métodos moleculares.

En 2015, se publicó un estudio realizado en el laboratorio de microbiología clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” en donde se informó que en el periodo de 2000 a 2014, se aislaron 1,165 cepas del CMTB de muestras clínicas. Del total de los aislamientos, el 73.7% se identificó como *M. tuberculosis* y 26.2% como *M. bovis*. De manera importante, se informó que el 16.6% de los aislados de *M. bovis* produjeron tuberculosis pulmonar (Bobadilla *et. al.*, 2015).

De acuerdo con el estudio, la detección de *M. bovis* en nuestra región, se encontró que en el año 2000, *M. bovis* representaba el 7.8% de los casos detectados y para el año 2014 el porcentaje aumentó a 28.4% (Bobadilla, 2015) (Figura 1).

La infección por *M. bovis* se asocia principalmente al consumo de productos lácteos no pasteurizados, o bien, al contacto directo con animales enfermos.

La infección es más frecuente en ganado lechero debido al hacinamiento, y un mayor periodo de vida y estrés productivo. Sin embargo, los rebaños de producción cárnica pueden verse afectados con alta morbilidad si entran en contacto con animales infectados y comparten el mismo bebedero.

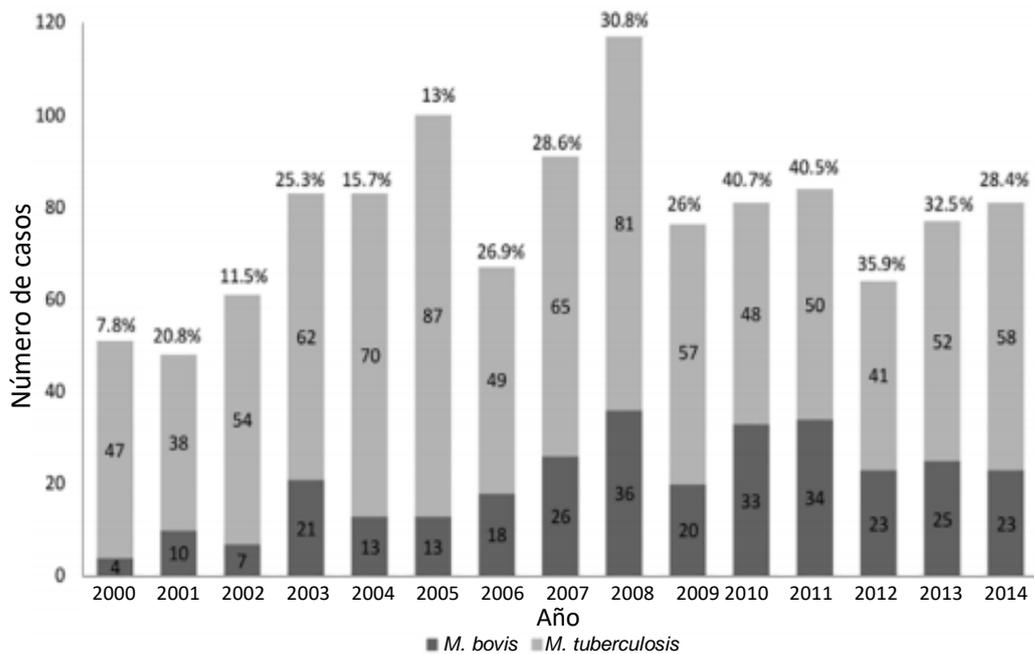


Figura 1. Proporción de aislamientos de *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Bobadilla, 2015). Se indica dentro de las columnas, el número de aislamientos de *M. bovis* y *M. tuberculosis*; arriba de las columnas se presenta el porcentaje de aislamientos de *M. bovis* detectados.

Debido a que el curso de la enfermedad es lento, un animal puede propagar la enfermedad al ganado cercano antes de mostrar signos clínicos de enfermedad. Por lo tanto, el movimiento de animales infectados pero no diagnosticados y el contacto con animales silvestres infectados son las principales formas de propagación.

En 1995 se publicó la NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, de la Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) la cual tiene como objetivo regular y establecer los procedimientos, actividades, estrategias, técnicas y características para el control y erradicación de la TBb aplicable para toda explotación pecuaria con bovinos (DOF, 1996). Actualmente, en México se reconoce el 85.77% del territorio nacional en fase de erradicación, con una prevalencia menor al 0.5% de TBb, y el 66% como zona de baja prevalencia (SENASICA, 2018).

Para comprender la distribución de enfermedades y sus factores de riesgo, se han desarrollado técnicas de epidemiología molecular que en conjunto con los métodos de epidemiología convencional, han permitido determinar el origen de brotes, establecer un vínculo entre dos o más individuos e incluso identificar la fuente de infección en humanos. Algunas de estas técnicas son *IS6110*, Espoligotipificación y MIRU-VNTR. Las cuales, han sido desarrolladas a partir del estudio de regiones polimórficas del DNA cromosomal de la bacteria (Simner et. al., 2015).

El método de MIRU-VNTR se basa en la detección de regiones polimórficas repetidas de forma consecutiva a lo largo del genoma bacteriano. La especificidad y sensibilidad reportada de esta técnica es de 100% y 97% respectivamente, lo que la equipara con la técnica de referencia *IS6110*-RFLP (Supply et. al., 2001).

Además, MIRU-VNTR proporciona ventajas sobre la técnica de tipificación de *IS6110* en la caracterización de *M. bovis* debido a que esta especie posee un número reducido de copias de *IS6110*, lo que dificulta la tipificación de esta especie a través de esta metodología. Por ello, la técnica de espoligotipificación, ha sido la técnica complementaria de elección desde la década de los 90 para los aislados del CMTB. MIRU-VNTR ha demostrado proporcionar discriminación adecuada como técnica de primera línea en combinación con la espoligotipificación (Allix et. al., 2006).

Por ello, en este estudio de tipo retrospectivo se plantea realizar la genotipificación de aislados de *M. bovis* obtenidos en la sala de necropsias del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) a lo largo del periodo de diciembre del 2009 a diciembre del 2010, mediante la técnica de MIRU- VNTR, los cuales fueron analizados previamente mediante la técnica de espoligotipificación. Esto, permitirá evaluar la variabilidad genética de las cepas de *M. bovis* en el CAIT y la capacidad de discriminación de ambas metodologías para su posterior aplicación en estudios epidemiológicos en el país (Cruz et. al., 2013).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* se encuentra dentro del phylum *Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, suborden *Corynebacteriaceae*, familia *Mycobacteriaceae* y comprende alrededor de 120 especies (Simner, 2015).

Dentro de este género se encuentra el Complejo *Mycobacterium Tuberculosis* en el cual se incluyen especies como: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. bovis* subespecie *bovis* y *M. bovis* subespecie *caprae* las cuales comparten el 99.95% de homología genética (Kubica et. al., 2003).

Son bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), aerobios estrictos, intracelulares, inmóviles, no esporulados, con una temperatura óptima de crecimiento de 37°C. Su pared celular se caracteriza por la presencia de ácidos micólicos (60%) y una amplia gama de lípidos, que le confieren un carácter hidrofóbico (Simner, 2015).

Estas bacterias son capaces de sobrevivir durante semanas o meses sobre objetos inanimados, son más resistentes a los ácidos, bases y desinfectantes que el resto de las bacterias no formadoras de esporas. Resisten la desecación y la congelación, pero pueden ser inactivadas con luz ultravioleta o aplicando tratamiento térmico (>65° C durante 30 min) (Pfyffer et. al., 2011).

En el año 2002, fue propuesto un esquema de especiación del CMTB, basado principalmente en la pérdida de regiones de diferenciación (RD) y en la aparición de polimorfismos de un solo nucleótido (single-nucleotide polymorphism, SNP), por ello, se llegó a la conclusión de que *M. bovis* evolucionó a partir de *M. tuberculosis* y durante este proceso adquirió la capacidad de infectar un mayor rango de hospederos, así como la transmisión entre ellos. (Brosch et. al., 2002).

2.2 *Mycobacterium bovis*

Mycobacterium bovis es el nombre de las cepas productoras de TBb y fue oficialmente reconocido hasta 1970 por Karlson y Lessel.

Es la especie del CMTB que cuenta con el número más amplio de hospederos. El principal grupo de animales afectados por *M. bovis* se encuentra en la familia *Bovidae* (bóvidos), subfamilia *Bovinae* (bovinos) dentro de los cuales se encuentran los bueyes, búfalos, bisontes y la subfamilia *Caprinae* (caprinos) que incluye cabras y ovejas (Malone et. al., 2003). Además, *M. bovis* ha sido aislado de otras especies como: caballos, perros, gatos, zorros, ciervos, zarigüeyas, linceos, liebres, y primates, incluido el humano.

2.3 *Mycobacterium bovis* como agente zoonótico

Poco después de que *M. bovis* fuera identificada, surgió una controversia sobre su riesgo para la salud humana. Hasta que algunos estudios mostraron que los humanos pueden ser infectados por la ingesta de leche contaminada o por la inhalación de aerosoles producidos por ganado enfermo (LoBue, 2006).

Como ejemplo, un estudio realizado en Reino Unido en 2004, indicó que el 59% de sus pacientes vivían o trabajaban en una granja, mientras en Francia en 1999 reportaron que 13 de 38 pacientes con TB presentaron exposición ocupacional e ingesta de productos lácteos no pasteurizados (LoBue, 2006).

En Estados Unidos, la TB por *M. bovis* es más común en la frontera con México. De acuerdo con un estudio realizado en San Diego (1994-2000), en 7% de los cultivos positivos analizados se aisló *M. bovis*. Además, el 90% de los cultivos provenían de pacientes hispanos nacidos en México o en EUA. Posteriormente, en 2006, analizaron pacientes pediátricos con TB cuyo único factor de riesgo detectado fue la ingesta de productos no pasteurizados provenientes de México (LoBue, 2006).

En México, SENASICA divide al país en 5 áreas protegidas por líneas federales de control fitozoosanitario, las cuales son: Norte, Centro, Sur, el Istmo y Península. En estos puntos de control, se revisa el estado de salud del ganado dependiendo del área de proveniencia (LoBue, 2006). Además, cuenta con infraestructura de primer nivel a través de los laboratorios como el Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA), cuya Infraestructura está diseñada para brindar servicios de diagnóstico de enfermedades de los animales terrestres a nivel nacional e internacional (SENASICA, 2016).

A pesar de que el ganado bovino es el principal reservorio de *M. bovis*, también la persistencia de la infección en animales salvajes los vuelve focos de transmisión y propagación de esta zoonosis. Ejemplos de esto es el tejón en Reino Unido, el venado cola blanca en ciertas partes de los Estados Unidos o la chinchilla de Adelaida en Nueva Zelanda (Naugle et al., 2014, Romero, 2012).

Por consiguiente, se requieren programas de erradicación cuyas metas sean curar a los pacientes con TB activa y detener la transmisión. Estos deben incluir la pasteurización de la leche y la realización de estudios que permitan dilucidar la incidencia y epidemiología de *M. bovis* en humanos (LoBue, 2006).

2.4 Impacto Económico

De los más de 9.5 mil millones de litros de leche que se producen en México equivalente a 3,516 millones de dólares, el 72% se pasteuriza o industrializa y el 28% se consume cruda o se transforma en derivados lácteos sin proceso térmico (DOF, 2007), lo que implica un incremento del riesgo para la salud pública.

Por otra parte, en el ganado, se estima que la TBb disminuye la producción de leche hasta un 17%, genera un 5% de disminución en la capacidad reproductiva de los rebaños, y la restricción en la venta y/o exportación de carne proveniente de animales enfermos (DOF, 2007).

En 1987, Estados Unidos y México implementaron un programa de control de TBb, durante el cual se incrementó la exportación de ganado hacia Estados Unidos con el establecimiento de requisitos mínimos necesarios para la exportación de ganado (Perera et. al., 2014).

En 2008, SENASICA en conjunto con SAGARPA, desarrollaron un programa con la industria ganadera a nivel nacional, con el fin de reducir la prevalencia de TBb a menos del 0.5% en al menos 82% del territorio mexicano (Perera, 2014). Actualmente, se reconoce el 85.77% del territorio nacional en fase de erradicación, con una prevalencia < 0.5% de TBb, y el 66% como zona de baja prevalencia con posibilidad de exportar ganado bovino castrado a EUA (SENASICA, 2019).



Figura 2. Estatus zoonosanitario de México, Campaña Nacional contra la TBb (SENASICA, 2019).

2.5 Tuberculosis bovina

La TBb es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico y progresivo, causada por *M. bovis*, que afecta a varias especies animales incluido el hombre, por lo que se considera una zoonosis. Se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en diversos órganos, que merman la condición física y productiva, causando pérdidas económicas de consideración (CFSPH, 2009).

2.51 Transmisión

En general, la dinámica de su transmisión es poco conocida, sin embargo, se considera que la exposición a aerosoles de *M. bovis*, y la ingestión de material contaminado son las rutas más frecuentes de infección del ganado. El ganado infectado siempre debe ser considerado como fuente potencial de infección, ya que se ha demostrado que una proporción significativa de bovinos con TB excretan *M. bovis* (OIE, 2008).

La principal vía de transmisión de la TBb hacia el humano es el consumo de productos lácteos no pasteurizados procedentes de vacas infectadas (TB intestinal). Los niños de zonas rurales son los más susceptibles. También puede transmitirse por vía aérea, a través de aerosoles con micobacterias excretados por animales infectados, sus principales receptores son: población que labora en proximidad a ganado y/o animales infectados, y animales salvajes o ganado que compartan alojamiento con otros animales infectados del mismo establo (CFSPH, 2009).

Existe menor proporción de transmisión, por inoculación en piel a través de alguna lesión durante la manipulación de carnes proveniente de animales infectados en el matadero, así como por retransmisión de humano hacia el ganado o bien de humano a humano por vía aérea.

2.52 Diagnóstico clínico en bovinos

El método estándar para la detección de la TBb en animales es la prueba cutánea de la TB, empleando tuberculina como antígeno. De acuerdo con la NOM-031-ZOO-1995, su diagnóstico se lleva a cabo por medio de dos pruebas con empleo de tuberculina; prueba en pliegue caudal y prueba cervical comparativa, análisis bacteriológico e histopatológico (DOF, 1996, CFSPH, 2009).

2.53 Diagnóstico bacteriológico.

El diagnóstico definitivo de TB se hace mediante el cultivo. Sin embargo, también se puede realizar la búsqueda de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), en biopsias de tejidos con lesiones sugestivas de TB con el empleo de la tinción de Auramina-Rodamina y la confirmación con la tinción de Ziehl Neelsen (ZN). Para las pruebas indirectas, se realiza el cultivo de las muestras (Pfyffer, 2011).

2.6 Cultivo

El cultivo de micobacterias se realiza en medios especiales, con una fuente de carbono como el glicerol y una de nitrógeno y otros componentes adicionales como ácido oleico, albúmina, sales inorgánicas, vitaminas y cofactores. Entre los medios más utilizados se encuentra el Lowenstein Jensen (LJ), Caldo Middlebrook 7H9, agar Middlebrook 7H10, medio Stonebrink, Caldo Dubois. *M. bovis* es glicerofóbico y presenta crecimiento disgónico en LJ, pero en Stonebrink presenta crecimiento eugónico (Pfyffer, 2011).

El medio de cultivo LJ es un medio enriquecido y selectivo debido a que está suplementado con huevo y verde de malaquita como agente inhibidor de bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas. Las condiciones de incubación empleadas son $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en atmósfera aerobia enriquecida con CO_2 , por un periodo de 56 días.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en tres tipos: Medios de agar semisintéticos, enriquecidos con huevo coagulado y líquidos. Las características de estos, se describen en la Tabla 1.

	Estado físico	Función	Características de crecimiento de <i>M. bovis</i>	Ejemplos
Semisintéticos	Sólido	Aislamiento Caracterización Susceptibilidad	Colonias pequeñas y planas.	7H10 7H11
	Líquido	Proliferación	Cúmulos que resaltan el carácter hidrofóbico de la superficie celular.	7H9
Enriquecidos con huevo coagulado	Sólido	Detección Aislamiento	Colonias pequeñas y redondas con bordes irregulares y superficie granular (crecimiento disgónico)	LJ y Stonebrink

Tabla 1. Tipos de medios de cultivo empleados en el aislamiento y proliferación de *M. bovis*

2.61 Cultivo en medio MGIT

El tubo indicador de crecimiento micobacteriano (MGIT) (Becton Dickinson, MA, USA) es un medio líquido Middlebrook 7H9 modificado, enriquecido con MGIT OADC (Ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y un inhibidor de crecimiento de contaminantes presentes en la muestra, MGIT PANTA (Polimixina B, Anfotericina B, Ácido nalidíxico, Trimetoprim y Azlocilina) (Salman, 2006).

Además, contiene un isótopo de rutenio embebido en silicona en el fondo del tubo, que fluoresce con la depleción de oxígeno. La intensidad de fluorescencia se visualiza a través de luz UV y es directamente proporcional a la depleción de oxígeno generada por el crecimiento bacteriano (Salman et. al., 2006).

La función de los componentes del medio de enriquecimiento OADC (Becton Dickinson) es la siguiente:

- **Ácido Oleico:** proporciona los ácidos grasos esenciales para la reproducción de las micobacterias.
- **Albúmina:** Protege contra agentes tóxicos, al fijar los ácidos grasos libres.
- **Dextrosa:** es una fuente de carbono.
- **Catalasa:** descompone peróxidos presentes en el medio
- **Cloruro sódico:** aporta electrolitos esenciales.
- **Citrato sódico:** al ser convertido en ácido cítrico, retiene determinados cationes inorgánicos en la solución.

Los tubos MGIT se incuban a 37°C y se monitorea la intensidad de fluorescencia en el instrumento BACTEC MGIT 960 con luz UV cada 60 min. Con un protocolo de 6 a 8 semanas (Salman, 2006).

La detección de crecimiento puede ser visualizada por la presencia de turbidez o sedimento granular pequeño en el medio. En el caso de *M. tuberculosis*, al tiempo declarado de positividad se encuentran 10⁵-10⁶ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mL de medio (Salman, 2006).

2.7 Identificación del CMTB

La identificación de los miembros de CMTB en los laboratorios de microbiología, hasta hace algunos años se realizaba mediante métodos convencionales que incluían numerosas pruebas fenotípicas como son la morfología colonial, reducción de nitratos, producción de niacina entre otras (Pfyffer, 2011).

Estas técnicas se fueron sustituyendo por técnicas moleculares como Gene Probe, basado en la hibridación de una cadena sencilla de DNA marcado con un compuesto quimioluminiscente, la cual es complementaria a RNA ribosomal del organismo lo que permite la formación de una secuencia híbrida estable de DNA-RNA que se mide en un luminómetro (Springer, 2005).

Posteriormente, se desarrolló Genotype CMTB, basado en una amplificación multiplex con primers marcados con biotina y una hibridación reversa a sondas específicas presentes en una membrana (Hain Lifescience GmbH, 2012).

Existen otras técnicas basadas en la amplificación e hibridación de secuencias génicas como lo son la región espaciadora 16S-23S de Ácido Ribonucleico ribosomal (ARNr) (Kubica, 2003), *rpoB*, asociado con resistencia a Rifampicina (Cavusoglu et. al., 2002) y *hsp65*, que codifica para una proteína presente en las micobacterias) (Saifi et. al., 2012), que ofrecen una mayor sensibilidad y especificidad en menor tiempo (Simner, 2015).

2.8 Epidemiología molecular

Se han desarrollado técnicas de epidemiología molecular para la genotipificación de *Mycobacterium tuberculosis* que en conjunto con los métodos de epidemiología convencional, han permitido, describir su evolución genética, describir el grado de similitud entre dos aislados, identificar el linaje de una cepa y conocer la dinámica de transmisión de la enfermedad. Algunas de estas técnicas son espoligotipificación, *IS6110*-RFLP y MIRU-VNTR.

Estas técnicas se basan en la detección de variaciones genéticas, producidas a partir de mutaciones puntuales o polimorfismos de nucleótido único (SNP), de inserciones o deleciones de DNA mediadas por secuencias de inserción (IS), de la variación en el número de secuencias repetidas en diferentes *loci* o de grandes deleciones de DNA que generan regiones de diferenciación (RD).

2.9 Métodos de caracterización molecular

2.91 Análisis del Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción de la Secuencia de Inserción *IS6110* (*IS6110*-RFLP)

El análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (Restriction-fragment-length polymorphism: RFLP) es la técnica considerada hasta hace poco el estándar para la genotipificación en el caso de *M. tuberculosis*. La técnica se basa en el análisis de distribución de la secuencia de inserción *IS6110* localizada en el genoma en las diferentes cepas. *IS6110*, pertenece a la familia de secuencias de inserción IS3, tienen un tamaño de 1.35 kb, es específica del CMTB (Van Embden et. al., 1993).

El análisis de distribución *IS6110* en *M. tuberculosis* se realiza mediante la digestión del DNA genómico de la bacteria con la enzima de restricción *PvuII*, seguido de la separación de los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa y la hibridación tipo Southern Blot con *IS6110*, como resultado, se obtiene un patrón de bandas que equivalen al número de copias de *IS6110* (Fernández et. al., 2014).

Los aislados de pacientes infectados con cepas no relacionadas epidemiológicamente tienen diferentes patrones de RFLP mientras que los pacientes con cepas relacionadas epidemiológicamente tienen patrones idénticos. Sin embargo, las cepas con menos de seis inserciones de *IS6110* tienen un polimorfismo limitado y su genotipificación requiere de métodos de genotipificación suplementarios (Van Embden, 1993).

En la figura 3 se representan las regiones *IS6110* (rojo) en el genoma de un aislado clínico de *M. bovis*, la sonda utilizada en Southern Blotting de *IS6110* (verde) y con flechas se señalan los sitios de restricción de *PvuII*. Además, se presenta como ejemplo el patrón de bandeo de dos cepas sin vínculo epidemiológico (A y B).

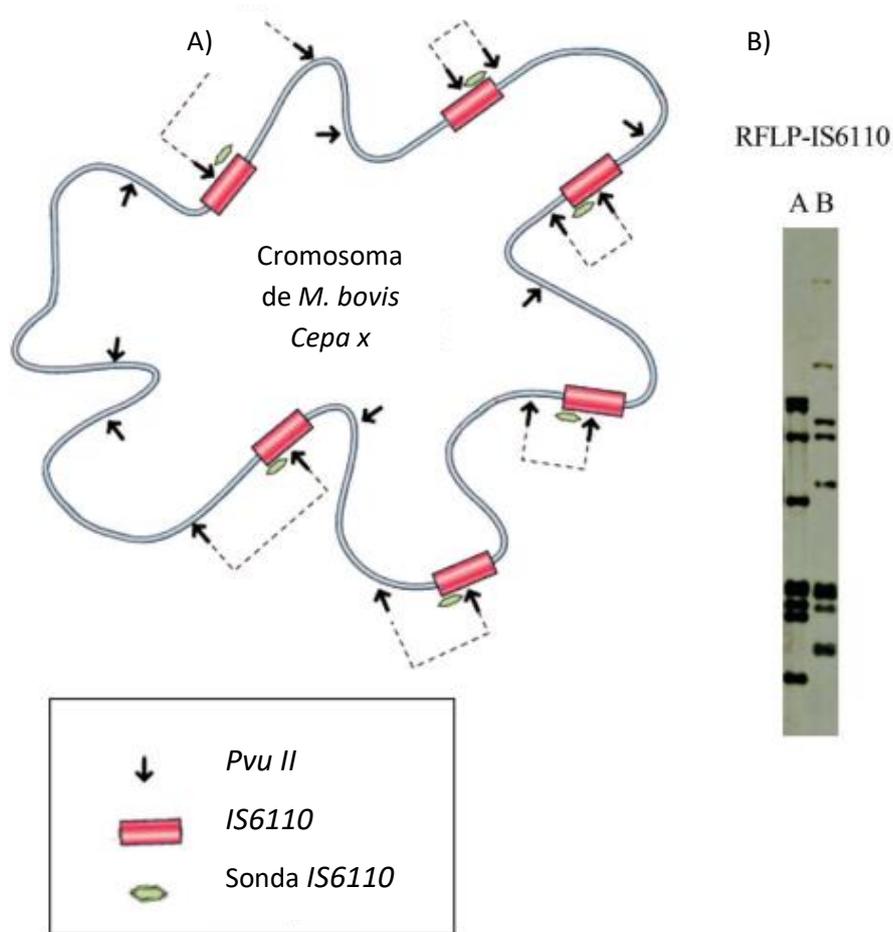


Figura 3. A) Representación del cromosoma de *M. bovis* con las regiones *IS6110*, sitios de restricción de *PvuII* y sonda de *IS6110*. B) Resultados ejemplo de la técnica RFLP-*IS6110*.

2.92 Espoligotipificación

La espoligotipificación, es un método basado en la detección de regiones de repetición del locus DR localizados en secuencias denominadas espaciadoras.

Este locus es específico del CMTB y está formado por dos tipos de secuencias cortas: la secuencias de Repetición Directa (Direct Repeats, DR) de 36 pb de tamaño, que son idénticas, y las Secuencias Espaciadoras de 35 y 41 pb de longitud (Groenen et. al., 1993), que se intercalan con las primeras como se muestra en la figura 4.

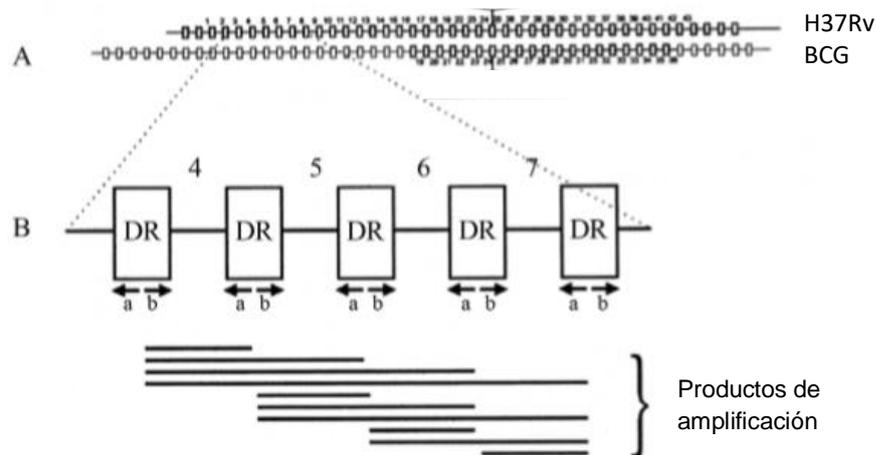


Figura 4. Estructura del locus DR en el genoma micobacteriano. A) Múltiples secuencias DR de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (rectángulos) se intercalan con secuencias espaciadoras, B) Productos de la amplificación in vitro de la región DR, compuesta por fragmentos de diferente tamaño (Fernández, 2014).

Al comparar las regiones DR de varios aislados, se puede observar polimorfismos debidos a deleciones o inserciones, característica que permite determinar la similitud genética entre una cepa y otra (Fernández, 2014).

La técnica se basa en la amplificación de las secuencias espaciadoras empleando un par de oligonucleótidos específicos de los extremos de las regiones DR mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), posteriormente se realiza hibridación inversa en una membrana con una matriz de 43 oligonucleótidos. La presencia de un espaciador se visualiza con la presencia de una señal en la membrana, producto de la hibridación (Goguet de la Salmoliere et. al., 1997) (Figura 5).

El resultado puede ser reportado en un formato de 8 números (Código octal), Código binario o se le puede asignar un nombre a través de la página www.mbovis.org, lo cual facilita la comparación entre laboratorios (VISAVET, 2019).

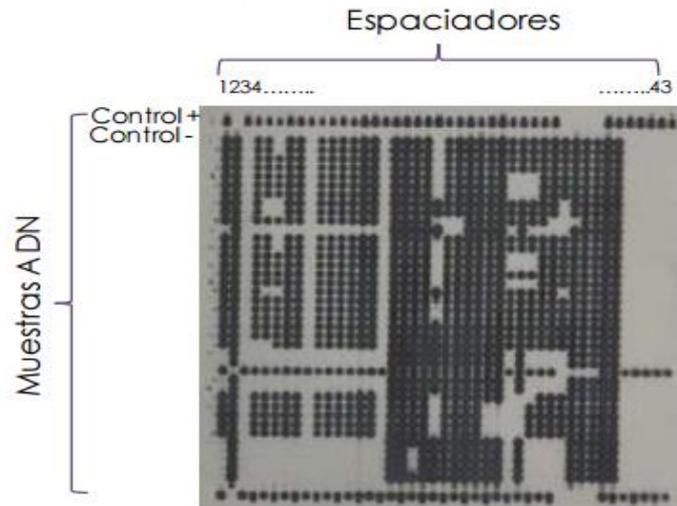


Figura 5. Ejemplo de resultado de técnica de espigotipificación. Control positivo: *M. tuberculosis* H37Rv, Control negativo: Agua destilada

2.93 Análisis del Número Variable de Repeticiones en Tándem de las Unidades Repetitivas Intercaladas del genoma de las Micobacterias, MIRU-VNTR

El genoma de *M. tuberculosis* contiene una gran cantidad de unidades repetitivas dispersas por todo el genoma, algunas contienen unidades repetitivas idénticas y algunas otras tienen variación discreta en su secuencia y longitud.

La mayoría de las Repeticiones en Tándem de Número Variable (VNTR) encontrados en el genoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, corresponden con las Unidades de Repetición Intercaladas en el genoma de las Micobacterias (MIRU), que son minisatélites compuestos por secuencias de un tamaño entre 40-120 pb, distribuidos en 41 localizaciones del cromosoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 6) (Supply et. al., 2000).

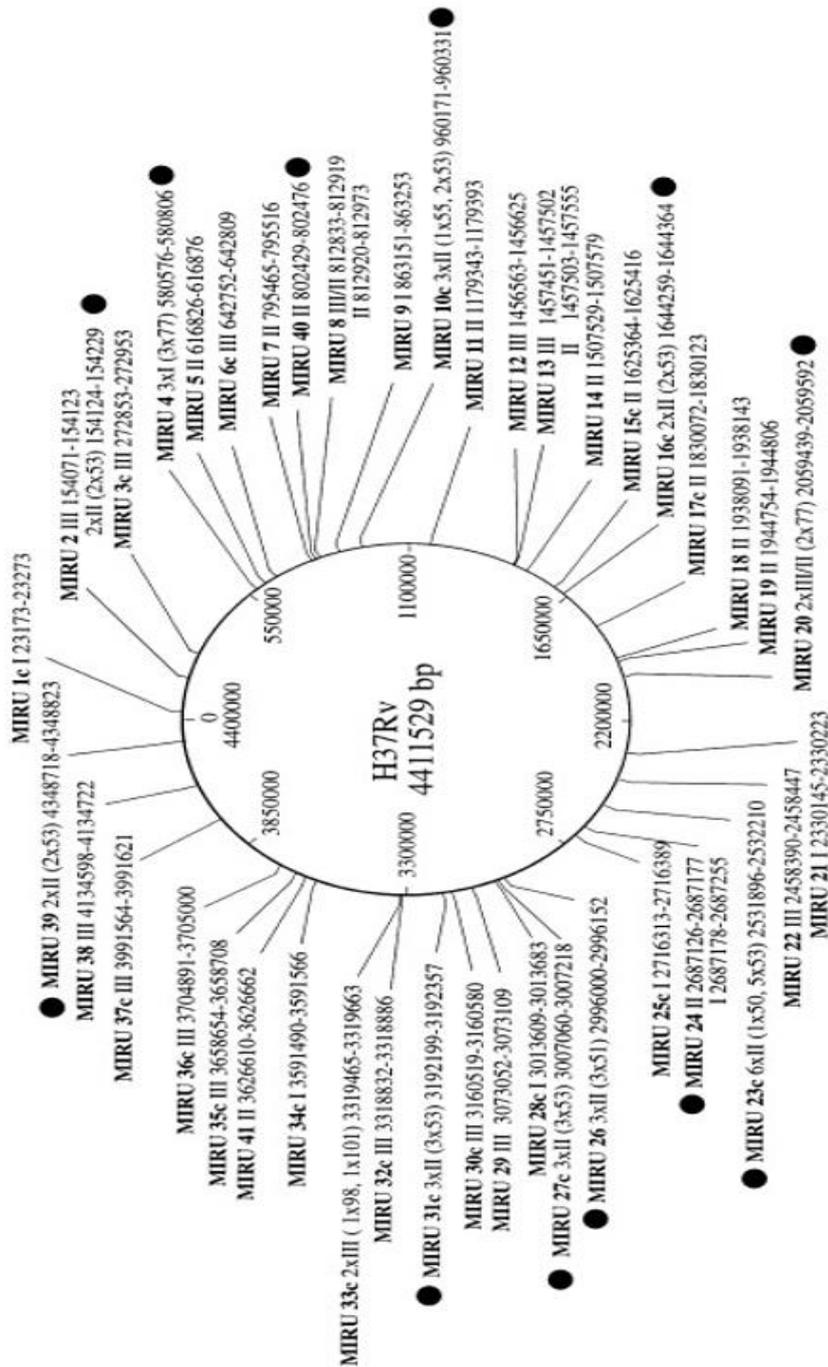


Figura 6. Locus de 41 MIRU identificados en el cromosoma de *M. tuberculosis* con su nomenclatura (Supply, 2000).

La genotipificación mediante el análisis de MIRU-VNTR categoriza el número y tamaño de las unidades repetitivas de 12 a 24 *loci* independientes con el uso de PCR seguida de electroforesis y permite determinar el grado de relación entre aislados y por tanto, el vínculo epidemiológico dependiendo del número de copias de cada una de las secuencias empleadas como marcadores.

Para el análisis de resultados, se emplean tablas que proceden de estudios realizados previamente, una de ellas, se puede encontrar en www.miru-vntrplus.org, estas se basan en el tamaño de las repeticiones parciales de cada *loci* (Supply et. al., 2006), posteriormente los datos pueden ser fácilmente catalogados en una base de datos electrónica.

La Universidad Complutense de Madrid a través del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) ha sugerido el uso de 9 *loci* (MIRU 4, MIRU 26, MIRU 31, ETR-A, ETR-B, Qub 11a, Qub 11b, Qub 26 y Qub 3232), a los que se puede sumar una selección de marcadores adicionales dependiendo de la localización geográfica del estudio (www.visavet.es/mycodb/).

El uso de esta técnica como primera línea de tipificación, en combinación con la espoligotipificación, proporciona una discriminación adecuada en la mayoría de los casos analizados. Esta técnica posee la ventaja de que el análisis puede ser automatizado, reproducible y comparable entre laboratorios, sin embargo, para la genotipificación de *M. bovis* ha sido realizada en escasos estudios en diversos países con fines epidemiológicos, con variaciones en el número y tipo de marcadores, lo que lo hace incomparable entre estudios.

2.8 Bases de datos

El registro de la información obtenida a partir de estudios de epidemiología molecular es esencial para el estudio de la enfermedad en cuestión, puesto que aporta herramientas para establecer relaciones entre brotes, así como su distribución a mayor escala. Para ello, se han creado varias bases de datos de carácter nacional o internacional (Zendejas, 2009).

La base de datos internacional MIRU-VNTRplus, permite el análisis de datos de espoligotipo, MIRU-VNTR, RDs, SNPs entre otros para la identificación filogenética y/o genotipado del CMTB (Allix, 2006). En ella, se han podido realizar estudios de poblaciones y epidemiológicos del CMTB a nivel mundial. Sin embargo, su utilidad en Sanidad Animal es limitada puesto que se basa en aislados humanos, principalmente de *M. tuberculosis*.

En 2003, se diseñó la base de datos de www.mbovis.org, administrada por Noel Smith y Rainer Hilscher y se alojó en los servidores de la Universidad de Sussex, Reino Unido. Actualmente, es gestionada por el Centro de Vigilancia Sanitaria (VISA-VET) de la Universidad Complutense de Madrid, con el objetivo de establecer una referencia internacional y estandarizar la nomenclatura del espoligotipo para especies del CMTB sin la región RD9, de: *M. bovis*, *M. caprae*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. pinnipedii* (VISA-VET, 2019).

A cada perfil se le asigna un nombre conformado por las letras SB (S: Espoligotipo, B: *M. bovis*), seguido de 4 números (SBXXXX). Además se indican códigos binarios, hexadecimales y octales de los patrones de espoligotipo descritos (Zendejas, 2009).

3. ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

La implementación de técnicas moleculares para la genotipificación de *M. tuberculosis* en la década de los 90s, permitió el avance en el entendimiento de la transmisión de la TB. La espoligotipificación, ha sido la técnica complementaria de elección al análisis de RFLP-*IS6110*, para los aislados de CMTB en Salud Pública.

Sin embargo, debido a la deficiencia de *IS6110*-RFLP en la genotipificación de *M. bovis*, la espoligotipificación es la técnica de elección para la realización de estudios de epidemiología molecular.

Para complementar la genotipificación de micobacterias del CMTB, se han realizado diversos estudios principalmente para estandarizar el número de *loci* MIRU-VNTR a emplear, de acuerdo con las necesidades de la población de estudio.

En 2001 se demostró que la especificidad de la técnica de MIRU-VNTR es del 100%, a partir de un estudio en 100 cepas de micobacterias (90 CMTB y 10 no CMTB) con el empleo de 12 *loci* (Supply, 2001). Posteriormente, se sugirió un lote de 24 *loci* MIRU-VNTRs para mejorar la discriminación cepas del CMTB, con base en los resultados del análisis de 824 aislados (Supply, 2006).

Sin embargo, los estudios realizados con aislados de *M. bovis* con fines epidemiológicos a través de esta técnica son escasos, por lo cual no se tienen definidos los *loci*, ni el número de estos emplear.

Por ello, el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid, recomienda los siguientes *loci*: MIRU 4, MIRU 26, MIRU 31, ETR-A, ETR-B, Qub 11a, Qub 11b, Qub 26 y Qub 3232, para la genotipificación de *M. bovis* (www.visavet.es/mycobdb/).

El tiempo necesario para que los marcadores empleados en la técnica cambien, tampoco está descrito, lo cual permitiría jerarquizar los *loci* de acuerdo a la importancia en la detección de un cambio presente en uno de los alelos. La falta de estandarización de número y tipo de *loci* por estudio, ha impedido la comparación de los aislados entre las distintas publicaciones.

Como se indicó previamente, esta técnica ha dado buenos resultados como técnica de primera línea en combinación con la espoligotipificación, la cual fue probada en un estudio previo, para la genotipificación de 154 cepas de *M. bovis* aisladas del CAIT en el periodo de Diciembre de 2009 a Diciembre de 2010 (Cruz, 2013).

Los resultados del estudio mostraron la existencia de una población muy diversa, puesto que se identificaron 22 espoligotipos diferentes, de los cuales 19 ya han sido reportados y se les ha asignado un nombre internacional en la base de datos internacional de www.mbovis.org (Cruz, 2013)

En cuanto a la técnica de MIRU-VNTR empleada en la genotipificación de *M. bovis*, un estudio realizado en Baja California se emplearon 9 marcadores de MIRU-VNTR de los loci, ETR-A, ETR-B, MIRU 4, MIRU 26, MIRU 31, Qub 11a, Qub 11b, Qub 26 y Qub 3232, mismos que son recomendados por el VISAVET (Laniado et. al., 2014).

4. JUSTIFICACIÓN

La TBb es una zoonosis que representa un problema de salud pública. Además, en países en vías de desarrollo, afecta a la industria ganadera al generar barreras comerciales y reduce la producción del ganado lechero. Por ello, es importante desarrollar herramientas de genotipificación, que promuevan modificaciones en la regulación y control de esta (Andrievskaia et. al., 2018).

En las últimas décadas, se han empleado ampliamente métodos basados en PCR como la espiligotipificación y MIRU-VNTR, las cuales han demostrado ser herramientas útiles para obtener información epidemiológica en aislados de *M. bovis*, que permite detectar brotes de TBb y de esta manera controlar la enfermedad (Fernández, 2014).

La comparación entre estudios, se ve limitada por el empleo de diferentes tipos y número de marcadores (*loci*) para el análisis de *M. bovis*, lo que dificulta la comprensión del comportamiento y distribución epidemiológica de TBb a nivel nacional y mundial.

Por ello, es importante la estandarización del número y tipo de *loci* a emplear en la técnica de MIRU-VNTR para poder establecer vínculos epidemiológicos entre los casos detectados en diferentes poblaciones.

Por otra parte, se debe evaluar el poder de discriminación a través del Índice de Discriminación de Hunter-Gaston (HDGI) de MIRU-VNTR y la espiligotipificación empleadas individualmente y en conjunto sobre una misma población, para establecer la importancia de cada una de ellas en el estudio epidemiológico de la TBb en el país (Mokrousov, 2017), lo cual es esencial para en el control de brotes epidemiológicos, así como la vigilancia de esta y la creación de programas que conduzcan a la erradicación de la enfermedad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la diversidad genética de los aislados de *M. bovis* provenientes de ganado lechero, del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT) mediante los métodos de espoligotipificación y MIRU-VNTR.

5.2 Objetivos particulares

- a) Realizar el cultivo y extracción de DNA de las cepas problema y control.
- b) Estandarizar las condiciones de amplificación de 9 *loci* MIRU-VNTR seleccionados mediante electroforesis capilar.
- c) Realizar la tipificación de los aislados de *M. bovis* con el método de MIRU-VNTR con los 9 loci seleccionados por electroforesis capilar
- d) Describir la diversidad genética de *M. bovis* en el CAIT, por Espoligotipo
- e) Describir la diversidad genética de *M. bovis* en el CAIT por MIRU-VNTR
- f) Realizar el análisis de la diversidad genética de los aislados de *M. bovis*, por MIRU-VNTR y espoligotipificación en el software BioNumerics 7.0
- g) Analizar cuál de los métodos de tipificación tiene mejor índice de discriminación.

6. HIPÓTESIS

La tipificación de los aislados de *M. bovis* mediante la técnica MIRU-VNTR mejorará la discriminación para determinar cadenas de transmisión en el CAIT.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Método

Diseño del estudio: retrospectivo y experimental.

Población de estudio: 132 aislados de *M. bovis*, almacenados en el cepario del laboratorio de microbiología del INCMNSZ y obtenidos en el período de 2009 a diciembre de 2010.

8. METODOLOGÍA

8.1 Recuperación de los aislados de *M. bovis*

Todos los procedimientos se realizaron en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 3.

Se descongeló una alícuota de cada aislado almacenado a -70°C , se tomaron 0.5 mL de cada cepa y se inocularon en medio líquido MGIT enriquecido con 0.8 mL enriquecimiento BBL MGIT OADC + BBL PANTA PLUS (Becton Dickinson, NJ EUA) y se incubaron en el instrumento BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson) a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta ser registrado como positivo por el instrumento durante un periodo máximo de 56 días.

Una vez positivo el cultivo, se tomaron 0.5 mL del tubo MGIT y se transfirieron a un frasco para cultivo celular con 20 mL de caldo Middlebrook 7H9 sin glicerol, enriquecido con 0.8 mL BBL MGIT OADC + BBL PANTA PLUS. Se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con 7.5% de CO_2 por un periodo de tres a cinco semanas.

Para corroborar la pureza de la cepa, se sembró por estría recta, cada una de ellas en Gelosa Sangre de Carnero y se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ con 7.5% de CO_2 por un periodo de 48 h. En caso de haber presentado desarrollo colonial, se realizó un frotis y tinción de ZN para observar el tipo de contaminación y determinar si se le aplicaría un método de descontaminación (contaminación bacteriana) con N-acetil cisteína/ NaOH (método Kubica), o se debía descongelar otra alícuota por contaminación micótica.

8.2 Inactivación de cepas

Una vez que los cultivos presentaron un desarrollo adecuado de la cepa, se traspasaron 0.5 mL de la cepa a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se centrifugaron a 13,000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante y se añadieron 400 µL de Buffer TE 1x. Posteriormente se inactivaron por calor a 100°C por 20 min.

Una vez inactivadas las micobacterias, se extrajo el DNA en el Laboratorio de Bioseguridad Nivel 2 (BSL2).

8.3 Extracción de DNA

A cada tubo de micobacterias inactivadas se agregaron 50 µL de lisozima (20 mg/mL) y se incubaron toda la noche a (35 ± 2) °C. Se agregaron 72.5 µL de SDS al 10%, 2.5 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubaron por 10 min a 65°C. Se adicionaron 100 µL de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y de NaCl 5M se incubaron 10 min de 65°C. Se realizaron 2 lavados con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugaron a 11,000 rpm por 8 min.

Para precipitar el DNA, se añadieron 500 µL de isopropanol grado BM y se incubaron por al menos 30 min a -20°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras a 11,000 rpm por 15 min. Se realizó un lavado de DNA con etanol al 70%, se eliminó el sobrenadante, se evaporó el residuo y posteriormente se resuspendió en 50 µL de agua milli-Q.

8.4 Cuantificación y dilución de DNA

Se cuantificó el DNA y se verificó su pureza a través del resultado de la correlación de absorbancia 260/280 nm en un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Se tomó como criterio de aceptación de pureza una proporción mayor o igual a 1.80

Se realizaron los cálculos para preparar 50 μL de la dilución más concentrada [15-20 $\text{ng}/\mu\text{L}$] y a partir de esta se prepararon 50 μL de las diluciones [1-4 $\text{ng}/\mu\text{L}$] de cada aislado.

Una vez aceptado el resultado de pureza, se realizaron las diluciones y para corroborar que la concentración se encontrara dentro de los valores establecidos se determinó la concentración de las diluciones en el NanoDrop 1000 y se ajustaron entre 1-4 ng/mL .

8.5 Estandarización de PCR

El Master Mix de PCR se preparó utilizando el kit Hot StartTaq DNA polimerasa (QIAGEN, Hilden, Alemania). La secuencia y los oligonucleótidos, marcados con fluorocromo (VIC, FAM o NED) se presentan en la Tabla 11 del Anexo 1.

Para establecer la concentración apropiada de Cloruro de Magnesio (MgCl_2) se realizaron curvas de MgCl_2 con las cepas control, en las cuales se probaron 4 concentraciones finales, que fueron 1.5 μM , 2 μM , 2.5 μM y 3 μM , excepto Qub 26 para el cual se añadió la concentración 1 μM .

En la Tabla 2 se describen las condiciones del Master Mix para una muestra, empleadas para la estandarización de la PCR de los *loci*: MIRU 4, MIRU26, MIRU31, ETR-A, ETR-B, Qub11b y Qub 26.

Reactivo	[Reactivo _i]	V (μL)	[Reactivo _F]
Buffer	10x	2,5	1x
Solución Q	5x	5	1x
dNTPs	500 μM	1	20 μM
Taq	5 $\text{u}/\mu\text{L}$	0,2	0.2 $\text{u}/\mu\text{L}$
DMSO	100%	2,5	10%
MgCl_2	50 mM	-----*	(1,1.5,2,2.5 o 3) μM
Oligonucleótidos	10 μM	1	0.4 μM
Volumen final	25 μL		

Tabla 2. Condiciones de Master mix

Para los marcadores (*loci*) Qub 11a y Qub 3232, se realizaron las siguientes modificaciones del Master Mix debido a que la amplificación se observó muy pobre. Se retiró el DMSO de la mezcla de PCR y se comparó con la amplificación con DMSO empleando la concentración de MgCl₂ seleccionada a partir de la curva de MgCl₂. En la Tabla 3 se presentan las condiciones del Master Mix empleado para dichos marcadores.

Reactivo	[Reactivo _i]	V (μL)	[Reactivo _F]
Buffer	10x	2,5	1x
Solución Q	5x	5	1x
dNTPs	500 μM	1	20 μM
Taq	5 u/μL	0,2	0.2 u/ μL
MgCl ₂	50 mM		1.5 μM
Oligonucleótidos	10 μM	1	0.4 μM
Volumen final	22.5 μL		

Tabla 3. Master mix marcadores Qub 11a y Qub 3232.

A partir de las condiciones estandarizadas se realizaron los cálculos para preparar el Master Mix, dependiendo del número de muestras a preparar. Una vez listo, se mezclaron 22.5 μL del Master Mix y 2.5 μL de DNA y se amplificaron los *loci* en un termociclador (Veriti, Applied Biosystems, CA, USA) con el programa de PCR presentado en la Tabla 4.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	# Ciclos
1 Desnaturalización	95	15 min	1
2 Hibridación	94	30 s	30
	55	1 min	
	72	1:30 min	
3 Extensión	72	10 min	1
4 Refrigeración	4	∞	-----

Tabla 4. Programa de PCR empleado para la amplificación de los nueve *loci* (Supply, 2001).

Una vez estandarizadas las condiciones de PCR con los controles, se procedió a realizar la amplificación de las cepas con los nueve marcadores (*loci*).

Se incluyeron en todos los experimentos las cepas control: *M. tuberculosis* (H37Rv), *M. bovis* (AN5), *M. bovis* BCG (BCG Pasteur).

8.6 Electroforesis en Gel de Agarosa

Para verificar los resultados de las amplificaciones, tanto de las curvas de estandarización de MgCl₂ como de las concentraciones de DNA de los aislados de *M. bovis* y de las cepas control, se sometieron los productos de amplificación a electroforesis en gel de agarosa.

Los geles de agarosa se prepararon con Agarosa NuSieve™ GTG™ (Lonza, Valais Suiza) al 2% y se le adicionaron 15 µL SYBR Safe DNA Gel Stain [100x] para la visualización del DNA.

Se colocaron en una cámara de electroforesis, se cargaron 10-15 µL de producto de PCR con 1.5- 2.0 µL Buffer de carga 1X, se cargaron 2 pozos con marcador de peso molecular de 100 pb (Trackit 100 pb DNA ladder, Invitrogen, CA, USA) a los extremos del gel y se aplicaron 100 Volts por 1 hora.

Para evaluar los resultados, se reveló el gel, en una cámara de UV (KODAK Gel Logic 1500, Fisher scientific, MA, USA) y posteriormente se comparó con la Tabla del anexo C, para obtener con ayuda de las dos aplicaciones del marcador de peso molecular, el tamaño del alelo y el número de repetidos de cada marcador por aislado.

8.7 Electroforesis capilar

Se preparó una mezcla de 9 µL de Hi-Di™ Formamide y 0.5 µL de GeneScan™ – 1200 LIZ Size Standar por muestra, se alicuotaron 9.5 µL por pozo en una placa de 96 pozos. Posteriormente se adicionaron 0.5- 1.0 µL de producto de PCR dependiendo del marcador.

Se centrifugó la placa a 2000 rpm por 1 min, se desnaturalizaron las muestras a 95°C en un termociclador (Veriti, Applied Biosystems) por 5 min. Posteriormente, se colocó la placa dentro de un cartucho y se introdujo en el secuenciador (Genetic Analyzer 3500, AB, CA, USA), para realizar el análisis de fragmentos a través de electroforesis capilar. Para ello se empleó polímero POP-7™ y un capilar de 50 cm.

8.8 Interpretación de resultados

Una vez concluido el ensayo, se analizaron los resultados en el programa GeneMapper 4.1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Se estableció como método de análisis "Microsatellite Default" y se determinó el tamaño de los fragmentos con base en los espectros resultantes, al comparar con la tabla presentada en el Anexo C, resumida de la página web www.miru-vntrplus.org

Una vez obtenidos los patrones MIRU-VNTR se analizaron en conjunto con los datos de espoligotipo en el software BioNumerics v.7.0 (Applied Maths NV, BE), donde se generó un árbol de Expansión Mínima (MST) y un dendograma que permitieron observar la distribución de la población estudiada.

Por último se evaluó la Variabilidad Alélica (VA) de cada loci analizado y el Índice de Discriminación de Hunter- Gaston (HGDI) para cada técnica y en conjunto, con el empleo de la siguiente fórmula:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

Donde N es el número de cepas que conforman la población, s los grupos formados a partir del patrón de MIRU- VNTR obtenido, y n_j el número de cepas que conforman cada uno de los grupos formados. Con base, en estos resultados se calcularon los HDGI de cada método en conjunto (Figura 20).

A continuación, se presenta un resumen del algoritmo del estudio (Figura 7).

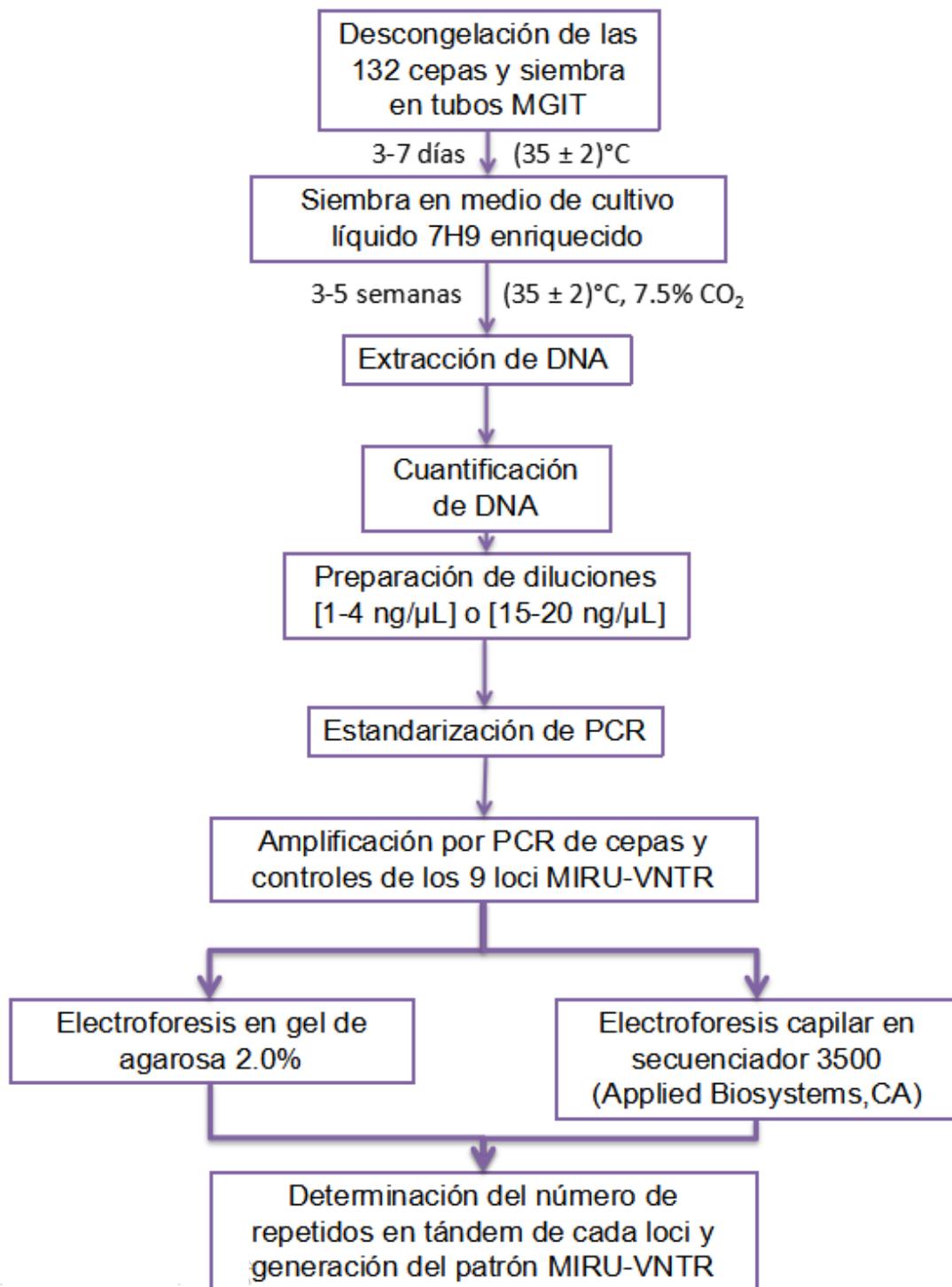


Figura 7. Algoritmo del estudio

9. RESULTADOS

9.1 Extracción y cuantificación de DNA

Se obtuvo el DNA de 132 aislados de *M. bovis*. La calidad calculada del DNA, con respecto a la relación 260/280 nm de cada aislado, fue \geq de 1.80.

9.2 Estandarización de PCR

Se determinaron las concentraciones de $MgCl_2$ adecuadas para la amplificación cada uno de los *loci* probados, la cuales se presentan en la Tabla 5.

Locus	Alias	[MgCl₂] (mM)
MIRU 4	VNTR 580 ETR- D	2.5
MIRU 26	VNTR 2996	2
MIRU 31	VNTR 3192 ETR- E	3
ETR-A	VNTR 2165	2.5
ETR- B	VNTR 2461	2.5
Qub 11a	VNTR 2163a	1.5
Qub 11b	VNTR 2163b	2.5
Qub 26	VNTR 4052	1.0
Qub 3232	VNTR 3232	1.5

Tabla 5. Optimización de la concentración de $MgCl_2$. Concentración seleccionada para la amplificación de cada *loci*.

En las figuras 8 y 9 se observan los geles de agarosa con los productos amplificados de las cepas control con cada uno de los *loci* probados en las condiciones de PCR estandarizadas.

Se observa la ausencia de bandeo inespecífico, lo cual es necesario para determinar el tamaño de la banda en electroforesis en gel de agarosa, y asegurar que las condiciones de amplificación para cada marcador es la adecuada para analizar por electroforesis capilar.

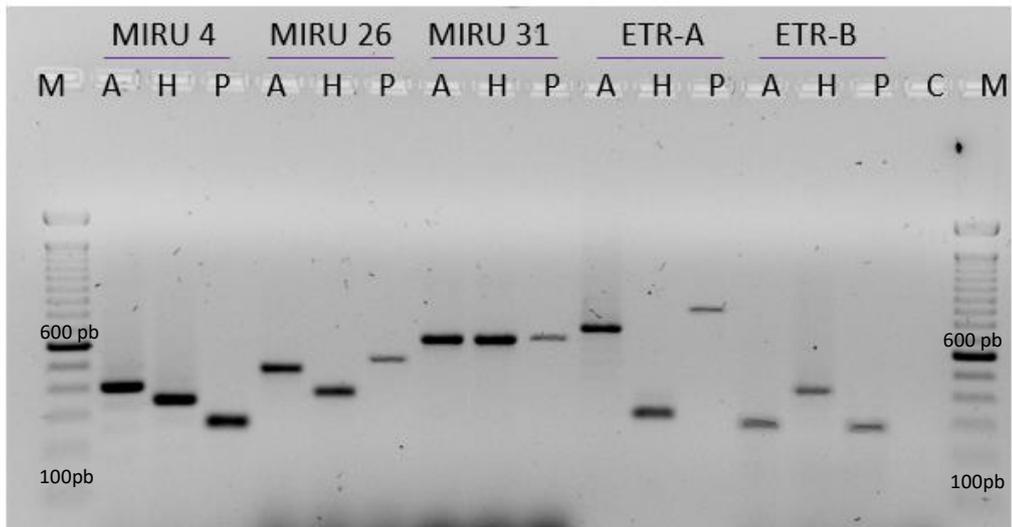


Figura 8. Resultados de la amplificación de cada uno de los *loci* probados. Gel de agarosa al 2% con el producto de PCR de los marcadores MIRU 4, MIRU 26, MIRU 31, ETR-A Y ETR-B. Carril M; Marcador de Peso molecular de 100pb A: cepa control *M. bovis* AN5, P: cepa *M. bovis* BCG Pasteur, H: cepa *M. tuberculosis* H37Rv, C: control negativo con agua

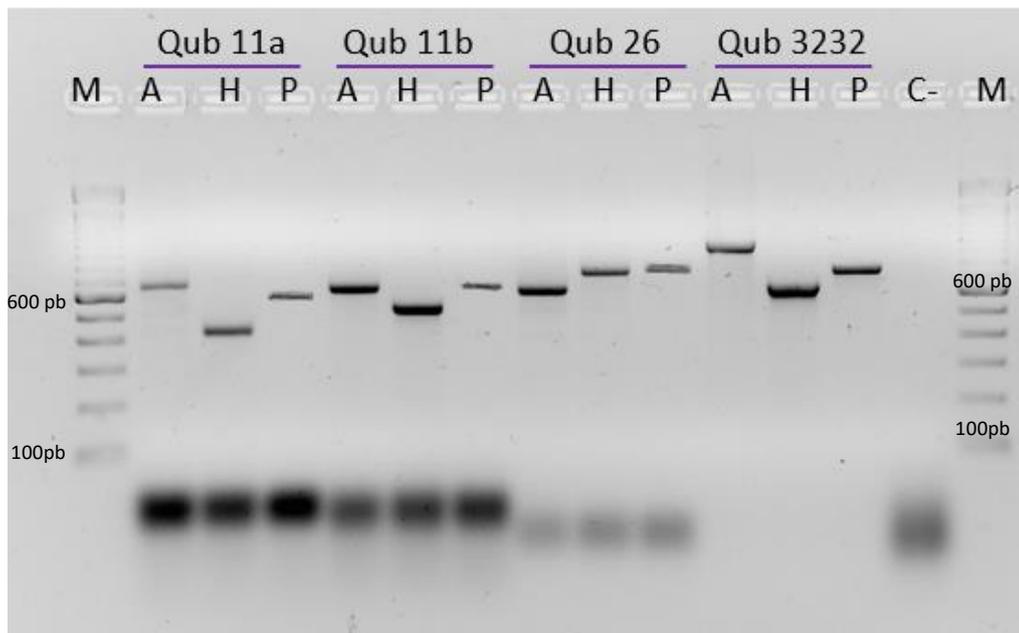


Figura 9. Resultados de la amplificación de cada uno de los *loci* probados. Gel de agarosa al 2% con el producto de PCR de los marcadores: Qub 11a, Qub 11b, Qub 26, Qub 3232. Carril: M Marcador de Peso molecular de 100 pb A: cepa control *M. bovis* AN5, P: cepa *M. bovis* BCG Pasteur, H: cepa *M. tuberculosis* H37Rv, C: control negativo con agua

Para determinar el número de repetidos (tamaño de la banda) de cada marcador MIRU- VNTR, se estimó el número de pares de bases con el marcador de peso molecular y posteriormente se compararon con los observados en la Tabla 13 del Anexo C. Con esta Tabla se generó el patrón MIRU-VNTR de cada una de las cepas control, los cuales se presentan en la Tabla 6. Se obtuvo reproducibilidad del 100% en las tres cepas control. El número de repetidos en tándem obtenido de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG Pasteur, con los descritos en la literatura (Ghielmetti, 2017).

Cepa	MIRU 4	MIRU 26	MIRU 31	ETR- A	ETR- B	Qub 11a	Qub 11b	Qub 26	Qub 3232
<i>M. bovis</i> AN5	3	4	3	6	5	8	3	4	9
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3'	3	3	3	3	2	5	5	5
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	2'	5	3	5	5	10	3	5	3

Tabla 6. Resultados del Patrón de MIRU-VNTR de las cepas control *M. bovis* AN5, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur. Cada número indica el número de repetidos en tándem de los nueve *loci* analizados.

9.4 Electroforesis Capilar. Análisis de Fragmentos

Se analizaron los nueve *loci* MIRU-VNTR de cada uno de los aislados y cepas control por electroforesis capilar y se obtuvo su tamaño. En la Figura 11, se presenta como ejemplo los electroferogramas de las cepas control con el marcador ETR-B.

En cada electroferograma se observa un pico cuyo tamaño en pares de bases corresponde con la escala numérica superior, este dato numérico se empleó para determinar el número de repetidos en tándem con ayuda de la Tabla 13 del Anexo C. Se seleccionó el número de repetidos con el valor más cercano al determinado por electroforesis capilar.

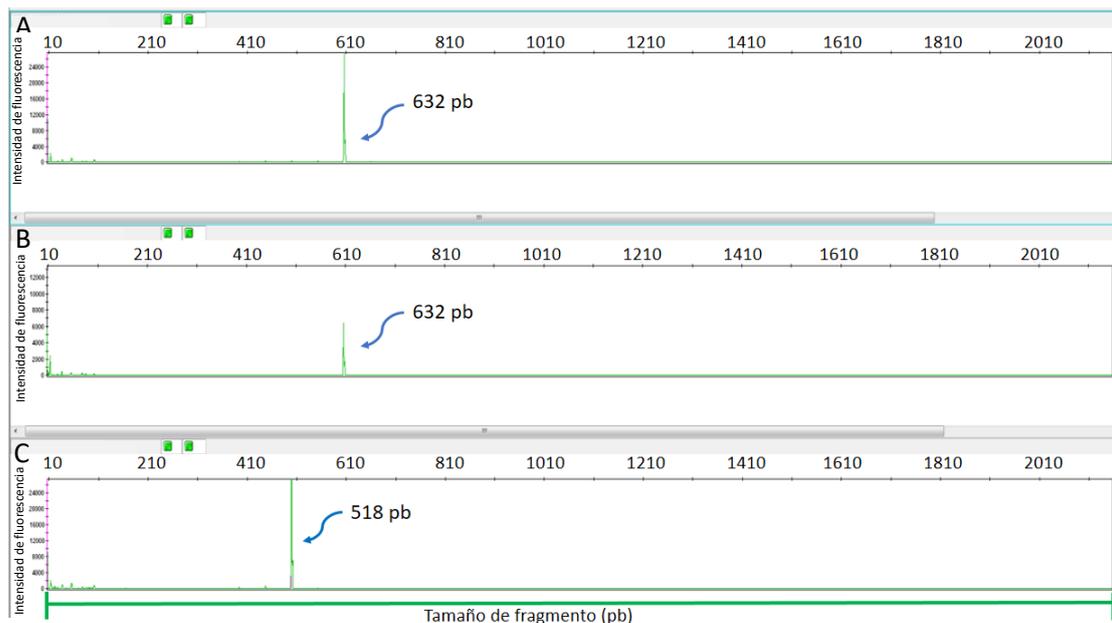


Figura 10. Resultados del Electroferograma del patrón MIRU-VNTR del *loci* ETR-B de las cepas control. A) *M. bovis* AN5, B) *M. bovis* BCG Pasteur y C) *M. tuberculosis* H37Rv. El tamaño (pb) mostrado, corresponde al valor del número de repetidos seleccionado en la Tabla 13.

Con base en el tamaño de cada uno de los nueve *loci* analizados de los 132 aislados de *M. bovis*, se obtuvieron 37 patrones MIRU-VNTR, basados en el número de repetidos en tándem de cada *loci*, de los cuales 12/37 (32.4%) formaron clusters y 25/37 (67.6%) fueron patrones únicos.

En los 12 clusters se incluyeron 107/132 (81%) aislados, los cuales fueron nombrados por conveniencia de M1 a M12, el resto de los aislados 25/132 (19%) presentaron patrones únicos. Los resultados se observan en la Tabla 7.

Además, se analizó la relación entre el espigotipo y el patrón MIRU-VNTR obtenido de cada uno de los 132 aislados estudiados. En la Tabla 8 se presentan los resultados de los patrones MIRU-VNTR obtenidos por cada espigotipo y se indica el Cluster M al cual pertenece cada patrón y el número de aislados. Se observan 21 espigotipos de los cuales los que tienen mayor número de aislados son SB0121 49/132 (37%) y SB0673 27/132 (20.4%), éste último presenta mayor variabilidad.

Cluster M	ETR-A	ETR-B	MIRU 4	MIRU 31	MIRU 26	Qub 11a	Qub 11b	Qub 26	Qub 3232	No. aislados
M1	6	4	3	3	5	9	2	5	5	33
M2	7	5	3	3	5	10	4	4	10	20
M3	7	5	3	3	5	10	4	4	13	12
M4	6	4	3	3	2	10	1	2	7	8
M5	7	5	3	3	5	9	4	4	10	8
M6	7	6	3	3	5	9	4	3	9	6
M7	7	5	3	2	3	11	3	3	9	5
M8	7	5	3	3	3	10	3	3	7	5
M9	6	4	3	3	5	10	2	3	8	3
M10	6	4	3	3	5	9	2	4	5	3
M11	7	5	3	3	5	10	4	4	6	2
M12	6	5	3	3	5	10	3	4	10	2
13	5	5	3	3	3	10	3	3	7	1
14	6	5	3	3	5	9	2	5	5	1
15	7	5	3	3	5	10	3	3	7	1
16	7	5	2	3	5	10	4	4	10	1
17	7	3	3	3	5	10	3	2	9	1
18	7	3	3	3	5	10	3	3	7	1
19	7	3	3	3	6	10	4	3	9	1
20	7	6	3	3	5	10	4	3	10	1
21	5	5	3	3	5	10	4	4	7	1
22	6	5	3	3	5	10	3	4	8	1
23	6	5	3	3	5	10	4	4	10	1
24	7	5	3	2	5	10	4	4	9	1
25	7	5	3	3	5	10	4	4	8	1
26	7	4	3	3	5	10	4	4	10	1
27	7	4	3	3	5	10	4	4	12	1
28	7	5	3	3	5	10	4	5	6	1
29	7	5	3	3	5	10	4	3	10	1
30	7	5	3	3	5	10	4	4	7	1
31	7	5	3	3	5	10	4	4	12	1
32	7	5	3	3	6	10	4	4	10	1
33	8	3	3	3	5	10	4	4	10	1
34	3	5	3	3	5	10	4	5	10	1
35	7	6	3	3	5	10	4	4	10	1
36	3	5	3	3	5	10	4	4	10	1
37	7	5	3	3	5	10	4	4	9	1

Tabla 7. Patrones de MIRU-VNTR (código de nueve dígitos) obtenidos en los 132 aislados de *M. bovis* probados. Cluster M: Indica el Cluster asignado por patrón MIRU-VNTR; Columnas 2 -10: Número de repetidos en tándem de cada marcador; Columna 11: Número de aislados con ese patrón.

Espoligotipo	ETR-A	ETR-B	MIRU 4	MIRU 31	MIRU 26	QUB 11A	QUB 11B	QUB 26	QUB 3232	Cluster M	No. Aislados
SB0971	7	5	3	3	5	10	4	4	13	M3	10
SB0327	7	5	3	2	3	11	3	3	9	M7	4
SINESP2	7	6	3	3	5	9	4	3	9	M6	2
SB0484	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	1
SB0669	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	1
SB1754	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	1
SINESP3	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	1
SB2120	7	5	3	2	3	11	3	3	9	M7	1
SB2351	6	4	3	3	5	10	2	3	8	M9	1
SB1551	7	6	3	3	5	10	4	4	10	34	1
SB2085	3	5	3	3	5	10	4	4	10	35	1
SINESP1	7	6	3	3	5	9	4	3	9	M6	4
	7	5	3	3	5	9	4	4	10	M5	1
SB0130	7	5	3	3	3	10	3	3	7	M8	4
	7	5	3	3	5	10	3	3	7	9	1
SB0986	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	1
	7	5	2	3	5	10	4	4	10	12	1
SB0996	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	1
	7	5	3	3	5	9	4	4	10	M5	1
SB0120	7	5	3	3	5	10	4	4	13	M3	1
	6	4	3	3	2	10	1	2	7	M4	1
SB2054	7	5	3	3	3	10	3	3	7	M8	1
	5	5	3	3	3	10	3	3	7	1	1
SB0145	7	5	3	3	5	9	4	4	10	M5	1
	7	3	3	3	5	10	3	2	9	15	1
	7	3	3	3	5	10	3	3	7	16	1
	7	3	3	3	6	10	4	3	9	17	1
	7	6	3	3	5	10	4	3	10	18	1
SB0140	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	2
	6	5	3	3	5	10	3	4	10	M12	2
	5	5	3	3	5	10	4	4	7	19	1
	6	5	3	3	5	10	3	4	8	20	1
	6	5	3	3	5	10	4	4	10	22	1
	7	5	3	2	5	10	4	4	9	23	1
	7	5	3	3	5	10	4	4	8	24	1
SB0121	6	4	3	3	5	9	2	5	5	M1	33
	6	4	3	3	2	10	1	2	7	M4	7
	6	4	3	3	5	9/10	2	4	5	M10	3
	6	4	3	3	5	10	2	3	8	M9	2
	7	5	3	3	5	10	4	4	13	M3	1
	7	5	3	3	5	10	4	4	6	M11	1
	7	5	3	3	5	10	4	4	9	37	1
	6	5	3	3	5	9	2	5	5	6	1
SB0673	7	5	3	3	5	10	4	4	10	M2	12
	7	5	3	3	5	9	4	4	10	M5	5
	7	5	3	3	5	10	4	4	6	M11	1
	7	4	3	3	5	10	4	4	10	25	1
	7	4	3	3	5	10	4	4	12	26	1
	7	5	3	3	5	10	4	5	6	27	1
	7	5	3	3	5	10	4	3	10	28	1
	7	5	3	3	5	10	4	4	7	29	1
	7	5	3	3	5	10	4	4	12	30	1
	7	5	3	3	6	10	4	4	10	31	1
	8	3	3	3	5	10	4	4	10	32	1
	3	5	3	3	5	10	4	5	10	33	1

Tabla 8. Resultados de la relación entre el espoligotipo y el patrón MIRU-VNTR de los aislados de *M. bovis* probados.

Los espoligotipos con menor asociación de patrones MIRU-VNTR fueron SB0971 (1/10 aislados) y SB0327 (1/4 aislados). Mientras los más variables fueron SB0673 (12/27 aislados) y SB0121 (8/49 aislados), de estos últimos el patrón de MIRU-VNTR más frecuente se presentó en 12/27 (44.4%) aislados y 33/49 (67.3%) respectivamente.

Se determinó la variabilidad alélica (VA), de cada uno de los nueve *loci* probados en los 132 aislados de *M. bovis*. En la Tabla 9 se presentan los nueve *loci* analizados y el número de aislados que presentaron cada número de repetidos en tándem. Además de los valores de variabilidad alélica obtenidos, los cuales oscilaron entre 0.02 y 0.79. MIRU 4 fue el menos variable y Qub 3232 fue el más variable.

Número de Repetidos en tándem	ETR-A	ETR-B	MIRU 4	MIRU 31	MIRU 26	Qub 11a	Qub 11b	Qub 26	Qub 3232
1							8		
2			1	6	8		40	9	
3	2	2	131	126	11		17	25	
4		49					67	62	
5	2	70			111			36	37
6	52	1			2				3
7	75								18
8	1								5
9						50			15
10						76			40
11						5			
12									2
13									12
VA	0.52	0.58	0.02	0.09	0.28	0.52	0.63	0.66	0.79

Tabla 9. Resultados de la Variabilidad alélica (VA). Resultados de la variabilidad alélica de cada uno de los *loci* probados mediante la fórmula presentada en metodología.

De acuerdo con la clasificación aplicada por Sola y cols., (alto > 0.6, medio entre ≥ 0.3 y ≤ 0.6 ; bajo < 0.3) se clasificó la variabilidad alélica de los marcadores analizados en este estudio: Alto: Qub 3232, Qub 11b y Qub 26; Medio, ETR-A, ETR-B, MIRU 26 y Qub 11a; Bajo: MIRU 4 y MIRU 31 (Sola et. al., 2003).

9.5 Interpretación de Resultados

En el dendograma se analizó la similitud del patrón de MIRU-VNTR y del espoligotipo de los 132 aislados y las tres cepas control (*M. bovis* AN5, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur). Se observa que la similitud entre espoligotipo y MIRU-VNTR es la siguiente: en el cluster M1 la similitud entre los dos métodos es del 100% en 33 aislados, en el cluster M2 son 12 y en M3 son 10. Las cepas control *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG presentaron diferentes patrones por ambos métodos, de la cepa *M. bovis* AN5 no contamos con el espoligotipo.

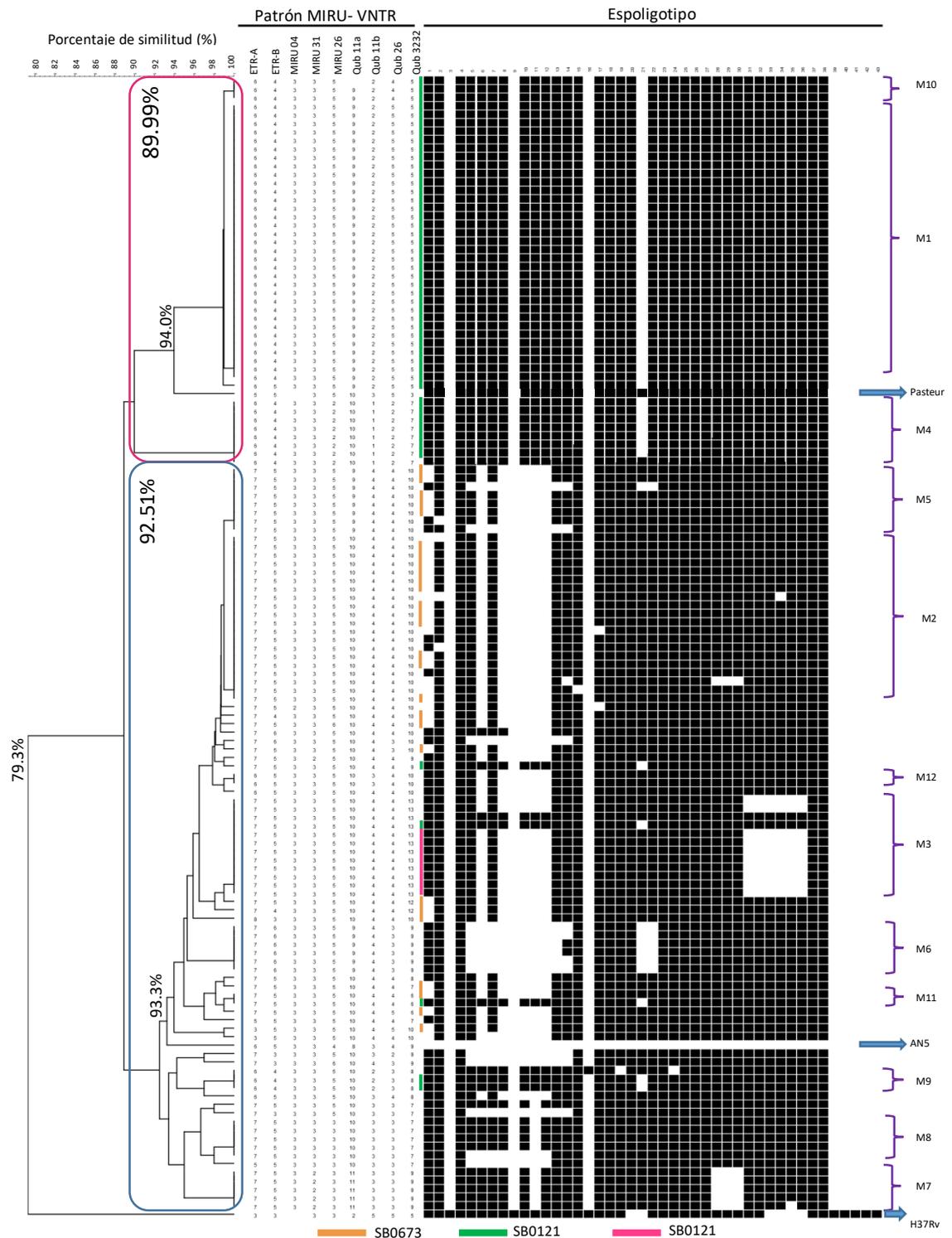


Figura 11. Dendrograma de los 132 aislados y 3 cepas control. Primer columna: Dendrograma; Segunda columna: Patrón MIRU-VNTR; Tercer columna: Patrón de Espoligotipo; Líneas de color: Espoligotipo; Llaves: Cluster M; Sector rosa: Similitud de 89.99%; Sector azul: Similitud de 92.51%

Además, se analizaron los resultados de tipificación por MIRU-VNTR y espoligotipo en un árbol de expansión mínima (MST), en 107/132 aislados que formaron clusters (Figura 12). Cada círculo representa un espoligotipo asignado a través de la base de datos de www.mbovis.org, cada color representa un patrón MIRU-VNTR diferente, el segmento interno del círculo representa un aislado. La distancia entre círculos, representa el grado de similitud genética que tienen los aislados entre sí, conforme a su patrón de Espoligotipo (número de espaciadores diferentes).

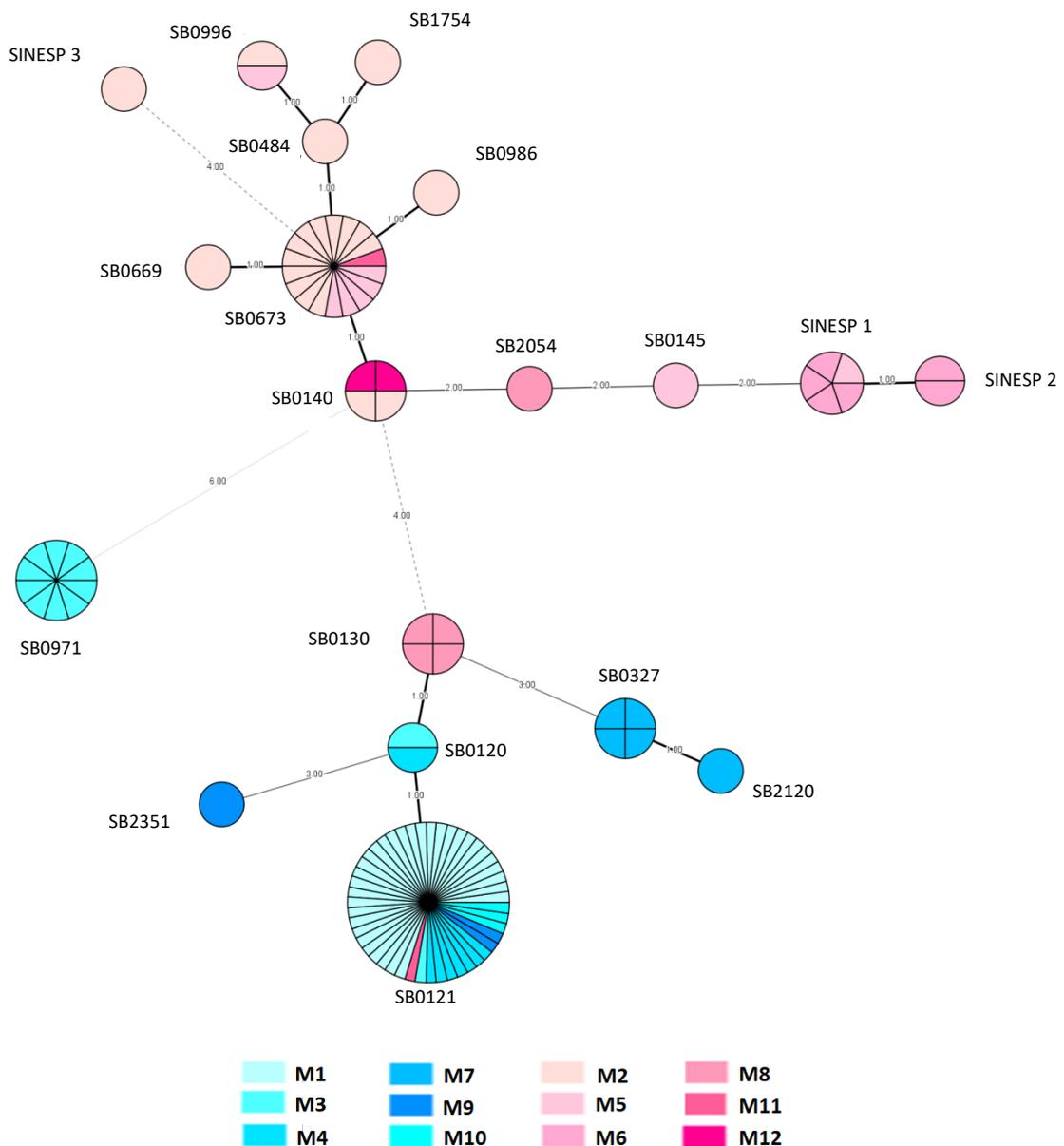


Figura 12. Resultados del análisis del árbol de expansión mínima (MST).
Resultado de los clusters formados con el espoligotipo y la técnica de
MIRU-VNTR.

Descripción del árbol de expansión mínima

Para su análisis se dividió el MST en 2 zonas, que se identificaron mediante el empleo de tonalidades rosas o azules.

En la zona de color azul los espoligotipos que se incluyen son: SB0121, SB0120, SB0327, SB2120, SB2351, los cuales están relacionados genéticamente y comparten seis patrones de MIRU-VNTR (M1, M3, M4, M7, M9 y M10), así mismo se encuentran relacionados genéticamente con el espoligotipo SB0130 (círculo rosa) con distancia genética con uno y tres espaciadores. El espoligotipo SB0971, comparte el patrón de MIRU-VNTR con un aislado del SB0121 que es el más frecuente en la población de estudio.

En la Zona Rosa, los espoligotipos que se incluyen son: SB0140, SB0673, SB0669, SB0484, SB0996, SB0986, SINESP3, SB1754, SB2054, SB 0145, SINESP1 y SINESP2.

De acuerdo con el MST, estos presentan una relación genética estrecha con respecto al patrón de espoligotipo, sin embargo por patrones de MIRU-VNTR se distribuyen entre 6 distintos (M2, M5, M6, M8, M11 y M12).

Los espoligotipos SB0669, SB0484, SB0986, SB1754 y SINESP3 comparten un mismo patrón único de MIRU-VNTR (M2). Entre los tres primeros, su espoligotipo difiere en un espaciador con respecto del SB0673, mientras que SB1754 difiere en dos espaciadores. El aislado cuyo patrón de espoligotipo aún no se encuentra registrado en la base de datos www.mbovis.org nombrado SINESP3, difiere en cuatro espaciadores con respecto a SB0673.

Por último, se evaluó el poder de discriminación entre cepas del método MIRU-VNTR, espoligotipo y de estos dos métodos en conjunto, para ello se calculó el Índice de Discriminación de Hunter-Gaston (fórmula en metodología), los resultados (Tabla 10) nos indican que al emplear ambas técnicas se mejora el de discriminación del estudio.

Método	Índice de discriminación de Hunter- Gaston (HDGI)
MIRU-VNTR	0.88
Espoligotipo	0.78
MIRU-VNTR/ Espoligotipo	0.90

Tabla 10. Resultados de índice de Discriminación de Hunter- Gaston, para ambas técnicas.

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los valores de calidad del DNA empleado (≥ 1.80) en la cuantificación del DNA empleado (Thermo Fisher Scientific, 2010), las condiciones de PCR establecidas, verificadas a través de electroforesis en gel de agarosa (Supply, 2006) y empleo de cepas control cuyo patrón MIRU-VNTR obtenido, coincide con el observado en otros estudios (Ghielmetti et. al., 2017), respaldan los resultados en la determinación del número de repetidos en tándem de los nueve *loci* de los 132 aislados.

El análisis de fragmentos a través de electroforesis capilar, permitió determinar de manera más precisa el tamaño de los fragmentos, que la electroforesis en gel de agarosa, puesto que, comparar el tamaño del fragmento a través del electroferograma con la Tabla del Anexo C (www.miru-vntrplus.org), es más sencillo que estimar el tamaño entre dos bandas de un marcador de peso molecular para definir el número de repetidos en tándem de cada *loci* probado, principalmente en casos donde la diferencia entre un número de repetido y el siguiente es pequeña, o bien el tamaño del fragmento es grande y la separación en el gel de agarosa no permite distinguir las bandas del marcador de peso molecular.

De los resultados previos de este estudio, realizado en el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Nutrición, se sabe que la variabilidad genética en la población muestra del CAIT (132 aislados), es alta (Cruz, 2013), puesto que se detectaron 21 espoligotipos de una misma región geográfica, bajo este hecho, la obtención de 37 patrones MIRU-VNTR, concuerda con lo esperado, ya que MIRU-VNTR es una técnica que evalúa modificaciones genéticas que requieren un tiempo menor para ser adquiridas que la espoligotipificación (Bouklata et. al., 2015).

Así mismo, se formaron 13 grupos de 21 patrones de espoligotipo (61.9%) y 12 grupos de 37 patrones por MIRU-VNTR (32.4%), ya que, al generar más patrones MIRU-VNTR, los clusters formados son menos y de menor tamaño que por espoligotipificación (Bouklata, 2015).

De los 21 espigotipos presentes en la muestra, cuatro (SB0121, SB0140, SB0673 y SB0669) han sido reportados en México y algunos países Europeos y de latinoamérica (Ghavidel et. al., 2018) y 10 (SB han sido reportados en Veracruz, Querétaro, Jalisco, Guanajuato, Estado de México, Coahuila, Aguascalientes, Baja California e Hidalgo (Perea et. al., 2018). Esto refleja la transmisión de *M. bovis* a través de la relación comercial de ganado lechero entre América Latina y Europa.

Por otra parte, se refleja que el intercambio de vacas dentro de la República Mexicana, se realiza sin control sanitario, a pesar de lo estipulado en la NOM-031-ZOO-1995, referente a las especificaciones requeridas para el traslado de ganado, las cuales señalan que el ganado lechero debe presentar un resultado negativo a la prueba de la tuberculina en pliegue caudal y prueba cervical comparativa o bien, en caso de presentar un resultado positivo, deben ser trasladadas a un establo controlado (DOF, 1996).

Los marcadores seleccionados en el estudio, fueron los establecidos por VISAVET y de acuerdo con varios estudios han reportado presentar una variabilidad alélica baja, media o alta (Mokrousov, 2017, Ghavidel, 2018), esta estrategia, de mezclar el tipo de alelos seleccionados puede resultar favorable para detectar relaciones epidemiológicas, puesto que, al seleccionar alelos poco variables en combinación con alelos muy variables es posible establecer la relevancia en el cambio del número de repetidos de un alelo a otro para detectar una cadena de transmisión.

Los estudios de epidemiología molecular de *M. bovis* a través de MIRU-VNTR, se han realizado en países con características económicas, culturales y poblacionales diferentes, además de que emplean número y *loci* diferentes, por lo que los resultados no pueden ser comparables, a diferencia de la espigotipificación, que cuenta con bases de datos internacionales que permite la identificación, comparación y seguimiento de las cepas aisladas en diversas poblaciones.

Esto refleja la importancia de la estandarización de la técnica MIRU-VNTR para *M. bovis*, la realización de una base de datos internacional y el estudio de la población presente en cada región geográfica.

La variabilidad alélica calculada de los marcadores MIRU 4 (0.02) y MIRU 31 (0.09), son similares con los obtenidos en un estudio realizado en Baja California en 2014 en el que los marcadores mencionados presentaron una variabilidad alélica de cero (Laniado, 2014). Sin embargo, el número de repetidos en tándem, son muy diferentes a los detectados en nuestro estudio, esto, puede deberse a la herramienta empleada para obtener el número de repetidos de cada alelo.

Laniado y colaboradores emplearon un programa llamado MSTools v.3.1.1. para determinar los valores, mientras en este estudio, se empleó la Tabla 13 del anexo C, resumida de la base internacional MIRU-VNTR PLUS (www.miru-vntrplus.org), que corresponde con valores obtenidos en las cepas control *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG Pasteur empleadas en un estudio en Suiza (Guielmotti, 2017).

En cuanto a Qub3232 y Qub 11b, coincide lo reportado por Ghavidel y cols. en 2018 en su estudio realizado en Irán, en el que recopilaron la información de 31 artículos de 2005 a 2018, en los cuales se reporta la variabilidad alélica de estos marcadores como alta. (Ghavidel, 2018).

En el caso de MIRU 4, el número de repetidos en tándem en el 99.2% de la población (3), se diferencia del número de repetidos en tándem de la cepa control *M. tuberculosis* H37Rv (3'), y de *M. Bovis* BCG Pasteur (2'), pero es igual al de la cepa *M. bovis* AN5 (3), esta diferencia en un marcador altamente conservado entre los aislados de *M. bovis*, podría ser empleada para diferenciar cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* vacunal de *M. bovis* (BCG), en nuestra población, si esta relación continua al aumentar el número de aislados.

Para MIRU 31 por otro lado, el número de repetidos en tándem más común en los aislados (3, 95.4%), es igual en las tres cepas control, por lo que podría ser considerado un *loci* conservado en las especies del CMTB. Para comprobar lo anterior, debe realizarse un estudio con una población más grande, que permita evidenciar la estabilidad de estos marcadores en la población mexicana.

Por otro lado, el empleo de los marcadores con variabilidad alélica elevada (≥ 0.6), puede ser favorable o perjudicial para la técnica, dependiendo el grado de escrutinio que se desee realizar, es decir, que tanto va a permitir excluir aislados que no estén relacionados, sin excluir aislados que si lo estén.

En la tabla 8, se puede apreciar como los clusters formados por espoligotipo son más grandes y tienden a fragmentarse en diversos grupos, esto nos indica que un cluster por espoligotipo, detectado en una zona geográfica específica, podría no siempre indicar la presencia de una cadena de transmisión. Este problema, puede solucionarse con la técnica de MIRU-VNTR, puesto que al detectar cambios en un lapso de tiempo corto confirmaría la sospecha de un brote.

Por otra parte, en el dendograma, se observa la relación del 100% entre espoligotipo y MIRU-VNTR en algunos grupos como son: cluster SB0121 con M1 (33 aislados), cluster SB0673 con M2 (12 aislados) y cluster SB0971 con M3 (10 aislados), a partir de esto, podremos inferir que hubo transmisión de *M. bovis* entre las vacas con estos genotipos a través de ambas técnicas.

En lo que se refiere al árbol de expansión mínima (MST), se observa la distribución de los aislados de acuerdo con su espoligotipo, y su correspondiente coloración de acuerdo con el patrón MIRU-VNTR, al lograr distinguir dos zonas dentro de este árbol, podemos apreciar que hay patrones MIRU-VNTR característicos por cada tipo de espoligotipo y que esta semejanza parece ser dependiente de la cercanía genética que existe entre los espoligotipos.

En este mismo árbol, se observó una excepción, que es el cluster M11 (color rosa), el cual, tiene un aislado en el espoligotipo SB0673 (color rosa) y otro en SB0121 (color azul), los cuales no son cercanos genéticamente y sin embargo, coinciden en patrón MIRU- VNTR, esto puede ser atribuido a mutaciones aleatorias que hicieron coincidir el patrón MIRU-VNTR, por ello es importante, la evaluación con ambos métodos, que en este caso nos permite inferir que estos aislados no tienen una relación epidemiológica.

En lo que se refiere al Índice de Hunter- Gaston con el cual se estima el poder de discriminación empleado en las técnicas de genotipificación, MIRU-VNTR mostró tener mayor poder de discriminación que la espoligotipificación, con valores de 0.88 y 0.78 respectivamente (Mokrousov, 2017). A su vez, el uso conjunto de ambas técnicas elevó el HDGI a 0.90, lo cual ha sido observado previamente en diversos estudios.

Por ello, el empleo de la espoligotipificación como técnica de primera línea para realizar un escrutinio inicial de los aislados detectados en una determinada región, seguida de un análisis más fino con MIRU-VNTR aumenta la capacidad de distinguir si dos cepas están ligadas epidemiológicamente o no.

11. CONCLUSIONES

La combinación de las técnicas de espoligotipificación y el empleo de nueve *loci* MIRU-VNTR permitieron sustentar que en el CAIT hay una alta diversidad genotípica entre los aislados de *M. bovis*. La presencia de diferentes genotipos en la cuenca sugiere un constante recambio de vacas dentro del Complejo Agropecuario, la segunda de ellas, detecta cambios genéticos más rápidos que la primera.

Se evidenciaron patrones MIRU-VNTR característicos de algunos espoligotipos, y que estos se comparten entre espoligotipos con cercanía genética, lo cual puede servir para evidenciar cadenas de transmisión.

La técnica de MIRU-VNTR tuvo un poder de discriminación mayor a la espoligotipificación, lo que indica que los aislados detectados en una zona geográfica específica con el mismo espoligotipo, podrían no estar relacionados en una cadena de transmisión. Sin embargo, con el empleo de ambas técnicas, se determinó la presencia de tres posibles cadenas de transmisión 1) espoligotipo SB0121 con patrón MIRU-VNTR M1, 2) SB0673 con M2 y 3) SB0971 con M3.

PERSPECTIVAS

Ampliar el número de *loci* empleados para la genotipificación de *M. bovis* en la misma población de estudio y verificar el aporte al poder de discriminación de la prueba.

Aplicar la técnica empleada con los marcadores descritos en este trabajo en una población de estudio diferente (ganado bovino de diferente zona geográfica), dentro de territorio mexicano y comparar la población de cada región.

Probar la técnica de MIRU-VNTR de nueve *loci*, en aislamientos de muestras clínicas humanas y ligar los resultados con epidemiología clínica.

12. REFERENCIAS

1. Andrievskaia O, Turcotte C, Berlie-Surujballi G, Battaion H, Lloyd D (2018); Genotypes of *Mycobacterium bovis* strains isolated from domestic animals and wildlife in Canada in 1985–2015; *Veterinary Microbiology*; Vol. 214; pp 44- 55; doi:101016/j.vetmic.2017.12.005
2. Allix C, Walravens K, Saegerman C, Godfroid J, Supply P and Fauville-Dufaux M (2006); Evaluation of the epidemiological relevance of Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with *IS6110* Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping; *Journal of Clinical Microbiology*; Vol. 44, No 6; pp 1951-1962; doi:10.1128/JCM.01775-05
3. Bobadilla M, Torres P, Cervera M, Martínez A, Crabtree B, Chávez B, Ortiz N, Rodríguez L, Cervantes A, Gudiño T, Cinta C, Sifuentes J, Ponce de León A (2015); Trends of *Mycobacterium bovis* Isolation and First-Line Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Profile: A Fifteen-Year Laboratory-Based Surveillance; *PLoS Neglected Tropical Diseases*; Vol. 9 No. 9; pp 1-11; doi:10.1371/journal.pntd.0004124
4. Bouklata N, Supply P, Jaouhari S, Charof R, Seghrouchni F, Sadki K, El Achhab Y, Nejjari C, Filali-Maltouf A, Lahlou O and El Aouad R (2015); Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* Complex by 24-Locus Based MIRU-VNTR Typing in Conjunction with Spoligotyping to Assess Genetic Diversity of Strains Circulating in Morocco; *PLoS ONE*; Vol. 10, No. 8; pp 1-16; doi:10.1371/journal.pone.0135695
5. Brosch, R, Gordon S, Marmiesse M, Brodin P, Bruchrieser C, Kremer K, Parsons L, Pym A, Samper S, Van Soolingen D and Cole T (2002); A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; vol. 99 no. 6; doi:[10.1073/pnas.052548299](https://doi.org/10.1073/pnas.052548299)

6. CDC, Centers for Disease Control and Prevention (2017); Tuberculosis, Data and Statistics; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; Sitio web; <https://www.cdc.gov/tb/statistics/default.htm>
7. CFSPH, The Center for Food Security & Public Health (2009); Bovine Tuberculosis; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; versión web: http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/bovine_tuberculosis.pdf
8. Cavusoglu C, Hilmioglu S, Guneri S and Bilgic A (2002); Characterization of *rpoB* Mutations in Rifampin-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Turkey by DNA Sequencing and Line Probe Assay; Journal of Clinical Microbiology; Vol. 40, No. 12; pp 4435–4438; doi:10.1128/JCM.40.12.4435–4438.2002
9. Cruz, E (2013), Genotipificación de aislados de *Mycobacterium bovis*, obtenidos de muestras de ganado bovino en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca, Hidalgo (Tesis de maestría), UAM, Iztapalapa, CDMX.
10. DOF, Diario Oficial de la Federación (1996); NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*); Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; Versión web: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4874790&fecha=08/03/1996
11. DOF, Diario Oficial de la Federación (2007); PROYECTO de Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*); Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; Versión web: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5008916

12. Fernandez D, Tavares L, Almeida P and Dellagostin O (2014); Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: A review; Brazilian Journal of Microbiology; Vol. 45, No. 2; pp 365-372; PMID: 25242917
13. Ghavidel M, Mansury D, Nourian K and Ghazvini K (2018), The most common spoligotype of *Mycobacterium bovis* isolated in the world and the recommended *loci* for VNTR typing: A systematic review; Microbial Pathogenesis; Vol 118; pp 310-315; doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.036
14. Goguet de la Salmoliere Y, Li H, Torrea G, Bunschoten A, Van Embden J and Gicquel B (1997); Evaluation of spoligotyping in a study of the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*; Journal of Clinical Microbiology; Vol. 35 No. 9; pp 2210–2214 PMID: 9276389
15. Groenen P, Bunschoten A, Van Soolingen D and Van Embden J (1993); Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*. Application for strain differentiation by a novel method; Molecular Microbiology; Vol. 10 No. 5; pp 1057-1065; PMID: 7934856
16. Guielmetti G, Scherrer S, Friedel U, Frei D, Suter D, Perler L and Wittenbrink M (2017); Epidemiological tracing of bovine tuberculosis in Switzerland, multilocus variable number of tandem repeat analysis of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*; PLoS ONE; Vol. 12 No. 2; pp 1-15; doi:10.1371/journal.pone.0172474
17. Hain Lifescience GmbH (2012); GenoType MTBC VER 1.X, Instructions for use; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; version web: https://www.immunodiagnostic.fi/wp-content/uploads/MTBC_kit-insert.pdf
18. Hauer A, Cruz K, Cochard T, Godreuil S, Karoui C, Henault S, Bulach T, Bañuls A, Biet F and Boschirolì M (2015); Genetic Evolution of *Mycobacterium bovis* Causing Tuberculosis in Livestock and Wildlife in France since 1978; PLoS ONE; Vol. 10 No. 2; pp 1-17; doi:10.1371/journal.pone.0117103

19. Hopewell P and Jasmer R (2005); Overview of clinical Tuberculosis In: Cole S, Davis E, McMurray D and Jacobs W; Eds. Tuberculosis and the tubercle bacillus; 11th edición; pp 15-32. Washington D.C. ASM Press.
20. Kubica T, Rüsçh S and Niemann S (2003), *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Caused One-Third of Human *M. bovis*-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001; Journal Of Clinical Microbiology; Vol. 41, No. 7; pp. 3070–3077; doi: 10.1128/JCM.41.7.3070–3077.2003.
21. Laniado R, Muñiz R, García RA, Vargas AC, Villa C, Ocegüera L, (2014); Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California México; Infección, Genética y Evolución, Vol. 27, pp 1-5; doi:10.1016/j.meegid.2014.06.020.
22. Lobue P (2006), Public Health Significance of *M. bovis* in; Thoen C, Steele J and Gilsdorf M; *Mycobacterium bovis*, Infection in animals and humans; Segunda edición, Blackwell Publishing; Iowa, USA, pp 6-12.
23. Malone F, Wilson E, Pollock J and Skuce R (2003); Investigations into an Outbreak of Tuberculosis in a Flock of Sheep in Contact with Tuberculous Cattle; Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health; Vol. 50 No. 10; pp 500- 504; doi:10.1046/j.1439-0450.2003.00714
24. Mokrousov I (2017) Revisiting the Hunter Gaston discriminatory index: Note of caution and courses of change; Tuberculosis (Edinburgh, Scotland); Vol 104; pp 20-23; doi:10.1016/j.tube.2017.02.002
25. Müller B, Dürh S, Alonso S, Hattendorf J, Laisse C, Parsons S, Van Helden P and Zinsstag J (2013); Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans; Emerging Infectious Diseases; Volume 19, No. 6; pp 899-908; doi:10.3201/eid1906.120543.

26. Müller R, Roberts C, Brown T (2014); Genotyping of ancient *Mycobacterium tuberculosis* strains reveals historic genetic diversity; Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences; Vol. 281; No. 1781; pp 1-8; doi:10.1098/rspb.2013.3236
27. Naugle A, Schoenbaum M, Hench C, Henderson O and Shere J; Chapter 21 Bovine tuberculosis eradication in the United States, A century of progress in; Thoen C, Steele J and Kaneene J; Zoonotic Tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and Other Pathogenic Mycobacteria; 2014; 3ra edición; p. 235-251; UK, WILEY Blackwell.
28. OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal (2004); Manual De Las Pruebas De Diagnóstico Y De Las Vacunas Para Los Animales Terrestres (mamíferos, aves y abejas); Capítulo 2.3.1; Tuberculosis bovina; Vol. 1; 5° edición; pp 489-502; ISBN 978-92-9044-884-6, Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; versión web: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
29. Perea C, Rodríguez E, Román S, Milián F, Robbe S, Stuber T and Cantó G (2018); Molecular epidemiology of cattle tuberculosis in México through whole-genome sequencing and spoligotyping; PLoS ONE; Vol 13 No.3; pp 1-14; doi: 10.1371/journal.pone.0201981
30. Perera A, Gutierrez J, Flores E, Reyes G and Selva E (2014); Bovine tuberculosis eradication program in Mexico in; Thoen C, Steele J and Kaneene J; Zoonotic Tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and Other Pathogenic Mycobacteria; 3° edición; p. 291-308; UK, WILEY Blackwell.
31. Ritacco V, Torres P, Sequeira M, Reniero A and Kantor I; Chapter 16 Bovine Tuberculosis in Latin America and the Caribbean in; Thoen C, Steele J and Kaneene J; Zoonotic Tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and Other Pathogenic Mycobacteria; 2014; 3° edición; p. 149-159; UK, WILEY Blackwell.

32. Romero MB (2012); Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implantación en sanidad animal y salud pública (Tesis doctoral) Universidad Complutense De Madrid, Madrid.
33. Pfyffer G and Frantiska P (2011); Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and, Staining Procedures in; In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry J & Warnock D Eds. Manual of Clinical Microbiology; 10th Ed. pp 472-502. Washington D.C. ASM Press.
34. Saifi M, Jabbarzadeh E, Bahrmand A, Karimi A, Pourazar S, Fateh A, Masoumi M and Vahidi E (2013); HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections; Clinical Microbiology and Infection; Volume 19, Issue 8; pp 723-728; doi:10.1111/j.1469-0691.2012.04005.x
35. Salman HS and Rüsç S (200, 6); MGITTM Procedure Manual; última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; Versión Web:
https://www.finddx.org/wp-content/uploads/2016/02/mgit_manual_nov2006.pdf
36. SENASICA (2016); Acciones y Programas; Laboratorios de salud animal; Última fecha de consulta: 17 de enero de 2019; Versión web;
<https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/el-centro-nacional-de-servicios-de-diagnostico-en-salud-animal.htm>
37. SENASICA (2019); Situación actual de Tuberculosis Bovina; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; Versión web:
<https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-de-tuberculosis-bovina?state=published>

38. Simner P, Stenger S, Richter E, Brown Elliot B, Wallace R, and Wengenack N (2015); *Mycobacterium*: Laboratory Characteristics of Slowly Growing Mycobacteria In: Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry J & Warnock D Eds. Manual of Clinical Microbiology; 11th Ed. pp 570-594. Washington D.C. ASM Press.
39. Sola C, Filliola I, Legrand E, Lesjean S, Locht C, Supply P and Rastogi N (2003); Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics; *Infection, Genetics and Evolution*; Vol. 3 No. 2; pp 125-132; doi: 10.1016/S1567-1348(03)00011-X
40. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, van Soolingen D (2006); Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*; *Journal of Clinical Microbiology*; Vol. 44 No.12; pp 4498–4510; doi:10.1128/jcm.01392-06
41. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Soolingen D and Locht C (2001); Automated High-Throughput Genotyping for Study of Global Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* Based on Mycobacterial Interspersed Repetitive Units; *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. No.; pp 3565-3571; doi:10.1128/JCM.39.10.3563–3571.2001
42. Supply P, Mazars E, Lesjean S, Vincent V, Gicquel B & Locht C, (2000); Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome; *Molecular Microbiology*, Volume 36, No. 3; pp 762- 771; doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01905
43. Thermo Fisher Scientific (2008); NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; version web: <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/4Fpublic/ND%201000%20v3.7%20manual.pdf>

44. Van Embden J, Cave D, Crawford J, Dale J, Eisenach K, Gicquel B, Hermans P, Martin C, Mcadam E, Shinnick T and Small P (1993); Strain Identification of *Mycobacterium Tuberculosis* by DNA Fingerprinting: Recommendations for a Standardized Methodology; Journal of Clinical Microbiology; Vol 31, No 2; pp 406-409.
45. VISA-VET (2019); The *Mycobacterium bovis* Spoligotype Database; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; version web: <https://www.mbovis.org/>
46. Walker J and Rapley R (2005); modificado de Aquino M; Probe Design, Production, and Applications; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; version web: http://media.axon.es/pdf/78099_2.pdf
47. WHO, World Health Organization (2017); Global Tuberculosis Report; Última fecha de consulta: 25 de enero de 2019; Versión web: https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf
48. Zendejas, H (2009), Desarrollo de un modelo de predicción de riesgo de diseminación de Tuberculosis Bovina con apoyo de Sistemas de Información Geográfica (SIG), (tesis de doctorado), UNAM, Cuautitlán Izcalli, Edo de Mex.

ANEXO B

Tabla 12. Descripción de los nueve *loci* empleados en la técnica de MIRU-VNTR.

Locus	Alias	Tamaño (pb)	[MgCl ₂] (mM)	Primer PCR 5'-3'	Marcador de fluorescencia
MIRU 4	VNTR 580 ETR- D	77	2.5	GCGCGAGAGCCCGAACTGC GCGCAGCAGAAACGTCAGC	FAM
MIRU 26	VNTR 2996	51	2	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC CATAGGCGACCAGGCGAATAG	VIC
MIRU 31	VNTR 3192 ETR- E	53	3	ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA GTGCCGACGTGGTCTTGAT	NED
ETR-A	VNTR 2165	75	2.5	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	NED
ETR-B	VNTR 2461	57	2.5	ATGGCCACCCGATACCGCTTCAGT CGACGGGCCATCTTGGATCAGCTAC	VIC
Qub 11a	VNTR 2163a	69	1.5	CCCATCCCGCTTAGCACATTCGTA TTCAGGGGGGATCCGGGA	FAM
Qub 11b	VNTR 2163b	69	2.5	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG CGAAGTGAATGGTGGCAT	FAM
Qub 26	VNTR 4052	111	1	AACGCTCAGCTGTCCGAT GGCCAGGTCCCTCCCGAT	VIC
Qub 3232	VNTR 3232	56/57	1.5	TGCCGCCATGTTTCATCAGGATTAA GCAGACGTCGTGCTCATCGATACA	FAM

ANEXO C

Tabla 13. Resumen de Tabla de tamaños correspondientes a cada número de repetidos de los nueve *loci* empleados en la técnica de MIRU-VNTR. Obtenida de (www.miru-vntrplus.org).

Alias	MIRU 4	MIRU 26	MIRU 31	ETR-A	ETR-B	Qub 11a	Qub 11b	Qub 26	Qub 3232
Locus	580	2996	3192	2165	2461	2163a	2163b	4052	3232
0	175	285	492	195	347	158	67	153	450
1	252	336	545	270	404	228	136	264	492
2	329	387	598	345	461	298	205	375	534
3	406	438	651	420	518	368	274	486	576
4	483	489	704	495	575	438	343	597	618
5	560	540	757	570	632	508	412	708	660
6	637	591	810	645	689	578	481	819	702
7	714	642	863	720	746	648	550	930	744
8	791	693	916	795	803	718	619	1041	786
9	868	744	969	870	860	788	688	1152	828
10	945	795	1022	945	917	858	757	1263	870
11	1022	846	1075	1020	974	928	826	1374	912
12	1099	897	1128	1095	1031	998	895	1485	954
13	1176	948	1181	1170	1088	1068	964	1596	996
14	1253	999	1234	1245	1145	1138	1033	1707	1038
15	1330	1050	1287	1320	1202	1208	1102	1818	1080