

1222

Legu.



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EVALUACION DE LA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA (PCR) Y OLIGONUCLEOTIDOS ESPECIE
ESPECIFICOS PARA LA IDENTIFICACION
DE MICOBACTERIAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :**

GUILLERMO / VELAZQUEZ BEJERO

ASESOR: DRA. CAMILA ARRIAGA DIAZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

268131



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Evaluación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Olinonucleótidos.
Especie Específicos para la Edentificación de Micobacterias".

que presenta el pasante: Velázquez Bejero Guillermo
con número de cuenta: 8728579-4 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de SEPTIEMBRE de 1998

PRESIDENTE	M. en C. Carlos Gerardo Garcia Tovar	
VOCAL	MVZ. Jorge Luis Rico Pérez	
SECRETARIO	Dra. Camila Arriaga Díaz	
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Juan Ocampo López	
SEGUNDO SUPLENTE	MVZ. Margarita Pinto Saahón	

AGRADECIMIENTOS

A mis padres :

Por iniciarme en una educación desde pequeño, aceptarme, comprenderme y, sobre todo aguantarme con mis perros, pero además quiero aprovechar este momento para decirles que los quiero mucho mucho , con todo mi corazón.

A mis viejitas:

Don de quiera que estén yo se que será un orgullo para ustedes este logro, y que siempre estarán en mi corazón.

Mi abuelita Juana
Mamita Leonor
Mi ague Raquel

A mis hermanos:

Por la mucha o poca ayuda que me pudieron dar, gracias.
Sandra
Cruzí
Enrique

Mis tíos:

Sra. Chabela y Sr. Javier, por el cariño, apoyo y la ayuda en momentos difíciles.

Dra. Camila

Por todo lo que me ha dado la oportunidad de aprender, el espacio y lugar para lograr una meta más en mi vida, gracias.

Dra. Leticia C.

Por todo lo que me logro enseñar, muy útil para el desarrollo de esta tesis, que para mi es muy importante, con mucho respeto y cariño gracias.

Dr. Víctor

Por el tiempo brindado para el desarrollo de este trabajo, doctor como persona nunca cambie y siempre sea el compañero que uno espera de usted.

Dra. Caro

Por haberme proporcionado sus muestras, para desarrollar mi tesis.

A mis compañeros del instituto:

Lupita
Martha
Paty
Marisol
Elvira
Marco
Sra. José
Sr. Rodolfo
Dr. Fernando

Nora:

Mi amor, este espacio especial para ti, porque te amo y espero que algún día nos consagremos como pareja.

Mis compañeros y amigos de la Facultad:

Por esa amistad, que espero nunca termine.

Aidé
Rebeca
Alfredo
Adrian

Dra. Leticia M.

Por el apoyo y comprensión para ejercer y desarrollar mi carrera en su consultorio, esperando que se logre como profesionalista y mujer.

A todos los profesores y aquellas personas que tal vez se me pasen, pero que de alguna manera contribuyeron en mi formación.

Mis perros que me acompañaron desde el principio de mi carrera:

Triton
Shiva
Lina
Trosky
Tosha

INDICE

I RESUMEN.....	1
II INTRODUCCIÓN	2
III DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO.....	2
III.1 Etiología.....	3
III.2 Transmisión.....	3
III.3 Patogénia.....	4
III.4 Signos clínicos.....	4
III.5 Formas atípicas.....	5
IV DIAGNÓSTICO.....	5
IV.1 Prueba intradérmica.....	5
IV.2 Cultivo y pruebas bioquímicas.....	5
IV.3 Pruebas alternas al diagnóstico.....	5
IV.4 Reacción en cadena de la polimerasa.....	6
V ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVESTIGACION.....	7
V.1 PCR en el diagnóstico de la Tuberculosis bovina.....	7
V.2 Justificación.....	8
VI OBJETIVO.....	10
VII MATERIAL Y METODOS.....	11
VII.1 Extracción del ADN.....	11
VII.2 Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
VIII RESULTADOS.....	14
IX DISCUSION.....	20
X CONCLUSIONES.....	22
XI LITERATURA CITADA.....	23
XII APENDICE.....	26
XII.1 Material.....	26

XII.2 Reactivos.....	26
XII.3 Preparación de reactivos.....	27
XII.4 Secuencia de los oligonucleótidos.....	28
XII.4 Protocolo de PCR.....	28

RESUMEN

En México el diagnóstico definitivo de la tuberculosis bovina se lleva a cabo por medio del cultivo y pruebas bioquímicas, lo cual tarda aproximadamente de 8-16 semanas, lo que constituye un problema para el manejo y comercialización del ganado. Con las técnicas recientes de amplificación del ADN como es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se puede lograr la identificación de especie sin necesidad de llegar al cultivo. En el presente trabajo se evaluaron 4 pares de oligonucleótidos específicos de género y especie, utilizando micobacterias de referencia y 41 aislados clínicos los cuales fueron identificados por pruebas bioquímicas. De éstos, 9 fueron *M. tuberculosis* de humanos proporcionados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (INDRE); 3 de *M. tuberculosis*, 28 de *M. bovis* y una micobacteria de rápido crecimiento, tanto de bovinos como de humanos de diferentes estados del país como son de Sonora, Torreón, Aguascalientes, Tamaulipas, Querétaro y Estado de México. Se utilizaron cultivos de referencia como son de *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium* (ATCC), *M. kansasii* (ATCC). Los iniciadores utilizados fueron: 1) MYCGEN-F y R, específicos para el género *Mycobacterium*; 2) TB1-A y B, específico del complejo *Mycobacterium tuberculosis*; 3) PT1 y 2, específico para *Mycobacterium tuberculosis* y 4) JB21 y 22, Específico para *Mycobacterium bovis*. Utilizando los oligonucleótidos para el género *Mycobacterium* se obtuvo el producto esperado con las cepas de referencia y con los 40 de los 41 aislados clínicos incluyendo la micobacteria de rápido crecimiento. Con el oligonucleótido del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, se observó el producto esperado con las cepas de referencia excepto con *M. avium* y *M. kansasii*, con los aislados clínicos se observó el producto esperado en 37 de 41 incluyendo la micobacteria de rápido crecimiento. Con el PT1 y 2 no hubo amplificación excepto con la *M. tuberculosis* H37Rv, con los aislados clínicos se observó el producto esperado en 15 de 40 muestras incluyendo 3 de *M. bovis*. Con el oligonucleótido JB21 y 22 sólo hubo amplificación con las cepas de referencia *M. bovis* BCG y *M. bovis* AN5, con los aislados clínicos se observó el producto esperado en 39 de 40 muestras incluyendo las 12 de *M. tuberculosis*.

INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por bacterias del género *Mycobacterium*. Varias especies de este género, principalmente *M. bovis* y *M. tuberculosis* son importantes desde el punto de vista económico y de salud pública, ya que producen enfermedad en distintas especies de animales, incluyendo los bovinos, en los cuales merma la producción láctea y causa decomiso de canales en el rastro; en humanos se desarrolla la misma enfermedad y llega a producir hasta la muerte (Cottral, 1986).

DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO

Esta enfermedad se caracteriza por la formación de granulomas llamados tubérculos, y por lo general es una enfermedad crónica debilitante y en rara ocasión toma un curso agudo (Pérez, 1991).

En México la tuberculosis bovina es considerada una importante causa de pérdidas económicas en la ganadería ya que disminuye la producción de leche y afecta la producción de carne, por decomiso de órganos y canales afectadas. La prevalencia de esta enfermedad se ha estimado en 2.1% para ganado lechero y 1% para ganado de carne, lo que representa un número significativo de animales afectados, considerando una población bovina de 34 millones de cabezas, de las cuales 5 millones están dedicadas a la producción de leche (OPS, 1992).

Más recientemente, de acuerdo al informe anual de actividades de la Campaña Nacional para el Control y la Erradicación de la Tuberculosis Bovina, durante 1997 se realizó la prueba intradérmica a 2,287,704 animales, de los cuales 1,432,437 fueron ganado de carne y los demás de leche y se encontraron 28,300 reactores, que corresponden al 1.24% (Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Campaña Nacional contra la Erradicación de la Tuberculosis y la Brucelosis Bovina. Reporte 1997).

Por otro lado, en el mismo año, hasta el mes de septiembre, se reportó en 40 plantas tipo TIF 1,460 bovinos con lesiones sugestivas a tuberculosis, de 967,166 animales sacrificados. Se remitieron a los laboratorios regionales casi el 30% de muestras de estos animales para el diagnóstico de la tuberculosis, encontrando lesiones en 303 muestras, lo que equivale a 3.5 animales de cada 10,000 en 39 de 40 plantas, con excepción de la de Villahermosa, donde se

INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa causada por bacterias del género *Mycobacterium*. Varias especies de este género, principalmente *M. bovis* y *M. tuberculosis* son importantes desde el punto de vista económico y de salud pública, ya que producen enfermedad en distintas especies de animales, incluyendo los bovinos, en los cuales merma la producción láctea y causa decomiso de canales en el rastro; en humanos se desarrolla la misma enfermedad y llega a producir hasta la muerte (Cottral, 1986).

DESCRIPCION DE LA ENFERMEDAD EN MEXICO

Esta enfermedad se caracteriza por la formación de granulomas llamados tubérculos, y por lo general es una enfermedad crónica debilitante y en rara ocasión toma un curso agudo (Pérez, 1991).

En México la tuberculosis bovina es considerada causa importante de pérdidas económicas en la ganadería ya que disminuye la producción de leche y afecta la producción de carne, por decomiso de órganos y canales afectadas. La prevalencia de esta enfermedad se ha estimado en 2.1% para ganado lechero y 1% para ganado de carne, lo que representa un número significativo de animales afectados, considerando una población bovina de 34 millones de cabezas, de las cuales 5 millones están dedicadas a la producción de leche (OPS, 1992).

Más recientemente, de acuerdo al informe anual de actividades de la Campaña Nacional para el Control y la Erradicación de la Tuberculosis Bovina, durante 1997 se realizó la prueba intradérmica a 2,287,704 animales, de los cuales 1,432,437 fueron ganado de carne y los demás de leche y se encontraron 28,300 reactores, que corresponden al 1.24% (Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria, Campaña Nacional contra la Erradicación de la Tuberculosis y la Brucelosis Bovina. Reporte 1997).

Por otro lado, en el mismo año, hasta el mes de septiembre, se reportó en 40 plantas tipo TIF 1,460 bovinos con lesiones sugestivas a tuberculosis, de 967,166 animales sacrificados. Se remitieron a los laboratorios regionales casi el 30% de muestras de estos animales para el diagnóstico de la tuberculosis, encontrando lesiones en 303 muestras, lo que equivale a 3.5 animales de cada 10,000 en 39 de 40 plantas, con excepción de la de Villahermosa, donde se

sacrificaron en el mismo periodo 106,495 animales y se reportaron 1,157 animales lo que equivale a 8.6 animales por cada 10,000 bovinos sacrificados (Campaña Nacional para el control y Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina, SAGAR 1996).

Etiología

El agente causal de la tuberculosis bovina es *Mycobacterium bovis*, el cual junto con *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microtii* forman parte del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. (Manual de Actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario como unidades de verificación en tuberculosis bovina y brucelosis. México 1996).

Las micobacterias son bacilos aeróbios, ácido alcohol resistentes, con un alto contenido de lípidos en su pared celular. No se tiñen con la tinción de Gram, pero cuando se les aplica calor, adquieren el colorante primario y son capaces de resistir la decoloración con ácido alcohol; (de aquí su nombre). Las micobacterias carecen de, flagelos, fimbrias, cápsula y no esporulan. Pertenecen a un grupo de bacterias que se han denominado CNM (*Corynebacterium*, *Nocardia* y *Mycobacterium*), producen lesiones granulomatosas y exudados caseosos, y comparten antígenos de pared, responsables de la reacción cruzada a la tuberculina (Pérez, 1991).

Dentro de la morfología bacteriana vemos que es típicamente bacilar, midiendo desde 0.2-0.6 a 1.0-10.0 μm . Es un bacilo relativamente corto cuando se observa en frotis de tejidos, y moderadamente largo, delgado y forma cadenas en preparaciones en medios de cultivo. (Elmer, 1985)

M. bovis es el causante de la mayor parte de las infecciones de los bovinos, sin embargo el *M. avium* y *M. tuberculosis* también pueden producir la tuberculosis en el ganado pero en menor proporción. El *M. bovis* afecta a bovinos, cabras y cerdos. El ganado cebuino presenta mayor resistencia que el ganado europeo. También son afectados algunos animales salvajes como liebres, bisón y algunas aves. (Pérez, 1991).

Transmisión

Este microorganismo es capaz de reproducirse fuera del huésped, sólo en medios de cultivo especiales. Un animal infectado puede eliminar la bacteria por exhalación de aire, en el esputo, heces, leche y orina. También por descarga vaginal y uterina, así como por descarga de nódulos linfáticos abiertos. La infección ocurre principalmente por la ingestión y/o inhalación de alimentos o agua contaminados, siendo la inhalación el método por excelencia en animales

estabulados, por el contrario, en animales de pastoreo la ingestión de alimento o agua contaminados es lo más común. Se ha visto que las micobacterias pueden permanecer hasta por 18 días en el agua, mientras que en el pasto dependerá de la temperatura y humedad. La ingestión de leche contaminada por los becerros, es un modo de transmisión más frecuente dentro del hato; también se realiza por el uso de material de ordeña o cánulas mamarias contaminadas; la ruta intrauterina, el semen contaminado o el uso de pipetas de una vaca a otra, son menos comunes (Pérez, 1991).

Debido a que *M. bovis* puede infectar también al hombre, la presencia de tuberculosis en hatos lecheros constituye un riesgo importante de salud pública, tanto como por el consumo de productos no pasteurizados, como por el contacto de los trabajadores, en el campo y en los rastros, con animales infectados. En México entre los años 1991 y 1993 se confirmaron más de 29,000 casos de tuberculosis humana y se considera que alrededor de un 8% de estos casos pudieron ser causados por *Mycobacterium bovis* (Gurria 1994).

Patogenia

Esta se divide en dos etapas: la formación de un complejo primario y posteriormente una diseminación.

El complejo primario consiste en la lesión que se produce en los nodos linfáticos regionales dependiendo de la entrada. Si es por vía respiratoria serán en los nodos pulmonares y cuando es en tracto digestivo (en tonsilas o intestino) se afectarán los nodos retrofaringeos y mesentéricos. La diseminación secundaria puede consistir en una tuberculosis miliar, donde se afectan varios órganos. Por reinfección intrínseca o extrínseca se forman nuevos nodos en diferentes órganos; la forma intrínseca se puede desarrollar por aspectos alérgicos a componentes de la micobacteria (Pérez, 1991).

Signos clínicos

Dependiendo de la localización del órgano blanco, serán los signos clínicos. En una tuberculosis miliar, no habrá signos aparentes más que una emaciación progresiva del animal, lo cual no es un signo definitivo ya que hay muchas entidades nosológicas que también lo presentan. Un apetito caprichoso, así como una temperatura fluctuante, están asociados a esta enfermedad. La infección pulmonar esta caracterizada por tos crónica y bronconeumonía; la tos no es paroxística, y se estimula por presión en la tráquea o el ejercicio. Se presenta más en la mañana o en tiempos fríos. Conforme avanza la enfermedad y el pulmón va siendo destruido, se presenta disnea y los movimientos respiratorios son más marcados. Los nodos

bronquiales afectados pueden ser la causa de la disnea debido al impedimento de la circulación del aire. El aumento de los nodos mediastínicos puede causar timpanismo persistente (Pérez 1991).

Formas atípicas

La tuberculosis uterina, la cual puede ser en forma ascendente o descendente. Esta forma está caracterizada por una metritis. En glándula mamaria, donde se produce una mastitis y se afectan principalmente los nodos mamaros. En machos la enfermedad se presenta rara vez afectando testículo, pudiendo producir infertilidad (Pérez 1991).

DIAGNOSTICO

Prueba intradérmica

El uso de pruebas inmunológicas tales como la prueba intradérmica de tuberculina y sus variantes, son la base para los programas de control y erradicación de tuberculosis. Esta prueba determina la respuesta celular del animal hacia el derivado proteico purificado (PPD) o tuberculina una mezcla compleja de antígenos de la micobacteria. Dicha prueba consiste en la inoculación intradérmica de 0.1 ml de tuberculina en el pliegue anocaudal. La reacción es leída de 72 a 96 horas después de la inoculación y una reacción positiva consiste en una induración y engrosamiento en la zona inoculada. También se usa la piel de la zona del cuello, aunque es más sensible y se dificulta un poco la lectura. (Pérez, 1991).

Cultivo y pruebas bioquímicas

Durante muchos años el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis se basaron en síntomas clínicos, evidencia radiológica de la enfermedad en humanos y en la presencia de bacilos ácido-resistentes en el esputo. El diagnóstico definitivo de la tuberculosis depende del aislamiento e identificación de la micobacteria en el paciente; hoy dicho organismo además de ser aislado e identificado, se deben realizar ensayos para comprobar su susceptibilidad frente a drogas antimicrobianas (Koneman y col. 1985); sin embargo, cabe señalar que las micobacterias toman un tiempo prolongado para replicarse, (aproximadamente 20 a 30 días); además de que la identificación de especie de las colonias, las características bioquímicas y la sensibilidad a las drogas puede tomar varias semanas, lo que hace muy laborioso su diferenciación por métodos microbiológicos convencionales (Paeyer y col., 1995).

Pruebas alternas de diagnostico

A pesar de la utilidad de la prueba intradérmica para la campaña de erradicación de la

bronquiales afectados pueden ser la causa de la disnea debido al impedimento de la circulación del aire. El aumento de los nodos mediastínicos puede causar timpanismo persistente (Pérez 1991).

Formas atípicas

La tuberculosis uterina, la cual puede ser en forma ascendente o descendente. Esta forma está caracterizada por una metritis. En glándula mamaria, donde se produce una mastitis y se afectan principalmente los nodos mamaros. En machos la enfermedad se presenta rara vez afectando testículo, pudiendo producir infertilidad (Pérez 1991).

DIAGNOSTICO

Prueba intradérmica

El uso de pruebas inmunológicas tales como la prueba intradérmica de tuberculina y sus variantes, son la base para los programas de control y erradicación de tuberculosis. Esta prueba determina la respuesta celular del animal hacia el derivado proteico purificado (PPD) o tuberculina una mezcla compleja de antígenos de la micobacteria. Dicha prueba consiste en la inoculación intradérmica de 0.1 ml de tuberculina en el pliegue anocaudal. La reacción es leída de 72 a 96 horas después de la inoculación y una reacción positiva consiste en una induración y engrosamiento en la zona inoculada. También se usa la piel de la zona del cuello, aunque es más sensible y se dificulta un poco la lectura. (Pérez, 1991).

Cultivo y pruebas bioquímicas

Durante muchos años el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis se basaron en síntomas clínicos, evidencia radiológica de la enfermedad en humanos y en la presencia de bacilos ácido-resistentes en el esputo. El diagnóstico definitivo de la tuberculosis depende del aislamiento e identificación de la micobacteria en el paciente; hoy dicho organismo además de ser aislado e identificado, se deben realizar ensayos para comprobar su susceptibilidad frente a drogas antimicrobianas (Koneman y col. 1985); sin embargo, cabe señalar que las micobacterias toman un tiempo prolongado para replicarse, (aproximadamente 20 a 30 días); además de que la identificación de especie de las colonias, las características bioquímicas y la sensibilidad a las drogas puede tomar varias semanas, lo que hace muy laborioso su diferenciación por métodos microbiológicos convencionales (Paeyer y col., 1995).

Pruebas alternas de diagnostico

A pesar de la utilidad de la prueba intradérmica para la campaña de erradicación de la

tuberculosis, la exposición y sensibilización de los bovinos hacia ciertas micobacterias como *Mycobacterium avium* y saprofitas pueden provocar una respuesta falsa positiva a la prueba. Esta respuesta falsa positiva, así como la presencia de animales anérgicos, quienes serían considerados negativos, a pesar de estar infectados con *Mycobacterium bovis*, dificulta la interpretación de la prueba (Manual de Actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario como unidades de verificación en tuberculosis bovina y brucelosis. México 1996). Por este motivo, se han hecho varios estudios para complementar el diagnóstico con otras pruebas alternas, tales como la detección de interferón gamma o la de anticuerpos específicos contra *Mycobacterium bovis*, en ensayos de ELISA. (Estrada, 1995).

Recientemente se han desarrollado técnicas basadas en la amplificación del ADN de las micobacterias por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) las cuales por su alta sensibilidad y especificidad han encontrado gran aplicación en el diagnóstico de la tuberculosis humana (Eisenach y col. 1990). Esta técnica permite la identificación de microorganismos en menos de 24 horas, y además puede usarse para detectar micobacterias en muestras en estado de descomposición o contaminadas a partir de las cuales no se podría realizar un cultivo. Diversos autores han reportado la detección de micobacterias, a través del PCR directamente de muestras clínicas como aspirado gástrico, esputo y biopsias (Eisenach y col. 1990, 1991).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

El término "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR) se aplica al proceso bioquímico *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por la ADN polimerasa en cada uno de los ciclos que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de copias del gen o segmento del ADN sometido al proceso (Barrera y col., 1993)

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores que limitan la región del ADN que se va a amplificar, es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Al ser este uno de los parámetros más importantes que determina la especificidad del PCR, su elección y diseño debe ser muy cuidadoso. Idealmente, en cada 100 μ l de reacción, la concentración aceptable de cada oligonucleótido oscila entre 0.05 y 1.0 μ M. El uso de concentraciones mayores favorece la amplificación de regiones inespecíficas y la formación de dímeros de oligonucleótidos

(Barrera y col., 1993)

La enzima utilizada para esta reacción es una ADN polimerasa termoestable conocida como TAQ polimerasa. Esta enzima tiene actividad de ADN polimerasa, de exonucleasa 3' a 5' (correctora de prueba) y de exonucleasa de 5' a 3'. Su índice de error de incorporación es de 1 en 4×10^4 bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 300 pares de bases (pb). La mayoría de los protocolos recomienda el uso de 1 a 2.5 U de la enzima por cada reacción de 100 μ l. Para establecer la cantidad mínima de enzima requerida para una amplificación exitosa y generar cantidades óptimas del producto, deben realizarse titulaciones en gamas que van desde 0.5 a 5 U por reacción. Esta medida, se utiliza para probar una enzima recién adquirida y disminuye la amplificación inespecífica que evidencia la presencia de barridos al analizar el producto amplificado en un gel (Barrera y col., 1993). Actualmente se encuentran en el mercado un Kits de PCR (Perkin Elmer) el cual podría ahorrar trabajo.

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVESTIGACION

PCR en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

Diversos autores han corroborado la factibilidad de utilizar esta tecnología en el diagnóstico clínico de la tuberculosis bovina y han demostrado que es posible utilizarla en la detección de micobacterias en muestras de sangre y tejidos de bovinos infectados (Brisson-Noe y col., 1989; Barry y col., 1993; Liebana y col., 1995; Wards y col., 1995).

Además de permitir la detección de las micobacterias en el ganado infectado la técnica de PCR también puede ser muy útil para identificar la especie de micobacteria. Esto es de particular importancia ya que debido al lento crecimiento de las micobacterias, como se mencionó anteriormente, solo en pocos casos el diagnóstico es confirmado por cultivo y en un número todavía menor se llega a la identificación de especie por métodos microbiológicos convencionales. Por lo tanto no existe mucha información sobre la frecuencia con la que *M. tuberculosis* o micobacterias de otras especies además de *M. bovis*, pueden estar infectando el ganado en México.

Recientemente se han descrito técnicas de amplificación del ADN de las micobacterias utilizando oligonucleótidos especie específicos, los cuales permiten diferenciar estos microorganismos. Así Wilton y Cousins (1992) diseñaron un PCR multiplex que permite distinguir micobacterias del complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias como *M. avium*

(Barrera y col., 1993)

La enzima utilizada para esta reacción es una ADN polimerasa termoestable conocida como TAQ polimerasa. Esta enzima tiene actividad de ADN polimerasa, de exonucleasa 3' a 5' (correctora de prueba) y de exonucleasa de 5' a 3'. Su índice de error de incorporación es de 1 en 4×10^4 bases y amplifica sin dificultad segmentos de hasta 300 pares de bases (pb). La mayoría de los protocolos recomienda el uso de 1 a 2.5 U de la enzima por cada reacción de 100 μ l. Para establecer la cantidad mínima de enzima requerida para una amplificación exitosa y generar cantidades óptimas del producto, deben realizarse titulaciones en gamas que van desde 0.5 a 5 U por reacción. Esta medida, se utiliza para probar una enzima recién adquirida y disminuye la amplificación inespecífica que evidencia la presencia de barridos al analizar el producto amplificado en un gel (Barrera y col., 1993). Actualmente se encuentran en el mercado un Kits de PCR (Perkin Elmer) el cual podría ahorrar trabajo.

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVESTIGACION

PCR en el diagnóstico de la tuberculosis bovina.

Diversos autores han corroborado la factibilidad de utilizar esta tecnología en el diagnóstico clínico de la tuberculosis bovina y han demostrado que es posible utilizarla en la detección de micobacterias en muestras de sangre y tejidos de bovinos infectados (Brisson-Noe y col., 1989; Barry y col., 1993; Liebana y col., 1995; Wards y col., 1995).

Además de permitir la detección de las micobacterias en el ganado infectado la técnica de PCR también puede ser muy útil para identificar la especie de micobacteria. Esto es de particular importancia ya que debido al lento crecimiento de las micobacterias, como se mencionó anteriormente, solo en pocos casos el diagnóstico es confirmado por cultivo y en un número todavía menor se llega a la identificación de especie por métodos microbiológicos convencionales. Por lo tanto no existe mucha información sobre la frecuencia con la que *M. tuberculosis* o micobacterias de otras especies además de *M. bovis*, pueden estar infectando el ganado en México.

Recientemente se han descrito técnicas de amplificación del ADN de las micobacterias utilizando oligonucleótidos especie específicos, los cuales permiten diferenciar estos microorganismos. Así Wilton y Cousins (1992) diseñaron un PCR multiplex que permite distinguir micobacterias del complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias como *M. avium*

o *M. intracelularis*. Por su parte Del Portillo y col. (1991) reportaron la utilización de oligonucleótidos que amplifican en forma específica un fragmento del genoma de *M. tuberculosis*, mientras que no se produce amplificación del ADN a partir de otras micobacterias del complejo. Recientemente Rodríguez y col. (1995), describieron un par de oligonucleótidos (JB21 y JB22) que amplifican un segmento de ADN de 495 pb, aparentemente específico para *M. bovis*, ya que no se obtuvo el mismo producto de amplificación a partir de ADN de otras micobacterias del complejo, ni de otras especies.

También se han utilizado modificaciones del PCR como el PCR ELISA (Patel y col., 1997) en el que se amplifica la región del gen que codifica el ARN ribosomal de 16S (que se encuentra en todas las micobacterias) y posteriormente se hibrida con sondas específicas de especie, lo que permite distinguir las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* de las otras micobacterias.

Scorpio y col., (1997) hablan de un PCR para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, con la conformación polimórfica de una banda (SSCP) que se basa en la detección de un solo punto de mutación en el gen *psaA*, estos autores afirman que tiene mucho éxito con su trabajo ya que 87 de 89 cepas de *M. bovis* se lograron distinguir de *M. tuberculosis*.

Otra metodología descrita recientemente que permite detectar y diferenciar al mismo tiempo *M. bovis* de *M. tuberculosis*, es la tipificación de oligonucleótidos separadores de la secuencia repetitiva DR (Kamerbeek y col., 1997). Esta técnica, conocida como "Spoligotyping", es utilizada también para diferenciar entre sí los aislados de *M. bovis*. Por su parte Espinosa y col. (1998) hablan de un novedoso PCR para diferenciar *M. tuberculosis* de *M. bovis*, basado en el polimorfismo de dos genes, el *pncA*, involucrado en la sensibilidad a la pirazinamidasasa, y el gen *oxyR*, el cual también muestra diferencias entre las dos especies de micobacterias.

Justificación

Los microorganismos del complejo tuberculosis son de lento crecimiento por lo que su cultivo puede tomar entre 2 y 8 semanas. Además la identificación de especie, la cual se basa principalmente en la apariencia de las colonias, las características bioquímicas y la sensibilidad a las drogas puede tomar también varias semanas, lo que hace muy laborioso su diferenciación por métodos microbiológicos convencionales. El contar con una prueba de rápida diferenciación de especie permitirá conocer la importancia y frecuencia de distintas micobacterias en el ganado bovino. A continuación se describe el costo aproximado de una

prueba de PCR por muestra:

Extracción \$20.00

Amplificación \$40.00

Gel \$20.00

Total \$ 80.00

Total + IVA= \$92.00

OBJETIVO

Estandarizar y evaluar técnicas basadas en la amplificación del ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y la identificación diferencial de las micobacterias, utilizando aislados clínicos (cultivos) de bovinos, de diferentes estados del país (Sonora, Torreón, Aguascalientes, Tamaulipas, Queretaro y estado de México), y de humanos del INDRE (Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico)

MATERIAL Y METODOS

Extracción de ADN

El presente trabajo se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) durante el año de 1997, se obtuvieron 41 muestras de micobacterias de origen bovino de diferentes estados del país y de origen humanos del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (INDRE), identificadas por medio de pruebas bioquímicas (Paeyer y col., 1993). Se incluyeron además las siguientes cepas de referencia: *M. bovis* AN5, *M. bovis* BCG, *M. avium* (ATCC), *M. tuberculosis* H37Rv y *M. kansasii*. De estas micobacterias se obtuvo el ADN por el método de van Soolingen y col. 1994, que se describe a continuación. Se transfirieron cuatro asadas de cultivo a un tubo de microcentrifuga y se agregaron 400 µl de una solución amortiguadora de TE (Tris HCl 10 mM 1 mM, pH 8.0), se inactivaron por calor en baño María a 94° C por 10 min y se enfriaron a temperatura ambiente; se adicionaron 50 µl de lisozima (10 mg/ml) se agitaron e incubaron a 37° C por toda la noche; se agregaron 75 µl de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10 % y 5 µl de proteinasa K (10 mg/ml), se agitó e incubó a 65° C durante 10 minutos. Se agregaron 100 µl de cloruro de sodio (NaCl) 5 M y se agito; se le adicionó 80 µl de una mezcla de bromuro de hexadeciltrimetil-amonio (CTAB) al 10% y NaCl al 4 %, la cual se precalentó a 65° C, antes de añadirla, se agitó hasta que el contenido del tubo se tornó blanco, se agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) se agitó 10 segundos y se centrifugó por 10 min. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y limpio evitando tomar la interfase, se agregó el 60 % de lo obtenido (0.6 volúmenes) de isopropanol y se dejó a -20° C durante 30 min, se centrifugó 10 min y se decantó, se lavó el sedimento con 500 µl de etanol al 70% se agitó, se centrifugó 10 min y se decantó, se agregaron 500 µl de etanol absoluto se agitó nuevamente, se centrifugó 10 min y se decantó, se dejó secar a 37° C durante 30 min o toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió el ADN en 50 µl de agua miliQ. Posteriormente se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm utilizando una dilución del ADN de 1:50. (van Soolingen, 1994)

Reacción en cadena de la polimerasa.

Para la amplificación del ADN se emplearon como iniciadores los oligonucleótidos que se describen en el cuadro 1

CUADRO 1. Oligonucleótidos empleados en las técnicas de PCR para la amplificación específica del ADN de las micobacterias

Oligo	ADN blanco	Producto (pb)	Especificidad	Referencia
MYCGEN-F y R	Gen ARNr 16S	1030	Genero <i>Mycobacterium</i>	Wilton y Cousins, 1992
TB1-A y B	Gen MPB70	372	Complejo <i>M.</i> <i>tuberculosis</i>	Wilton y Cousins, 1992
PT1 y 2	Gen MTP40	396	<i>M. tuberculosis</i>	Del Portillo y col, 1996
JB21 y 22	No determinado	500	<i>M. bovis</i>	Rodriguez y col, 1995

La estandarización y optimización de cada PCR se realizó empleando inicialmente cantidades estándares de desoxinucleótidos y soluciones amortiguadoras, y además se ocuparon diferentes concentraciones de iniciadores, cloruro de magnesio (MgCl₂) y ADN blanco. Las concentraciones finalmente utilizadas en un volumen de 50 µl se muestra en el Cuadro 2.

CUADRO 2. Las concentraciones de cloruro de magnesio, desoxinucleótidos, enzima y ADN utilizados en PCR con cada par de oligonucleótidos, se muestra en el siguiente cuadro donde podemos notar que hubo variaciones en algunos oligonucleótido.

OLIGONUCLEOTIDO	MgCl ₂	dNTP	U TAQ	ADN
MYCGEN-F y R	2 mM	0.4 mM	1	30 a 262 ng
TB1-A y B	2.5 mM	0.2 mM	1.25	60 a 525 ng
PT1 y 2	1.25 mM	0.2 mM	1.25	30 a 262 ng
JB21 y 22	1.5 mM	0.1 mM	1.25	30 a 262 ng

El amortiguador de PCR utilizado con todos los iniciadores tuvo una composición de 10 mM Tris-HCL, (pH 8.3), 50 mM KCL.

Los tiempos y temperaturas empleadas en PCR para la desnaturalización, hibridación y extensión, con cada par de iniciadores se muestran en el Cuadro 3.

CUADRO 3. Programas empleados para cada par de iniciadores, mostrando la temperatura del precalentamiento, desnaturalización, alineamiento, extensión y enfriamiento con el total de ciclos que usa el programa en el termociclador. Nota: los programas para cada iniciador son reportados por el autor.

Iniciadores	Precalentamiento	Desnatura- lización	Alineación	Extensión	Enfriamiento	No. Ciclos
MYCGEN-F y R	94 °C 5 min	94 °C 30 SEG	58 °C 3 MIN	75 °C 3 MIN	6 °C 10 MIN	40
TB1-A y B	94 °C 5 min	94 °C 1 MIN	55 °C 2 MIN	72 °C 3 MIN	6 °C 10 MIN	42
PT1 y 2	94 °C 5 min	94 °C 1MIN	55 °C 2 MIN	72 °C 3 MIN	6 °C 10 MIN	42
JB21 y 22	NO TIENE	94 °C 1 MIN	68 °C 1 MIN	72 °C 1 MIN	6 °C 10 MIN	30

Los productos de amplificación obtenidos se visualizaron por medio de luz ultravioleta en un gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio. *El programa de termociclación se modifico de acuerdo a las condiciones de nuestro laboratorio

RESULTADOS

Los resultados del PCR con cada par de iniciadores se muestran en las figuras 1 a la 4. El tamaño de los productos de amplificación fue de 1030 pb para MYCGEN-F y MYCGEN-R (Fig. 1), 372 pb para TB1-A y TB1-B (Fig. 2), 396 pb para PT1 Y PT2 (Fig. 3) y 500 pb para JB21 Y JB22 (Fig. 4).

Utilizando los oligonucleótidos específicos del género *Mycobacterium* MYCGEN-F y MYCGEN-R se obtuvo el producto de amplificación esperado con todas las cepas de referencia y con 40 de 41 aislados clínicos. Por su parte, con los oligonucleótidos TB1-A y TB1-B específicos del complejo *M. tuberculosis* se observó amplificación en *M. bovis* BCG, *M. bovis* AN5 y *M. tuberculosis* H37 Rv, pero no en *M. avium* y *M. kansasii*. Todos los aislados de *M. tuberculosis* y 24 de los 28 *M. bovis* también dieron el producto esperado, al igual que la micobacteria de rápido crecimiento.

Empleando PT1 y PT2, se observó amplificación con la micobacteria de referencia *M. tuberculosis* H37 Rv y con los 12 aislados de *M. tuberculosis*; las cepas de referencia *M. bovis* BCG y *M. bovis* AN5 así como *M. avium* y *M. kansasii* no amplificaron, pero sí se observó con 3 de los aislados de *M. bovis*.

Con los oligonucleótidos JB21 y JB22 los controles *M. bovis* BCG y *M. bovis* AN5 amplificaron, los demás controles *M. tuberculosis* H37Rv, *M. avium*, *M. kansasii* y la micobacteria de rápido crecimiento no amplificaron; de los 12 cultivos de *M. tuberculosis* los 12 amplificaron y de los 28 cultivos de *M. bovis* 27 amplificaron.

Un resumen de estos resultados se muestra en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Resultados de las pruebas de PCR (con los controles y aislados clínicos), utilizando los oligonucleótidos específicos de especie.

	MYCGEN-F MYCGEN-R	PT-1 PT-2	JB-21 JB-22	TB1-A TB1-B
<i>M. bovis</i> BCG	+	-	+	+
<i>M. bovis</i> AN5	+	-	+	+
<i>M. tb.</i> H37Rv	+	+	-	+
<i>M. avium</i>	+	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	+	-	-	-
Micobacteria de rápido crecimiento	+	-	-	+
<i>M. tuberculosis</i>	12/12	12/12	12/12	12/12
<i>M. bovis</i>	27/28	3/28	27/28	24/28

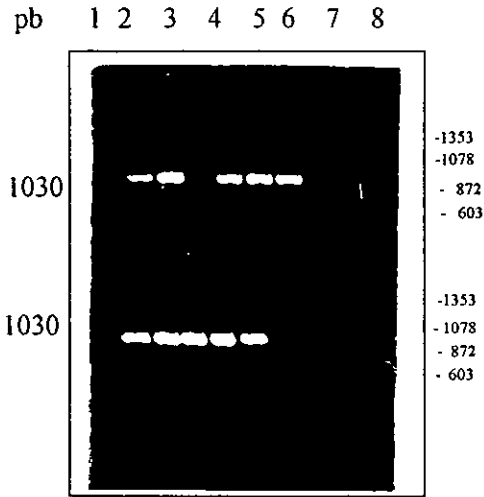


Figura 1. Productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos MYCGEN-F y R específicos del género *Mycobacterium*. Arriba: Carril 1 a 5, aislados de campo de *M. bovis*; carril 6, control positivo, *M. tuberculosis*; carril 7, control negativo, sin ADN blanco; carril 8, marcadores de tamaño, Φ X 174. Abajo: Carril 1 a 5, aislados clínicos de *M. tuberculosis*, carril 5, control positivo, *M. tuberculosis*; carril 6, control negativo, sin ADN blanco; carril 7, marcador de tamaño, Φ X174. El tamaño del producto amplificado (en pares de bases) se muestra a la izquierda

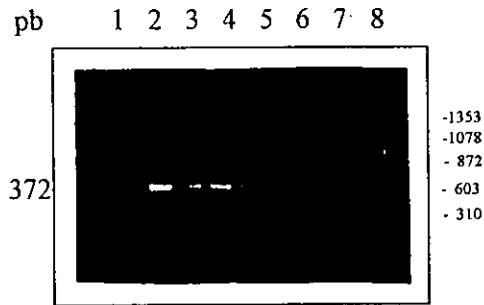


Figura 2. Productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos TB1-A y B, específicos del complejo *M. tuberculosis*. Carril 1, *M. bovis* BCG; carril 2, *M. bovis* AN5, carril 3, aislado clínico de *M. tuberculosis*, carril 4, control positivo de *M. tuberculosis*; carril 5, *M. avium*; carril 6, *M. kansasii*; carril 7, control negativo, sin ADN blanco; carril 8, marcadores de tamaño, Φ X174. El tamaño del producto amplificado (en pares de bases) se muestra a la izquierda.

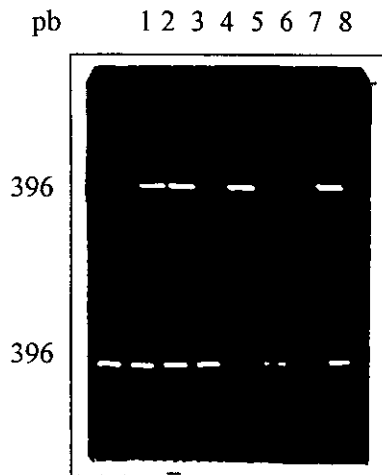


Figura 3. Productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos PT1 y PT2 específico para *M. tuberculosis*. Arriba: carril 1 a 5, aislados de campo de *M. tuberculosis*; carril 6, control negativo sin ADN blanco; carril 7, *M. bovis* BCG; carril 8, control positivo *M. tuberculosis*. Abajo: carril 1 a 6, aislados de campo de *M. tuberculosis*; carril 7, control negativo sin ADN blanco; carril 8, control positivo *M. tuberculosis*. El tamaño del producto amplificado (en pares de bases) se muestra a la izquierda.

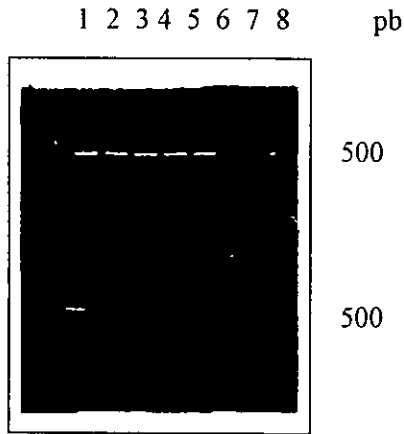


Figura 4. Productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos JB21 y JB22 específico para *M. bovis*. Arriba: carril 1, aislado de *M. tuberculosis* ; carril 2 al 6, aislados de campo de *M. bovis*; carril 7, control negativo sin ADN blanco; carril 8, control positivo *M. bovis* BCG . Abajo: carril 1 a 3, aislados de campo de *M. tuberculosis*; carril 4 , control negativo sin ADN blanco. El tamaño del producto amplificado (en pares de bases) se muestra a la derecha.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSIÓN

El microorganismo *M. bovis* es considerado el principal causante de la tuberculosis bovina. Sin embargo no existe mucha información sobre la importancia de otras micobacterias en bovinos, ya que en la mayoría de los casos el diagnóstico se basa en las lesiones observadas y en pocas ocasiones se llega al cultivo de la micobacteria, menos aun a la caracterización. Esto se debe principalmente al tiempo requerido y a lo laborioso de la técnica para llegar a la identificación bioquímica.

En este trabajo se consideró importante evaluar la utilización de oligonucleótidos específicos que han sido descritos en la literatura para identificación de las micobacterias, utilizando aislados tanto de bovinos como de humanos, previamente identificados por métodos bioquímicos. Los resultados obtenidos con MYCGEN-F y -R mostraron un 98.5% de efectividad, ya que solo una muestra no amplificó lo cual se pudo deber a un margen de error al momento de realizar el PCR. Utilizando los oligonucleótidos; TB1-A y -B 88% de las muestras identificadas como *M. tuberculosis* o *M. bovis* dieron el producto de amplificación esperado. El hecho de que 4 de los aislados de *M. bovis* no amplificaron contrasta con lo reportado por Wilton y Cousins (1992) quienes encontraron amplificación en todos los aislados del complejo *M. tuberculosis* a excepción de un aislado de *M. microti*. Sin embargo, es posible que la secuencia no este presente en todos los aislados de *M. bovis*, como se ha encontrado también con en el gen de la MTP40. (Weil y col. 1996).

Los oligonucleótidos PT1 y 2 amplificaron el ADN obtenido de todos los aislados de *M. tuberculosis*, pero además 3 cultivos de *M. bovis*. Dos de éstos sin embargo, son cultivos mixtos de bacterias que crecieron tanto en medio específico para *M. bovis* como en medio específico para *M. tuberculosis*. En este caso, es probable a que en los cultivos identificados como *M. bovis* se encontrara cierta cantidad de *M. tuberculosis* sobre todo considerando que son de origen humano.

Con respecto a los iniciadores JB21 y 22 los resultados obtenidos indican que no son muy específicos como se reporta en la literatura (Rodríguez y col, 1995) ya que además de amplificar el ADN de todos los cultivos de *M. bovis*, excepto de un cultivo mixto de origen humano, también dieron el producto de amplificación esperado con los cultivos de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, es posible que la región amplificada utilizando estos iniciadores esté presente tanto en aislados de *M. bovis* como en aislados de *M. tuberculosis*.

A pesar de que por combinación de los oligonucleótidos aquí estudiados sería posible llegar a determinar si la micobacteria pertenece al complejo *M. tuberculosis*, en el caso de los aislados de origen bovino no se podría determinar con certeza si son *M. bovis* por lo que se considera necesario continuar investigando otras regiones del genoma de *M. bovis* que se encuentren sólo en este microorganismo.

CONCLUSIONES

Se considera que el PCR utilizando los iniciadores MYCGEN-F y MYCGEN-R, TB1-A y TB1B y PT1 y PT2 son útiles en el diagnóstico de la tuberculosis y la identificación rápida de especie de micobacterias, ya sea humana o bovina. Además, se considera que en un futuro se podría trabajar con muestras de tejido, isopo nasal y algunas otras muestras clínicas con dichos iniciadores para realizar un diagnóstico más rápido y encaminar un tratamiento más eficaz para la resolución del problema.

LITERATURA CITADA

Barrera S. H. A., Ortiz L. R., Rojas M. A. y Reséndez P. D. 1993. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Ciencia y Desarrollo 108: 50-61.

Barry T., Glenon M., Smith and Ganon F. 1993. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. Veterinary Record 132:66-67.

Brisson-Noel A., Gicquel B., Lecossier D., Levy-Frebault V., Nassif X. and Hance A. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. The Lancet 4:1069-1071.

Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Campaña Nacional contra la Erradicación de la Tuberculosis y Brucelosis Bovina. Reporte 1997.

Cottral G. E. 1986. Manual de Métodos Estandarizados en Microbiología Veterinaria. Ediciones Científicas La Prensa Mexicana, S. A. P. 468-473.

Cousin D. V., Wilton S. D. and Francis B. R.. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. Veterinary Microbiology 27:187-195.

Del Portillo P., Murillo L. A. y Patarrollo M. E. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. Journal of Clinical Microbiology 29:2163-2168.

Del Portillo P., Thomas M. C., Martinez. E., Marañon C., Valladares B., Patarrollo M El., and López M. C. 1996. Multipremier PCR system for diferencial of Mycobacterial in Clinical Samples. Journal of Clinical Microbiology.34:324-328.

Eisenach K., Donald CM., Bates J.H. and Crawford J.T. 1990 Polymerase chain reaction amplification of repetitive DNA secuencia specific for *Mycobacterium tuberculosis*. Journal International Diseases 161:977-981.

Eisenach K., Sifford M.D., Donald C.M., Bates J.H., Crawford J.T., 1991. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum sample using a Polymerase chain rection. American Review Respiratory Diseases Resp. Dis. 144:1169-1163.

Estrada Ch. C., 1995. Análisis Comparativo del Diagnóstico de Tuberculosis Bovina, Utilizando las pruebas de Intradermoreacción, Interferón Gama y ELISA, basado en la inspección postmortem. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. U.N.A.M. Estado de México.

Gurria T.F., 1994. Situacion actual de la Campaña de la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis en México. México Ganadero 385:21-28.

Kamerbeek J., Schouls L., Arend K., Van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S., Buschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M. and van Embden J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal Clinical Microbiology* 35:907-914.

Koneman W. E., Allen S. D., Dowell Ch. V. R., Sommers H. M. 1985. Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. Ed. Medica Panamericana, México D. F. pp.403-410.

Liébana E., Aranaz A., Mateos A., Vilafranca M., Gomez-Mampaso E., Tercero J.C., Alemany J., Suarez G., Domingo L. and Dominguez L. 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal Clinical Microbiology* 33:324-328.

Liébana E., Aranaz A., Francis B. and Cousin D. 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal Clinical Microbiology* 34:933-938.

Noordhoek G.T., van Embden J. and Kolk A. H. 1996. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. 1996. *J. Clin. Microbiology* 34:2522-2525.

Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Desarrollo de programas de la salud pública veterinaria. Plan de Acción para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina en las Américas. 1992.

Paeyer J. B., Jarnagin J. L., Marquadt J. G., Schaper L. A., and Martin B. M. 1993. Laboratory methods in veterinary microbiology for the isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories. Veterinary Services Animal and Plant Health Inspection Service. United State Department of Agriculture. USDA, Ames, Iowa.

Patel S., Yates M., and Saunders N. A. 1997. PCR Enzyme linked immunosorbent assay and partial rRNA gene sequencing. A rational approach to identifying Mycobacteria. 1997. *J. Clin. Microbiology* 35:2385-2380.

Pérez D. M. 1991. Manual sobre el ganado productor de leche. Editorial Diana. P. 504-509.

Rodriguez J. G., Mejía G. A., Del Portillo P., Patarroyo M. E. and Murillo L. A. 1995. Species Specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. *Mycrobiology* 141:2131-2138.

Scorpio A., Collins D., Whipple D., Cave D., Bates J. and Zhang Y. 1997. Rapid Differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation on the bovine Pyrazinamidase gene. *J. Clin. Microbiology*. 35:106-110.

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural; Campañas Nacionales para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis; Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zotecnistas de México, A.C. Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario como unidades de verificación en tuberculosis bovina y brucelosis. México 1996.

van Soolingen D., Haas P.E.W., Hermans P. W. M., van Embden J. A. 1994. Isolation of genomic DNA from mycobacteria. Curret Protocols in Molecular Biology. Supplement 13.pp. 6-7.

Wards B. J., Collins D. M. and de Lisle G. W. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology 43:227-240.

Weil A., Plikaytis B. B., Butler W. R., Woodley C. L. and Shinnick T. M. 1996. The *mtp40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis* J. Clin. Microbiol. 34:2309-2311.

Wilton S., and Cousins D., 1992. Detection and identification of Multiplex Mycobacterial Pathogens by DNA Amplification in a Single Tube. Research PCR Methods and Applications 1:269-273.

APENDICE

Material

- cultivos de micobacteria
- tubos eppendorf de 1.9 ml
- tubos eppendorf de 0.5 ml
- marcadores
- pipetas serológicas de 1.0, 5.0 y 10.0 ml
- vasos de precipitado de 100 ml
- probetas de 50 ml, 100 ml y 250 ml
- matraz erlenmeyer de 250ml
- balas magnéticas
- micropipetas
- puntas para micropipetas
- guantes de latex
- cubrebocas
- maskin tape
- gradillas
- agitador
- baño maria
- platina
- microcentrífuga
- refrigerador
- congelador
- balanza analítica
- estufa
- campana de extracción
- termociclador
- cámara de electroforesis
- fuente de poder
- transiluminador
- potenciómetro

Reactivos

- agua estéril
- Amortiguador de lisis
- lisozima
- SDS 10%
- proteinasas K
- NaCl 5 M
- CTAB
- cloroformo- alcohol isoamílico
- isopropanol
- etanol 70%
- etanol absoluto
- Tris base
- ácido acético glacial

- agarosa
- EDTA
- bromuro de etidio

PREPARACION DE REACTIVOS

-Lisozima

Pesar 10 mg de lisozima y agregar 1 ml de H₂O estéril, almacenar en alícuotas hasta por un año a -20 C.

-SDS 10%

Pesar 10g de SDS y disolver en 100 ml de H₂O estéril almacenar a temperatura ambiente.

-Proteínasa K

Pesar 10 mg de proteínasa K y disolver en 1 ml de H₂O estéril alícuotar y almacenar a -20° hasta por un año.

-CTAB NACl

Pesar 4.1 g de NACl y disolver en 80 ml de H₂O estéril agítase y adicione 10 g de CTAB, si es necesario calientese a 65° y afore a 100ml, almacene a T° ambiente.

-Cloroformo alcohol-isoamilico

Mezclar 24 volúmenes de cloroformo con 1 volumen de alcohol isoamilico, almacenar a T° ambiente.

-Isopropanol

Se utiliza tal cual.

-Etanol al 70%

Mezclar 70 ml de etanol con 30 ml de H₂O estéril.

-Etanol absoluto

Se utiliza tal cual.

-TAE 50X

Se pesan 24.2 g de Tris base y se disuelve en 60 ml de H₂O estéril, se le agrega 5.71 ml de ácido acético glacial hasta homogenizar luego se le agrega 25 ml de EDTA al .2 M y se afora a 100 ml .

-Geles

Pesar 2 g de agarosa, se vacía en un matraz; por otro lado en una probeta se agregan 2 ml de TAE 50X y se aforo con agua destilada hasta 100ml, se mezcla con el agar y calientan hasta disolver, posteriormente agrega el bromuro de etidio 2 μ l (5mg/10ml) se mezcla y se deja enfriar un poco, se vacía en la cámara de electroforesis (BIORAD, incluye peines e instructivo de como armar), una vez que gelifico se retiran los peines y los pozos quedan listos; se mezclan 10 μ l de producto amplificado con 1 μ l de sustancia amortiguadora de muestra, los marcadores de peso molecular se colocan directamente 8 μ l, se corrió a 80 V con una fuente de poder por 30 min y se visualizó con luz ultravioleta.

CUADRO 5. Secuencia de oligonucleótidos o iniciadores empleados en las pruebas de PCR

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
MYCGEN-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
MYCGEN-R	TGCACACAGGCCACAAGGGA
TB1-A	AGCACGCTGTCAATCATGTA
TB1-B	GAACAATCCGGAGTTGACAA
JB21	TCGTCCGCTGATGCAAGTGC
JB22	CGTCCGCTGACCTCAAGAAG
PT-1	CAACGCGCCGTCGGTGG
PT-2	CCCCCACGGCACCGC

PROTOTOLO DE PCR

1.- Preparar mezcla de oligonucleótidos

Oligonucleotido	μ l	Oligonucleotido	μ l
H ₂ O	μ l	H ₂ O	μ l

1.- Preparar mezcla maestra

Reactivos	1X (μ l)	X (μ l de acuerdo a No. de reacciones)
H ₂ O		
Amortiguador de PCR 10X		
DNTP		
MgCl ₂		
OLIGONUCLEOTIDO A		
OLIGONUCLEOTIDO B		
TOTAL		

3.- Agregar ADN μ l

4.- Preparar mezcla de polimerasa

	1X (μ l)	X (μ l de acuerdo a No. de reacciones)
H ₂ O		
Amortiguador de PCR 10X		
POLIMERASA		
TOTAL		