



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Mycobacterium bovis* EN GANADO BOVINO PARA PRODUCCIÓN DE CARNE O LECHE DEL ESTADO DE GUANAJUATO”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

SARA IVETT VILLEGAS CERVANTES

DIRIGIDA POR

Dr. en C. OSCAR ENRIQUE PIZANO MARTÍNEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2014.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Mycobacterium bovis* EN GANADO BOVINO PARA PRODUCCIÓN DE CARNE O LECHE DEL ESTADO DE GUANAJUATO”

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA

SARA IVETT VILLEGAS CERVANTES

DIRIGIDA POR

Dr. en C. OSCAR ENRIQUE PIZANO MARTÍNEZ

SINODALES

Dr. en C. OSCAR ENRIQUE PIZANO MARTÍNEZ
PRESIDENTE

M. en B. LUIS HUMBERTO LÓPEZ HERNÁNDEZ
SECRETARIO

Dra. en C. SOFÍA MARÍA ARVIZU MEDRANO
VOCAL

M. en C. GRISELDA VALDEZ MAGAÑA
SUPLENTE

Four horizontal lines with handwritten signatures above them, corresponding to the members of the Sinodales listed on the left.

AGRADECIMIENTOS

INIFAP por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.

A Dios por darme la oportunidad de tener unos padres maravillosos.

A mis padres por todo el esfuerzo, apoyo y amor brindados durante mis largos años de estudio, gracias por creer en mí.

A mis números hermanos: Rocío, Abel, Jeanette, Adán, Yola, Francisco, Lilia y Anabel por su apoyo y cariño, los quiero mucho.

A mi pequeña Azze, eres muy inteligente y sé que llegarás muy lejos, te apoyaré siempre como lo hizo tu mami conmigo.

A dos excelentes personas Marce y Lupita, por brindarme su apoyo y amistad.

A mi director de tesis, Dr. Pizano por su comprensión y paciencia.

A cada uno de mis asesores, gracias por su tiempo y disposición de formar parte de este comité.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Tuberculosis bovina	1
1.2 Género <i>Mycobacterium</i>	2
1.3 Características de <i>Mycobacterium bovis</i>	2
1.4 Transmisión y patogenia de la enfermedad	3
1.5 Producción de carne de bovino en México	4
1.6 Producción de leche de bovino en México	6
1.7 Producción de carne de bovino en Guanajuato	9
1.8 Producción de leche de bovino en Guanajuato	10
1.9 Problemas ocasionados al sector ganadero relacionados con TBb	11
1.10 Métodos de diagnóstico	12
1.10.1 Genotipificación como método de diagnóstico	13
1.10.2 Genotipificación con endonucleasas de restricción	15
1.10.3 RFLP- IS6110	15
1.10.4 Polimorfismo de secuencias ricas en GC (PGRS)	17
1.10.5 Genotipificación con PCR	17
1.10.6 Tipificación de oligonucleótidos espaciadores	18
1.10.7 Secuencias repetidas en serie de número variable	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPOTESIS	22

4. OBJETIVOS	23
4.2 General	23
4.3 Específicos	23
5. METODOLOGÍA	24
5.2 Materiales	24
5.3 Métodos	24
5.3.1 Extracción de ADN	25
5.3.2 Preparación de la PCR	25
5.3.3 Evaluación en gel	26
6. RESULTADOS	27
7. DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIONES	36
9. REFERENCIAS	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Concentraciones de reactivos para las reacciones de PCR.	24
2. Secuencia de los iniciadores a utilizar para la identificación de los VNTR.	26
3. Caracterización molecular por espigotyping y MIRU-VNTR de los 42 aislados provenientes del estado de Guanajuato.	28
4. Caracterización molecular por espigotyping y MIRU-VNTR de los 42 aislados provenientes del estado de Guanajuato (continuación).	29
5. Diversidad alélica de cada VNTR en los aislados de <i>M. bovis</i> .	30
6. Lugar de origen de los aislados que comparten el mismo perfil MIRU.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Producción de carne de bovino en México	6
2. Producción Nacional de Leche Fluida, 2003-2011 (millones de litros).	8
3. Esquema del Sistema Producto Carne de Guanajuato	10
4. Participación en la producción de leche por estado, 2010.	11
5. Productos de amplificación de las secuencias espaciadoras.	16
6. Origen de los ecotipos del complejo <i>M. tuberculosis</i>	18
7. Dendograma de los 42 aislados de <i>M. bovis</i> provenientes del estado de Guanajuato.	32
8. Distribución de cepas por municipio en el estado de Guanajuato con el mismo perfil MIRU.	33

RESUMEN

En México la tuberculosis bovina (TBb) es uno de los principales problemas que afecta a la ganadería nacional ocasionando grandes pérdidas económicas. Es una enfermedad bacteriana crónica causada por *Mycobacterium bovis*. Actualmente, en nuestro país, la infección se diagnostica en el animal vivo por medio de la prueba de la tuberculina, la cual se ha determinado posee baja sensibilidad y especificidad. Existen diferentes técnicas de genotipificación que permiten determinar fuentes de infección y diseminación de la enfermedad. En este trabajo se utilizó la genotipificación por VTNR de 42 aislados de *M. bovis* de ganado de carne y leche del estado de Guanajuato. Los VTNR se llevaron a cabo utilizando una serie de 12 iniciadores específicos. Una vez que estos se generaron, se analizaron en la base de datos VNTRPlus para establecer la relación genética entre los aislados. La caracterización molecular por espoligotyping y MIRU-VNTR de las cepas aisladas reveló 13 genotipos, de los cuales dos fueron los de mayor prevalencia SB0673 y SB067. Los primers que mostraron mayor polimorfismo fueron 2461 y 2163b. Se obtuvieron 35 perfiles MIRU, de los cuales 4, 9, 13, 18 y 21 presentaron una mayor frecuencia entre cepas (de 4 a 2). Se obtuvo un poder discriminatorio de 0.988 para los 35 perfiles MIRU, y la diversidad alélica obtenida para cada uno de los loci fue desde 0.1 a 0.7. Cuando se realizó los análisis filogenético se generó un dendrograma en el que se observaron cuatro grupos. La distribución de un mismo perfil MIRU en diferentes regiones del estado puede ser un indicativo de su movilización hacia municipios vecinos. Esta movilización es más frecuente entre los municipios de Guanajuato y León. San Felipe, Villagrán y San Francisco del Rincón parecen tener menos intercambio de animales. El presente trabajo de investigación se realizó en INIFAP (SINASO 17195919662) y en el departamento de Epidemiología Molecular de *M. tuberculosis* de la Universidad Autónoma de Querétaro (SINASO 12462732125).

1. ANTECEDENTES

1.1 La Tuberculosis bovina

La tuberculosis bovina (TBb) es una de las zoonosis de mayor importancia en México, puesto que constituye un problema importante de salud en el ganado bovino e incluso en el hombre. Es una enfermedad infecto-contagiosa crónica causada por *M. bovis*, caracterizada por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos (Biet y col., 2005). Aunque se suele definir como una enfermedad crónica debilitante, la tuberculosis bovina puede presentar en ocasiones un curso agudo, rápido y progresivo. Cualquier tejido puede resultar afectado, pero las lesiones se observan con más frecuencia en los ganglios linfáticos (sobre todo de la cabeza y tórax), pulmones, intestinos, hígado, bazo, pleura y peritoneo (OIE, 2008). Además de afectar al ganado bovino esta micobacteria es capaz de provocar tuberculosis en el humano, lo que presenta un problema grave de salud pública (Barathur y col., 2000).

La TBb se encuentra en la lista de enfermedades con fuertes repercusiones socioeconómicas y de salud pública según la Organización Mundial de Salud Animal (FAO/OMS, 1986), lo que la convierte en uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería en México pues es un obstáculo para la movilización y comercialización internacional del ganado (Santillán, 2010). Es una enfermedad con una prevalencia alta en países en vías de desarrollo, detectándose anualmente entre 8 y 10 millones de casos nuevos en humanos alrededor del mundo, de los cuales entre 0.5 y 5% son debidos a *M. bovis*, pero en México esta cifra puede ser de hasta el 10% en la zona centro y 40% en la región fronteriza con los estados Unidos (OIE, 2008).

Algunos de los programas de control y erradicación de la TBb se basan en la tuberculinización y la eliminación de los animales reactivos a la misma; sin embargo, el comportamiento epidemiológico de la prueba ha sido una preocupación constante por sus parámetros irregulares de sensibilidad (40 a 90 %) y

especificidad (78 a 96 %), lo que predispone a la presencia de resultados falsos positivos y falsos negativos (Milian y col., 2010).

1.2 El género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* comprende más de 120 especies reconocidas, la mayoría oportunistas y patógenas (Tortoli, 2006). *Mycobacterium bovis* conjuntamente con *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* cepa BCG, y otras variantes de *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*, pertenecen a lo que se denomina el Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, las cuales resultan ser patógenas para los mamíferos (O'Reilly y Daborn, 1995; Gutierrez y col., 1997; Aranaz y col., 1999). Todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* forman una única especie, ya que comparten una homología del ADN del 99.95 % y con regiones de su genoma totalmente conservadas en cada una de ellas (Barathur y col., 2000), lo cual puede observarse en distintas características como crecimiento, composición química y potencial de virulencia (Volk y col., 1996).

1.3 Características de *Mycobacterium bovis*

Mycobacterium bovis es una micobacteria de crecimiento lento (con un tiempo de generación de 16-20 horas), microaerófila y causante de la tuberculosis en animales de sangre caliente incluyendo la mayoría de las especies de mamíferos (Smith y col., 2006), siendo clasificada como patógeno de Riesgo 3 para la salud pública (OIE., 2005).

M. bovis es un bacilo aerobio intracelular obligado, pero se ha mostrado que sobrevive en el medio ambiente, fuera de un huésped por largos periodos de tiempo bajo condiciones favorables (Fine y col., 2011). Cuando se tiñen aparecen cuentas de aspecto granular (Volk y col., 1996), no forman esporas, son inmóviles y su forma es un tanto pleoioemórfica.

El genoma de *M. bovis* es de 4'345,492 pb, con 4,003 genes que codifican para 3,952 proteínas y 50 RNAs estructurales, incluye un profago y 42 secuencias de

inserción (IS) (Acosta y col., 2009). Además contiene aproximadamente 65 % de G+C, lo que se refleja en el contenido de aminoácidos básicos de sus proteínas, en su mayoría enzimas necesarias para el metabolismo de lípidos constitutivos de su pared celular, tales como los ácidos micólicos (Garnier y col., 2003). La ausencia de mecanismos de intercambio genético, como la conjugación o la transformación se le considera como el origen de la similitud entre las especies del complejo *M. tuberculosis*. Algunas teorías suponen que evolucionaron como patógenos no hace mucho tiempo, con la aparición de los primeros homínidos en África oriental (Brosch R. 2002; Gutiérrez MC y col., 2005).

1.4 Transmisión y patogenia de la enfermedad

La transmisión de *M. bovis* puede ser directa (por secreciones nasofaríngeas), los bacilos se evaporan en el medio ambiente permaneciendo en el aire en suspensión, para luego penetrar por vía nasal en el aparato respiratorio de otro animal; otra vía de contagio es la indirecta (por medio de utensilios que lo contengan), la eliminación de la micobacteria puede ser en la leche, orina, secreciones vaginales y uterinas, o ganglios linfáticos ulcerados. El contagio de tuberculosis bovina al humano se origina generalmente por la vía digestiva, por medio del consumo de leche o de sus derivados (Abbas y col., 1999).

La enfermedad comienza con la formación de un foco primario que normalmente es el pulmón. El drenado linfático desde el foco primario causa formación de lesiones caseosas en ganglios linfáticos adyacentes; estas lesiones, conjuntamente con el foco primario, forman el complejo primario. Este complejo rara vez cicatriza, por el contrario progresa lenta y en algunas ocasiones rápidamente (Rhodes y col., 2001).

Cualquier lugar en donde se encuentren, la actividad de los bacilos estimula la formación de tubérculos. Debido al crecimiento continuo de microorganismos, estos tubérculos se agrandan, con frecuencia hasta alcanzar gran tamaño formando granulomas (se caracterizan por poseer tejido necrótico caseoso en su interior,

formados por una trama de fibrina rica en ácido hialurónico y colágeno, que contienen bacilos extracelulares en estado latente) los cuales sufren de necrosis al aumentar de tamaño. Normalmente, se encuentran lesiones agudas en el tórax y algunas veces en los ganglios linfáticos de la cabeza o intestinos. Las lesiones pueden encontrarse en muchos órganos en las etapas avanzadas de la enfermedad y en los tejidos que rara vez son afectados primariamente; por lo que la infección de la ubre, útero, riñones y meninges ocurre con frecuencia variable (Collins y Grange, 1983).

1.5 Producción de carne de bovino en México

En México, la ganadería bovina es una de las principales actividades agropecuarias, relevante por la variedad de productos obtenidos, como la carne y la leche. Se desarrolla bajo diferentes niveles tecnológicos, sistemas de manejo y finalidades de explotación, comprendiendo principalmente la producción de novillos para abasto, la cría de becerros para la exportación y la producción de pie de cría (SAGARPA, 2010).

Existe una gran variedad de razas bovinas con orientación cárnica, de las cuales varias están bien establecidas y abundan en número de cabezas y criadores; entre las principales razas se encuentran las siguientes: Hereford, Chaloais, Brahman, Nelore, Pardo suizo Europeo. La producción de carne de bovino sigue siendo una de las actividades fundamentales del sector pecuario nacional, debido a su alta contribución en el valor de la producción con el 38.3% de carne en canal dentro de la oferta de carnes en el país, así como su alta participación en la balanza comercial agropecuaria, con la exportación de becerros.

Las principales regiones ganaderas en México, de acuerdo con la SAGARPA, son:

- Regiones Árida Y Semiárida: Baja California Norte y Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, Zacatecas y parte de Tamaulipas y San Luis Potosí. Predominan las razas europeas puras como la Hereford, Angus y

Charolais, y se caracteriza por ser una región donde se desarrollan los sistemas de producción vaca-becerro y el de engorda en corral. Se basan casi exclusivamente en el pastoreo, y su producción se orienta a la cría de becerros y becerras para la exportación, o su engorda en corrales, donde se utilizan métodos y tecnologías modernas de alimentación basadas principalmente en granos. En general, los sistemas en confinamiento son tecnificados y costosos.

- Región Templada: Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Distrito Federal. Predomina el ganado cruzado con razas europeas. Gran parte de las explotaciones son extensivas, sustentadas en el pastoreo durante la época de lluvias. El sistema que predomina es el de vaca-becerro, para consumo local o para su finalización en corrales de engorda. Aquí se realiza la cría, desarrollo y engorda con sistemas de tipo extensivo.
- Región del Trópico Húmedo y Seco: Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Morelos, Nayarit, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Predominan las razas cebuínas y su cruce con europeas. Es una zona natural proveedora de becerros para engorda y finalización en corrales, así como de carne en canal para el abasto del D.F. y área metropolitana. En esta región se aprovecha la abundante producción de forrajes debido a las características ecológicas de la zona, y se produce el ganado de doble propósito (carne y leche).

En la Figura 1 se muestra la producción de carne de bovino en México, puede observarse que los estados con mayor volumen de producción son Veracruz y Guadalajara.

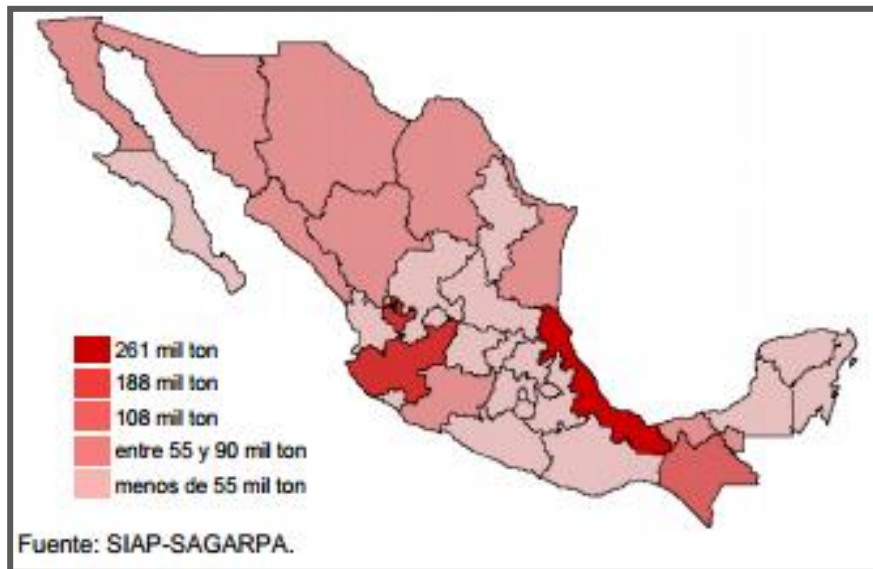


Figura 1. Producción de carne de bovino en México. Muestra los sitios con mayor producción (miles de toneladas) de carne de bovino, entre los que destacan son Veracruz, Guadalajara y Chiapas.

1.6 Producción de leche de bovino en México

En México la producción de leche de bovino es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico, incluyendo la gran variedad de climas regionales y características de tradiciones y costumbres de las poblaciones, destacando las siguientes:

- Lechería especializada. Se caracteriza por estar altamente tecnificada, con explotaciones con un promedio de 230 vientres por hato y un rango que va de 100 a 3,000 vientres por hato. Se localiza en los altiplanos del centro, norte y noroeste del país; ubicados en climas templados, áridos y semiáridos. Los sistemas de producción son mecanizados, tanto en la producción de forrajes de calidad, como en el ordeño y manejo de la leche; mantienen estabulados a los animales y los alimentan con forrajes de corte y con niveles altos de concentrados; en este tipo de explotaciones se incluyen las grandes cooperativas de productores de leche (Gasque y Blanco, 2004). Su

participación en la producción de leche a nivel nacional es del 50.6% (SAGARPA, 2004).

- Ganadería intensiva en pastoreo. Este sistema no está muy distribuido en el país, las vacas permanecen en las praderas todo el tiempo, excepto cuando van al ordeño, que se efectúa dos veces al día; la alimentación se realiza con pastos como el kikuyo o rye-grass, alfalfa o praderas de gramíneas y leguminosas, suplementando con concentrados. La tecnificación de este sistema es muy parecido al especializado. Este tipo de ganadería aporta el 21.3% de la producción nacional de leche (Gasque y Blanco, 2004; SAGARPA, 2004).
- Lechería de doble propósito. Basada en explotaciones de ganado bovino para carne, en el cual la producción de leche es una actividad secundaria. Se caracteriza por la ordeña estacional del 10% de los vientres recién paridos con mayor producción de leche. Se ubica en los trópicos húmedo y seco, y presenta una alta estacionalidad, con picos de producción en la época de lluvias. Este sistema representa el 18.3% de la producción láctea nacional (Gasque y Blanco, 2004; SAGARPA, 2004).
- Lechería familiar. Integrada por pequeñas explotaciones, caracterizadas porque los hatos son alrededor de tres y 30 vacas en promedio, las cuales generalmente son atendidas por los integrantes de la familia. Estos productores trabajan con sistemas tradicionales de producción y aprovechan esquilmos agrícolas (pajas y rastrojos de maíz, sorgo y trigo) para la alimentación del ganado. Sus instalaciones son rústicas, ubicadas en los predios de sus viviendas; el manejo de los animales es deficiente, principalmente en la higiene del ordeño, lo que resulta en la mala calidad de la leche que se vende a boteros intermediarios, queseros de la localidad, centros de acopio o directamente al consumidor. Los productores que trabajan bajo este sistema, poseen poca organización y están muy individualizados. Su aportación en la producción de leche es del 9.8% (Gasque y Blanco, 2004; SAGARPA, 2004).

Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), durante el período 2003-2011 la producción nacional de leche de bovino ha tenido una tasa media de crecimiento de 1.3%.

En la Figura 2 puede observarse la producción nacional de leche fluida durante los años de 2003 a 2011.

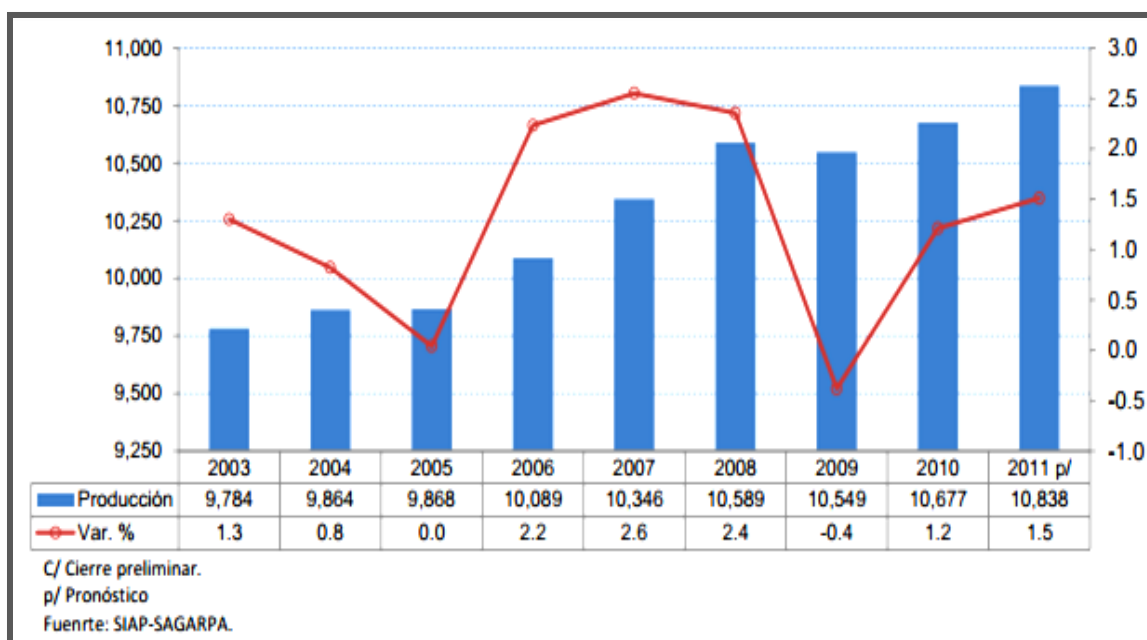


Figura 2. Producción Nacional de Leche Fluida, 2003-2011(millones de litros). Se puede observar una tendencia de crecimiento; no obstante, a pesar del crecimiento sostenido sólo contribuye a cubrir alrededor del 80% del consumo nacional.

En México, la producción lechera se desarrolla en todo su territorio, pero durante el periodo de 2005 a 2010 se concentró en cuatro estados, los que contribuyeron conjuntamente con el 45% de la producción nacional en este período (destacándose Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua). Cabe señalar, que los estados de Coahuila y Durango se encuentran ubicados en la Región Lagunera, que es la más importante cuenca lechera del país, y que ocupa el primer lugar en producción a nivel nacional.

1.7 Producción de carne de bovino en Guanajuato

En el año 2011 el estado de Guanajuato representó el 2.49% del valor total de la producción nacional de carne bovina según inferencia de los datos publicados por la SAGARPA lo que refleja un bajo nivel de importancia económica, con un total de 51 000 productores.

Como lo muestra la Figura 3, los eslabones que integran el sistema producto de la carne de bovino están representados inicialmente por productores de becerros bajo el esquema de vaca-cría, con desarrollo preponderantemente extensivo ante todo en el norte del estado; intermediarios que acopian becerros; engordadores en confinamiento intensivo principalmente en la zona del bajío cerca de las áreas agrícolas con producción de cereales, rastrojo y forrajes; introductores de ganado finalizado; transformadores; comercializadores de canales y/o piezas en caja; empacadores; comercializadores de carne y consumidor final.

En el año 2011, la SAGARPA reporta para el estado de Guanajuato, un inventario de 681,493 cabezas de bovinos carne y la producción anual de 39,565 toneladas de carne en canal con un valor de 1217 864 000, ubicando al estado en el 17vo lugar nacional por su importancia económica. Por su parte el INEGI considera la existencia estatal de 45,042 unidades de producción que poseen ganado bovino productor de carne.

La producción de becerros de razas y cruzas para carne, en el estado, se estima que es del orden de 50,000 además de alrededor de 20,000 procedentes de vacas de raza lechera. La producción estatal cubre solo el 82% de la demanda interna, por lo que es necesario importar este producto de otros estados, principalmente Jalisco, Michoacán y San Luis Potosí. Se estima que anualmente salen de la entidad aproximadamente 10,000 toneladas de carne de bovino en pie, ingresando un total de 12,000 toneladas para satisfacer la demanda interna.

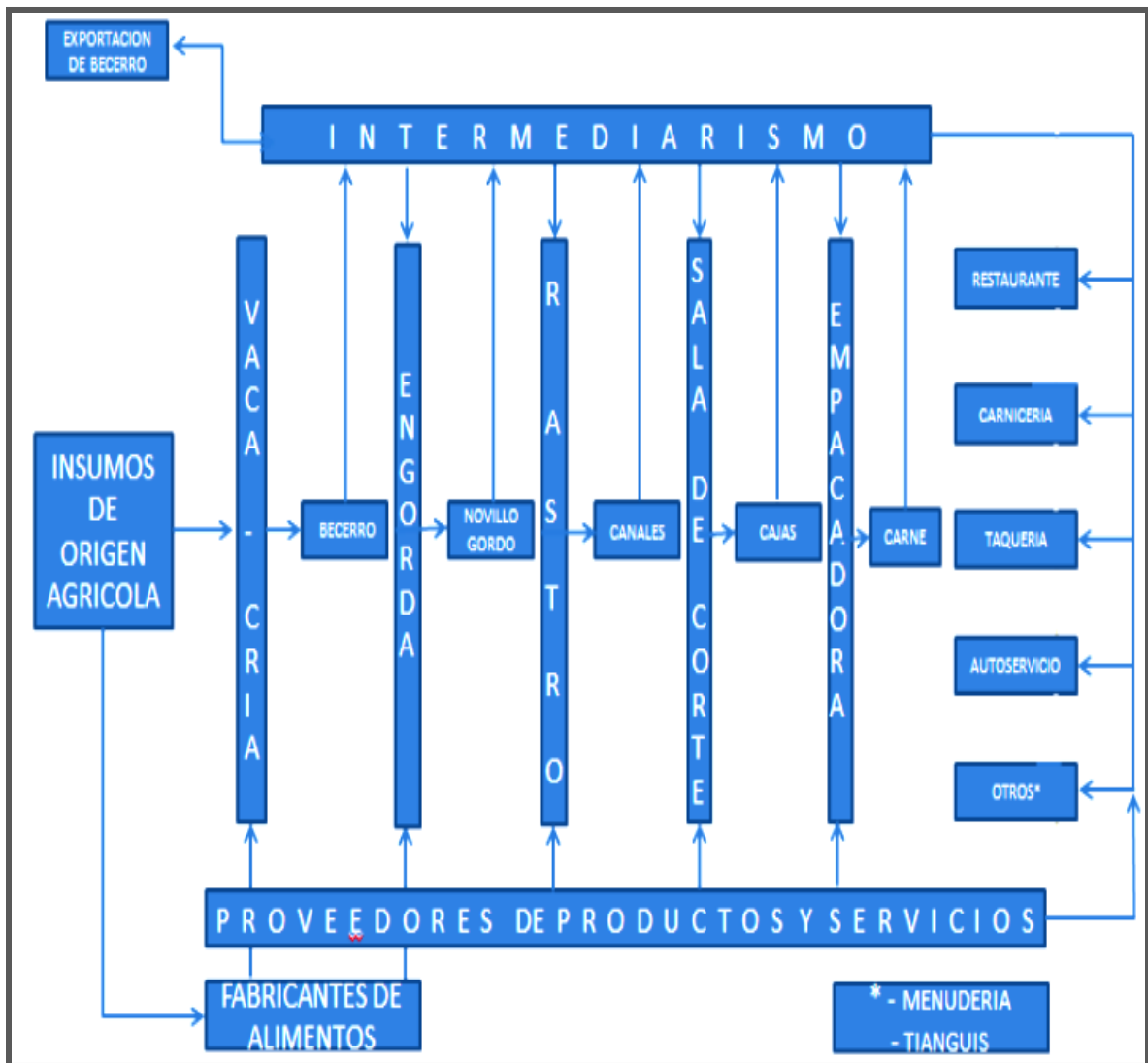


Figura 3. Esquema del Sistema Producto Carne de Guanajuato. Se muestran los principales eslabones productivos para la obtención de carne de bovino.

Fuente: SIAP/SAGARPA.

1.8 Producción de leche de bovino en Guanajuato

Para el año 2010, como puede observarse en la Figura 4, el estado de Guanajuato aportaba solamente el 7% de la producción nacional de leche. Actualmente, el estado ocupa el quinto lugar.

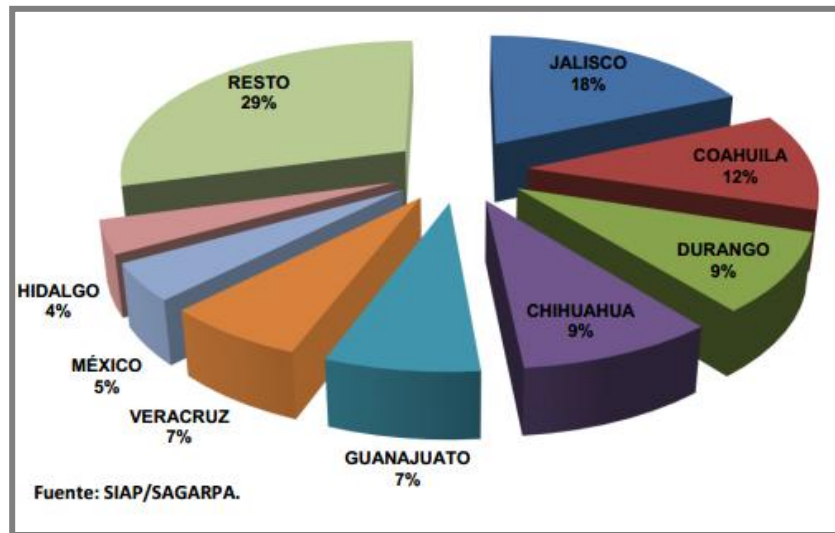


Figura 4. Participación en la producción de leche por estado, 2010. El estado de Guanajuato solo aportaba el 7% de la producción nacional.

1.9 Problemas ocasionados al sector ganadero relacionados con TBb

En México, la Tuberculosis bovina es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, no sólo porque representan un riesgo para la salud animal, sino que al ser una enfermedad de tipo crónico, ocasiona pérdidas de tipo económicas para el sector pecuario, aunado a esto, la presencia de esta enfermedad en los hatos, se convierte en uno de los principales obstáculos para la movilización y comercialización internacional del ganado (Santillán, 2010).

La participación de *M. bovis* en casos de TB humana en algunas regiones de México se ha estimado hasta en un 7% (Pérez G. y col., 2008), mientras que en la zona fronteriza sur de los Estados Unidos la proporción llega al 40% (Rodwell y col., 2008) debido al consumo de productos cárnicos y lácteos provenientes de ganado infectado, resaltando con ello la importancia de erradicar y controlar la enfermedad para asegurar la calidad y seguridad alimentaria de la población en general. Por lo anterior, esta se convierte en una limitante para el comercio afectando de forma directa los canales tradicionales internos de comercialización de animales (Acosta y col., 2009).

El riesgo de transmitir la TBb de los bovinos al ser humano se ha reconocido desde hace mucho tiempo y, en consecuencia, se ha instituido la práctica sistemática de pasteurizar la leche para eliminar el agente etiológico. En México, el riesgo se explica por la elevada prevalencia de la enfermedad en el ganado lechero ($\approx 16\%$), la falta de participación de los establos lecheros en campañas de erradicación y el hecho de que 30 a 40% de la leche que se produce se vende en la forma de leche bronca.

1.10 Métodos de diagnóstico

En México el diagnóstico de tuberculosis en animales en pie se realiza de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, mediante la prueba de tuberculina, la cual consiste en la inyección de un derivado proteico purificado (PPD) que pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad previo del organismo frente a dicha sustancia. El principal inconveniente del PPD radica en que las proteínas utilizadas no son específicas del *M. tuberculosis*, sino que estas son compartidas entre micobacterias no tuberculosas y *M. bovis*, por lo que se requiere de la implementación de un método diagnóstico más eficiente (Guillén, 2011). Cuando se requiere mayor sensibilidad, como en casos de alta prevalencia, se aplica en el pliegue caudal y para el caso de requerir mayor especificidad (baja prevalencia), se utiliza la doble comparativa en el cuello. No obstante, como todas las pruebas de diagnóstico, la prueba de tuberculina tiene fallas (Francis J. y col., 1978; Costello E. y col., 1997). Los diagnósticos falsos positivos generan problemas económicos y sociales, ya que conforme a la Norma Oficial Mexicana (NOM, 1995) los animales reactores positivos a la prueba se deben sacrificar. Es considerado un método práctico, si se utiliza conjuntamente con la histopatología, para identificar lesiones compatibles con presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes a la tinción de Zihel-Neelsen (Corner, 1994). Para el diagnóstico definitivo se envían muestras de estas lesiones al laboratorio de bacteriología. Sin embargo, el diagnóstico de TBb mediante el cultivo de *M. bovis* representa una verdadera barrera de tiempo, dinero y esfuerzo, ya que para su desarrollo se requiere mínimo de 4 a 8 semanas, además la sensibilidad y selectividad del cultivo

es menor de 60%, pudiendo ocurrir resultados falsos negativos. Debido a los problemas asociados al aislamiento de esta micobacteria, se ha considerado confirmar el diagnóstico de TBb mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar fragmentos de ADN en el genoma de bacterias del complejo *M. tuberculosis*. La PCR para el gen que codifica la proteína MPB70 ha mostrado buena sensibilidad y excelente especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y bovinos (Cousins y col., 1992). Se ha demostrado presencia de una sola copia de este gen en cepas de *M. bovis* y bacterias del complejo *M. tuberculosis*, así como su ausencia en 24 especies diferentes de micobacterias y en otros géneros bacterianos (Cousins y col., 1991).

Otro de los métodos más comúnmente utilizados es la inspección *post-mórtem* en rastro, el cual se basa en la búsqueda de lesiones compatibles con TBb, especialmente en nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio. Esto es realizado una vez que el animal es sometido primeramente a la prueba de la tuberculina. La inspección de canales también se lleva a cabo para la identificación de tuberculosis miliar, lo cual puede darse a lo largo del tracto digestivo al ingerir el bacilo (Corner, 1994).

Tras la muerte, se diagnostica mediante necropsia, técnicas histopatológicas y bacteriológicas. También se pueden utilizar técnicas relacionadas a la búsqueda de marcadores en sus ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pero estas son técnicas exigentes y sólo se deben utilizar procedimientos validados, por lo que el cultivo bacteriano tradicional continúa siendo el método rutinario de confirmación de la infección (OIE, 2008).

1.10.1 Genotipificación como método de diagnóstico

La genotipificación de las micobacterias se basa en el principio de la estabilidad genética por su reproducción asexual, donde una bacteria da origen a clonas: bacterias con la misma información genética. De este modo, se deduce que cepas de micobacterias con idéntico genotipo tienen el mismo origen y que cepas con

genotipo diferente provienen de lugares diferentes (Durr y col., 2000). La rastreabilidad, con el principio de estabilidad genética, permite determinar si un animal recientemente introducido es el causante de un brote de tuberculosis. Asimismo, se puede analizar si el brote derivó de la reactivación de la infección latente en animales falsos negativos, desapercibidos por la falta de sensibilidad del diagnóstico o si proviene de la infección en reservorios silvestres. No obstante, las bacterias son susceptibles de experimentar mutaciones después de un número indeterminado de replicaciones, que si éstas no afectan el funcionamiento de enzimas esenciales o de proteínas estructurales, permiten la sobrevivencia de las bacterias y la herencia del cambio a su descendencia, dando origen a nuevas líneas genéticas (Acosta y col., 2009).

La genotipificación requiere marcadores polimórficos que definan diferencias sutiles entre las diversas cepas. Algunos de estos marcadores son capaces de detectar polimorfismos y distinguir a la cepa como una clona diferente, pero no todos los marcadores son capaces de detectar dichas diferencias. Por lo tanto, para genotipificar cepas de micobacterias se debe de considerar el cambio que cada marcador es capaz de detectar de manera efectiva. Se deben seleccionar marcadores genéticos dependiendo de su tasa de mutación (Haddad y col., 2004; Olive y col., 1999), ya que si el reloj molecular de la mutación marcada es demasiado rápido (≤ 2 años), existe el riesgo de que el número de cepas sea sobre-estimado y si es muy lento (≥ 100 años) el riesgo es de una subestimación. Por lo tanto, el marcador ideal debe ser de estabilidad media, capaz de discriminar cepas sin sesgos severos en la estimación (Kremer y col., 1999).

La importancia de la tuberculosis como una enfermedad re-emergente ha favorecido el desarrollo de numerosas técnicas de genotipificación para *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Algunas de estas técnicas involucran todo el genoma en el análisis, otras necesitan gran cantidad de ADN de buena calidad (≥ 1 μ g), lo que representa un problema por el lento crecimiento de las bacterias. Por otro lado, existen técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus

siglas en inglés) para el análisis de *loci* polimórficos que tienen mayor poder de discriminación, requieren una cantidad mínima de ADN (<1 ng) y permiten amplificar muestras con microorganismos poco viables o imposibles de recuperar, como es el caso de las micobacterias latentes (Durr y col., 2000; Haddad y col., 2004).

1.10.2 Genotipificación con endonucleasas de restricción.

Una de las primeras técnicas de genotipificación en los organismos es la antes denominada huella genética o fingerprint, que consiste en obtener patrones de bandeo a partir del DNA genómico cortado con endonucleasas de restricción; por ejemplo, PvuII o AluI (Aranaz y col., 1998; Collins y col., 1993; Singh y col., 2004). Esta técnica involucra el análisis del genoma completo de la micobacteria, donde se utilizan endonucleasas con secuencias consenso de corte poco frecuente, lo que produce fragmentos largos (30 a 50 kb). Estos fragmentos son separados mediante electroforesis en campos pulsados (≈18 h). Lo laborioso del proceso de este tipo de tipificación y la gran cantidad de ADN requerida ha provocado su desuso. Esta técnica es comúnmente conocida como fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) y ha sido ampliamente utilizada para relacionar brotes de tuberculosis a focos de infección específicos o estudiar la transmisión de la enfermedad entre especies (Fauville, 2006; Costello y col., 2006; Skuce y col., 1996). Las sondas utilizadas han sido dirigidas contra diversos blancos, entre las más frecuentes para *M. tuberculosis* están: IS6110, RFLP-PGRS y RFLP-DR.

1.10.3 RFLP-IS6110

El RFLP-IS6110 es el método más usado debido a que analiza al elemento IS6110 integrado en diversos *loci* del genoma de las especies que comprenden el complejo *M. tuberculosis*, comúnmente en hot spots, tales como: las secuencias de repetición directa (DR), el *locus* *ipl* y la región intergénica *dnaA-dnaN*. Este marcador es considerado estándar de oro para la evaluación de nuevos métodos de tipificación de cepas de *M. tuberculosis*. Algunas cepas de *M. tuberculosis* llegan

a presentar hasta 25 copias. En la IS6110 existe una secuencia consenso para la PvuII por lo tanto, al cortar el ADN de las micobacterias se forma un patrón de bandas específico que depende del número de copias y los cortes en el genoma (Figura 5) (Acosta y col., 2009).

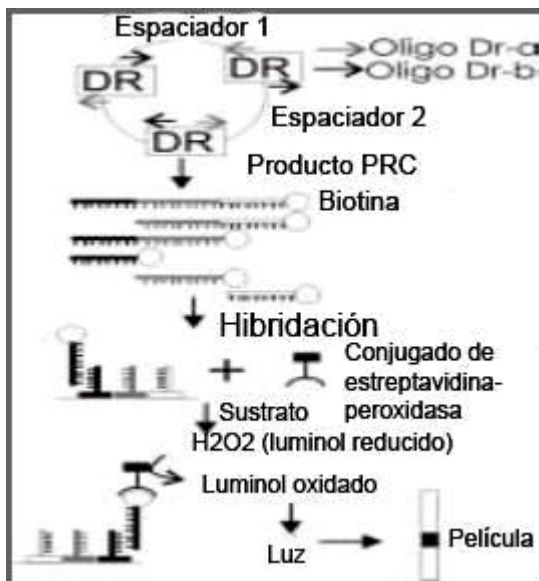


Figura 5. Productos de amplificación de las secuencias espaciadoras. Los productos de amplificación de las secuencias espaciadoras entre los repetidos directos son hibridados con sus secuencias complementarias inmovilizadas en una membrana y detectados por quimioluminiscencia. Fuente: Hass's talk, MTET Course 2005- 2006. Pasteur Institute.

El número y la localización de las copias de IS6110 hacen del RFLP un buen método de tipificación para *M. tuberculosis*, sin embargo, en el caso de *M. bovis* presenta algunas limitaciones, dado que esta micobacteria presenta entre una y cinco copias; comúnmente localizadas en el locus DR, dependiendo de la especie de origen. Esto, aunado a que se requieren grandes cantidades de ADN puro y a la necesidad de personal calificado, hacen de éste un método poco útil para tipificar cepas de *M. bovis*. Además, la estabilidad y la rastreabilidad del RFLP-IS6110 es dudosa: el cambio de una o más bandas es frecuente en aislamientos de pacientes cuya re-infección era poco probable, sugiriendo que su reloj genético es de

aproximadamente 3.2 años. En un intento por compensar esta inestabilidad se agrupan cepas con una banda de diferencia, pero la interpretación inter-laboratorios es muy variable (Michel y col., 2008; Roring y col., 1998; Zanini y col., 2005).

1.10.4 Polimorfismo de secuencias ricas en GC (PGRS)

En cepas de bacterias del complejo *M. tuberculosis*, con pocas copias del IS6110, se recurre al análisis de otras regiones distribuidas múltiples veces en su genoma: tal es el caso de aquéllas ricas en las bases guanina y citocina (G+C, ≈66 %) agrupadas en secuencias repetidas cortas de 24 pb, llamadas secuencias polimórficas ricas en GC (PGRS) (Santillán y col., 2006). Para identificar este tipo de secuencias se digiere el ADN con AluI y los fragmentos obtenidos se hibridan con el plásmido pTBN12, que contiene una secuencia PGRS clonada de 3.8 Kb del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 6). La estabilidad reportada de este marcador es de aproximadamente 3.5 años, similar a la observada para IS6110 y con los mismos problemas técnicos. Una desventaja adicional es que las PGRS no son específicas del complejo *M. tuberculosis* y en *M. bovis* su interpretación es más complicada, pues aunque es más sensible para diferenciar entre aislamientos con una sola copia de IS6110, por lo general muestra patrones de bandeo de polimorfismo moderado, es menos reproducible y sumamente laboriosa (Costello y col., 1999; Skuce y col., 1996; Michel y col., 2008).

1.10.5 Genotipificación con PCR

Los métodos de tipificación basados en la PCR tienen la característica de requerir cantidades mínimas de ADN, incluso parcialmente degradado y mezclado con ADN de otras especies, la cual puede ser amplificada haciendo más factible, rápida, estable y versátil la genotipificación. En el caso de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* se hicieron intentos por amplificar las regiones descritas en RFLP, pero los múltiples problemas experimentados, principalmente la pobre reproducibilidad, hicieron que se desechara la idea de los PCR-RFLP (Glennon y col., 1997; Gutiérrez y col., 1995).

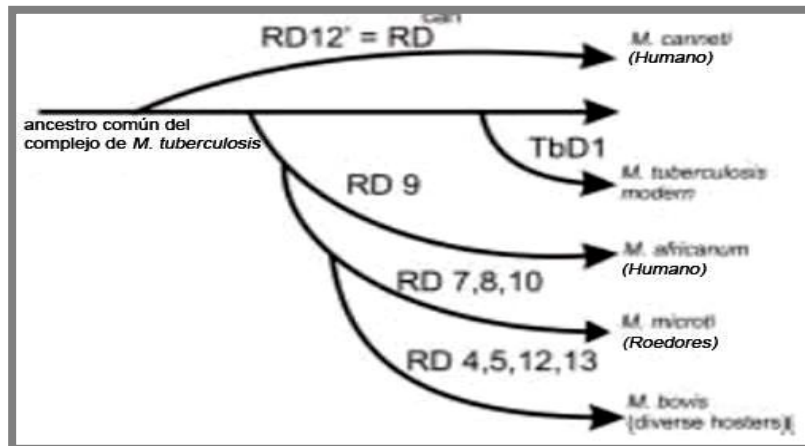


Figura 6. Origen de los ecotipos del complejo *M. tuberculosis*. En esta figura se muestran las regiones perdidas durante el proceso de evolución de estas bacterias, así como sus hospederos.

1.10.6 Tipificación de oligonucleótidos espaciadores (Spoligotyping)

En la actualidad una de las técnicas más utilizadas para la genotipificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* es *Spoligotyping*. Este método se basa en la presencia o ausencia de variantes de DR (DVR, por sus siglas en inglés). Las DVR se componen de una secuencia repetida de 36 pb conservada y de una secuencia espaciadora variable de 35 a 41 pb: el blanco de la tipificación es esta región variable. A la fecha se han reportado 94 diferentes espaciadores entre los DR: el cromosoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv tiene 48 DVR y el de *M. bovis* BCG 41. De este modo, para la genotipificación se utilizan de manera rutinaria 43 espaciadores, 37 de H37Rv y 6 de BCG. Como ya se mencionó, las secuencias de inserción IS6110 se integran preferencialmente en este tipo de *hot spots*, favoreciendo la delección de espaciadoras, ya sea por inserción asimétrica o por escisión de las secuencias IS6110 (Caimi y col., 2001; Cobos y col., 2005; Fillio y col., 2003; Javed y col., 2007).

El método de *Spoligotyping* inicia con una PCR donde se utiliza un par de oligonucleótidos complementarios a la región conservada de los DVR, de modo que a partir de ahí se inicie la amplificación de las regiones espaciadores. A los

productos de la PCR se les hibrida con cada una de las 43 secuencias complementarias conocidas, previamente fijadas en una membrana de Nylon. Para discriminar los diversos espaciadores amplificados, uno de los oligonucleótidos está marcado con biotina. Finalmente, los puntos de hibridación serán revelados con un conjugado de estreptavidinaperoxidasa, que se une a la biotina para formar un complejo luminoso al agregar el sustrato luminol. Como se observa en la figura 4, la reacción enzimática que se produce es capaz de quemar una placa radiográfica, en el punto que corresponde a cada espaciador hibridado, determinando los espaciadores presentes o ausentes en cada una de las cepas (Aranaz y col., 1998).

La presencia o ausencia de espaciadores, permite crear bases de datos sencillas, con un código binario de 1 (presencia) y 0 (ausencia), las cuales sirven para formar matrices que más tarde son utilizadas en diferentes tipos de análisis filogenéticos para determinar grupos de cepas de similitud genética. Estas matrices de 0 y 1 pueden ser utilizados para hacer códigos que se pueden transformar en octales, agrupando los patrones binarios de 3 en 3 y asignándoles un nuevo valor del 0 al 7, donde 0 corresponde al código 000 y 7 al 111. La codificación permite comparar fácilmente el genotipo de cepas aisladas en diversos laboratorios en diferentes partes del mundo (Acosta y col., 2009).

El polimorfismo generado por *Spoligotyping* tiene una reproducibilidad alta, dentro de y entre los laboratorios, y una estabilidad media de 10 a 20 años, lapso durante el cual se espera que las cepas mantengan sus códigos. Esta y otras técnicas de genotipificación basadas en la PCR, tienen como ventajas la rapidez, la sencillez y el requerimiento de poco ADN de calidad media. Además, el *Spoligotyping* permite el diagnóstico y genotipificación de bacterias del complejo *M. tuberculosis* directamente de muestras clínicas (Acosta y col., 2009).

1.10.7 Secuencias repetidas en serie de número variable (VNTR)

Estos marcadores genéticos, antes denominados minisatélites, se identificaron inicialmente en seres humanos, donde han tenido su mayor aplicación en pruebas

forenses y de paternidad (Frothingham y Meeker- O'Connell 1998; Gascoyne y col., 2001). Los VNTR son secuencias repetidas en tándem de número variable dispersas en el genoma, cuyo polimorfismo se origina por adición o delección de secuencias repetidas. Esta técnica tiene un poder de discriminación similar al observado para la técnica de IS6110-RFLP y permite la obtención de resultados reproducibles en cepas con menos de seis copias del elemento de inserción IS6110 (Supply y col., 2006). Para identificar un VNTR se amplifica su secuencia por PCR con oligonucleótidos complementarios a secuencias específicas en sus flancos. El tamaño del amplicón revela el polimorfismo del VNTR y puede expresarse como el número de secuencias repetidas que contiene, permitiendo almacenar códigos numéricos comparables entre diversos laboratorios y crear bases de datos de fácil acceso. Usando VNTR se han genotipificado diversos microorganismos, entre ellos: *M. leprae*, *M. ulcerans*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* (Ablordey y col., 2005).

Actualmente por la reproducibilidad, precio y rapidez del análisis por VNTR para la genotipificación del complejo *M. tuberculosis*, está siendo ampliamente utilizado para el estudio de brotes epidemiológicos específicos en varios países, contándose además con bases de datos que contienen los perfiles de más de 20 loci en muchos aislados alrededor del mundo, los cuales sirven para la comparación y establecimiento de relaciones filogenéticas y epidemiológicas con los aislados que van analizándose en nuevos estudios (Weniger y col., 2010).

En el presente trabajo de tesis se realizó la genotipificación de 42 aislados de *Mycobacterium bovis* por medio de la técnica de VTNR a partir de muestras obtenidas entre los años 2009-2010 en ganado del estado de Guanajuato. La genotipificación se realizó utilizando una serie de 12 iniciadores específicos.

2. JUSTIFICACIÓN

En nuestro grupo hemos identificado los espoligotipos de 42 cepas de *M. bovis* obtenidas a partir de ganado del estado de Guanajuato. Estos espoligotipos se establecieron en un proyecto soportado económicamente por SENASICA en ganado de leche y de carne, pero un cambio en las políticas de la SAGARPA ha dejado este trabajo inconcluso. La información que hemos obtenido ha facilitado el entendimiento más a detalle de la epidemiología molecular de la enfermedad, sin embargo; es necesaria la generación de información de los patrones específicos de los espoligotipos mediante la técnica MIRU-VNTR's para incrementar nuestro poder de discriminación molecular y establecer con ello los genotipos para identificar los potenciales focos de infección y rutas de diseminación, con lo que se podría implementar nuevas estrategias para controlar la enfermedad y evitar la subsecuente contaminación del ganado y sus productos derivados en el estado de Guanajuato.

3. HIPÓTESIS

La genotipificación de aislados de *M. bovis* en ganado bovino del estado de Guanajuato por medio de la técnica de VNTR proporcionará información epidemiológica que identifique los posibles focos de infección y rutas de diseminación de la tuberculosis bovina en el estado de Guanajuato.

4. OBJETIVOS

4.1 General

Identificar los genotipos de aislados de *Mycobacterium bovis* obtenidos a partir de ganado bovino del estado de Guanajuato.

4.2 Específicos

- Genotipificar 42 aislados de *M. bovis* provenientes de ganado del estado de Guanajuato.
- Evaluar diferencias y/o similitudes genéticas entre las cepas aisladas.
- Comparar los patrones obtenidos con sus espoligotipos.
- Establecer patrones de distribución de los aislados estudiados.
- Generar datos que proporcionen información acerca de la epidemiología molecular de *M. bovis* en el estado de Guanajuato.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materiales

En este trabajo se realizó la genotipificación de 42 aislados de *M. bovis* obtenidos entre los años 2009-2010 a partir de ganado bovino para la producción de carne y leche del estado de Guanajuato y de los cuales ya se tenían previamente sus espoligotipos. La genotipificación por VNTR's se realizó utilizando una serie de 12 iniciadores específicos, mostrados en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores a utilizar para la identificación de los VNTR

VNTR	Sentido (5' – 3')	Antisentido (5' – 3')
0424	CTTGCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
0577	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG
1644	TCGGTGATCGGGTCCACTCCAAGTA	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
1955	AGATCCCAGTTGTCGTCGTC	CAACATCGCCTGGTTCTGTA
2165	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
2401	ACTTGAACCCCCACGCCCATTA	AGCCCCGGTCTCATCTGTCACA
2461	GCGAACACCAGGACAGCATCATG	GGCATGCCGGTGATCGAGTGG
2686	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
2995	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	CATAGGCGACCAGGCGAATAG
3192	CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC	CGGAACGCTGGTCACCACCTAAG
4052	AACGCTCAGCTGTCCGAT	GGCCAGGTCCTTCCCGAT
2163b	CGTAAGGGGATGCGGGAAATAGG	CGAAGTGAATGGTGGCAT

5.2 Métodos

Los iniciadores se reconstituyeron para tener una solución stock a una concentración final de 200 µM (en buffer de TE 0.5X o agua grado biología molecular), se realizaron alícuotas las cuales fueron almacenadas a -20 °C y

protegidas de la luz para evitar su degradación. La alícuota utilizada se descongeló para su uso y se guardó a 4 °C. Las concentraciones de los reactivos utilizados en cada reacción de PCR se ajustaron a un volumen final de 10 µl (Tabla 2. Aphis., 2009). Posteriormente cada reacción de PCR se sometió a un protocolo de termociclado compuesto por una etapa de desnaturalización de 95 °C/10 minutos; posteriormente una etapa de amplificación de 35 ciclos a 95 °C/30 segundos (mantenimiento de cadenas de ADN abiertas), 55 °C/1 minuto (alineación de primers en el DN molde) 75 °C/1:30 minutos (extensión del amplicón), finalmente se mantuvo a 75 °C/10 minutos para la extensión final.

5.2.1 Extracción de ADN

Se tomaron 100 mg del cultivo de la cepa y se colocaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 0.2 ml de TE 1x, se incubaron en baño María a 95 °C durante 45 minutos para lisar la micobacteria y se libere el material genético. Posteriormente se realizó la cuantificación del ADN en un equipo Nanodrop, se evaluó su calidad en gel de agarosa al 1% y se ajustaron las concentraciones a 10 ng/microlitro (100 ng aproximadamente) de material para la realización de la PCR.

5.2.2 Preparación de la PCR

Los iniciadores se reconstituyeron para tener una solución stock a concentración final de 200 µM (en buffer de TE 0.5X o agua grado PCR) se realizaron alícuotas, se protegieron de la luz y se guardaron a -20°C. La alícuota que se descongeló para su uso fue guardada a 4°C posteriormente. Una vez reconstituidos y descongelados, se prepararon las mezclas para realizar la PCR multiplex con los volúmenes adecuados de cada uno de los iniciadores tanto del “forward” como del “reverse”. Las concentraciones de los reactivos a usar para preparar cada reacción de PCR deben ajustarse a un volumen final de 10 µl. Una vez ajustadas las cantidades de los reactivos se colocaron los tubos de la reacción en el termociclador y se sometieron a un protocolo compuesto de un primer ciclo de

desnaturalización a 95 °C/10 minutos; Amplificación: 35 ciclos a 95°C/30 segundos, 55 °C/ 1 minuto (alineación) 75°C/1:30 minutos (extensión), finalmente se mantuvo a 75°C/10 minutos para la extensión final de la cadena.

En el Cuadro 2 se muestra de forma resumida las concentraciones de los reactivos que se utilizarán para la preparación de las reacciones de PCR.

Cuadro 2. Concentraciones de reactivos para las reacciones de PCR

Reactivo	Stock	Blanco []	µl x reacción
Buffer 10X	10X	1X	1
MgCl ₂	25Mm	2.5mM	1
dNTP	2.5Mm	0.25mM	0.8
Mezcla iniciadores	10 µM	1µM	1
Taq Polimerasa	5U/µl	0.25U/µl	0.05
ADN	-	2 µl	2
Agua	-	Cbp	4.15
Vol. Final			10

5.2.3 Evaluación en gel

La evaluación de los fragmentos se realizó mediante un corrimiento electroforético de un gel de 30 ml de agarosa al 3% teñido con 1.5 microlitros de bromuro de etidio para separar fragmentos en un rango de 50 pb a 1000 pb o al 1% para separar fragmentos mayores a 1000 pb. A los fragmentos obtenidos se les evaluó el tamaño del producto para obtener el número de copias y se generó un código numérico que representa las veces que se encuentra expresado un *loci* en particular en cada uno de los aislados.

6. RESULTADOS

6.1 Genotipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*

Se analizaron un total de 42 aislados provenientes del estado de Guanajuato, mediante MIRU-VNTR utilizando los 12 primers específicos mencionados anteriormente. 25 de estos aislados provenían de ganado destinado a la producción de leche, 3 de ellos a la producción de carne y del resto no se obtuvo información sobre su propósito.

La caracterización molecular por espoligotyping y MIRU-VNTR de las cepas aisladas reveló 13 genotipos, de los cuales dos fueron los de mayor prevalencia SB0673 y SB067 (Cuadro 3 y 4).

En los Cuadros 3 y 4 se pueden observar los diferentes números de copias obtenidas al analizar las bandas correspondientes de cada locus. Los primers que mostraron mayor polimorfismo fueron 2461 y 2163b. Se obtuvieron 35 perfiles MIRU al utilizar los doce primers. Algunas cepas comparten el mismo espoligotipo, pero poseen distinto patrón VNTR, lo cual confirma que esta técnica posee un alto poder de discriminación.

Con la base de datos generada, se puede observar que se algunas cepas coinciden en el número de repeticiones en uno o varios MIRU-VNTR, sin embargo existen diferencias entre otros. Los perfiles MIRU compartidos por dos o más cepas fueron el número 4, 9, 13, 18 y 21; el resto de ellos solo presenta un perfil único. En el Cuadro 3 se muestran algunos ejemplos: las cepas gto5799, gto5797, gto752 y gto533 (ilustradas en color rojo) comparten el mismo perfil MIRU-VNTR.

Por otra parte, se calculó el poder de discriminación para todos los MIRU-VNTR, y luego para cada alelo en particular. Para ello se utilizó el “Calculador de poder de discriminación” disponible en http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/ el cual se basa en el índice de diversidad genética de la fórmula de Simpson.

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

Se obtuvo un poder discriminatorio de 0.988 para los 35 perfiles MIRU obtenidos.

En el Cuadro 5 se muestra el número de ocurrencias para cada perfil alélico por VNTR así como el poder de discriminación. La diversidad alélica obtenida para cada uno de los loci fue desde 0.1 a 0.7. El locus que presentó mayor poder discriminatorio fue 2461 (D= 0.7), seguido de 2163b (D= 0.65). 1644, 2165, 577 y 1955 mostraron un poder discriminatorio moderado; mientras que 424 (D= 0.2), 2401 (D= 0.14) y 2686 (D= 0.1) obtuvieron el poder discriminatorio más bajo.

Cuadro 5. Diversidad alélica de cada VNTR en los 42 aislados de *M. bovis*

VNTR	Número de ocurrencias para cada perfil alélico por VNTR									D
	0	1	2	3	4	5	6	7		
2165	1	14	27							0.5
3192	2	3	37							0.33
1955	10	2	*	30						0.45
1644	20	*	1	21						0.57
577	29	*	5	7	1					0.5
2163b	1	1	10	8	22					0.65
2461	21	3	2	5	8	3				0.7
424	2	*	*	1	38	1				0.2
4052	2	*	1	4	34	*	1			0.45
2686	*	1	40	1	*	*	*			0.1
2401	*	1	1	39	*	*	*	1		0.14
2995	*	*	*	1	2	37	2	*		0.33

Cuando se realizó los análisis filogenético de los 42 aislados, utilizando los doce loci anteriormente mencionados, se generó un dendrograma en el que se observan cuatro grupos (Figura 7).

El análisis de clusters indica una alta similitud de espoligotipos dentro de los grupos, lo que sugiere que la mayoría de los espoligotipos son derivados de los espoligotipos de mayor frecuencia en cada uno de los grupos.

El grupo 1 está conformado por 14 cepas, de las cuales 10 corresponden al municipio de Guanajuato, 2 provenientes de León, 1 de San Miguel de Allende y 1 de San Felipe, sugiriendo así que cepas provenientes del mismo municipio o municipios vecinos comparten el mismo espoligotipo. El mismo patrón puede observarse en los grupos restantes.

El Cuadro 6 muestra el lugar de origen (municipio) de las cepas de *M. bovis* que presentaron el mismo perfil MIRU. Los perfiles MIRU compartidos variaron desde 2 a 4 cepas.

Cuadro 6. Lugar de origen de los aislados que comparten el mismo perfil MIRU

Cepa	Lugar de origen	Perfil MIRU
gto5796	León	4
gto5797	León	4
gto752	Guanajuato	4
gto533	Guanajuato	4
gto5799	León	9
gto732	Guanajuato	9
gto501	San Miguel de Allende	13
gto2655	San Francisco del Rincón	13
gto849	San Miguel de Allende	18
gto317	Guanajuato	18
gto357	San Felipe	21
gto522	Villagrán	21

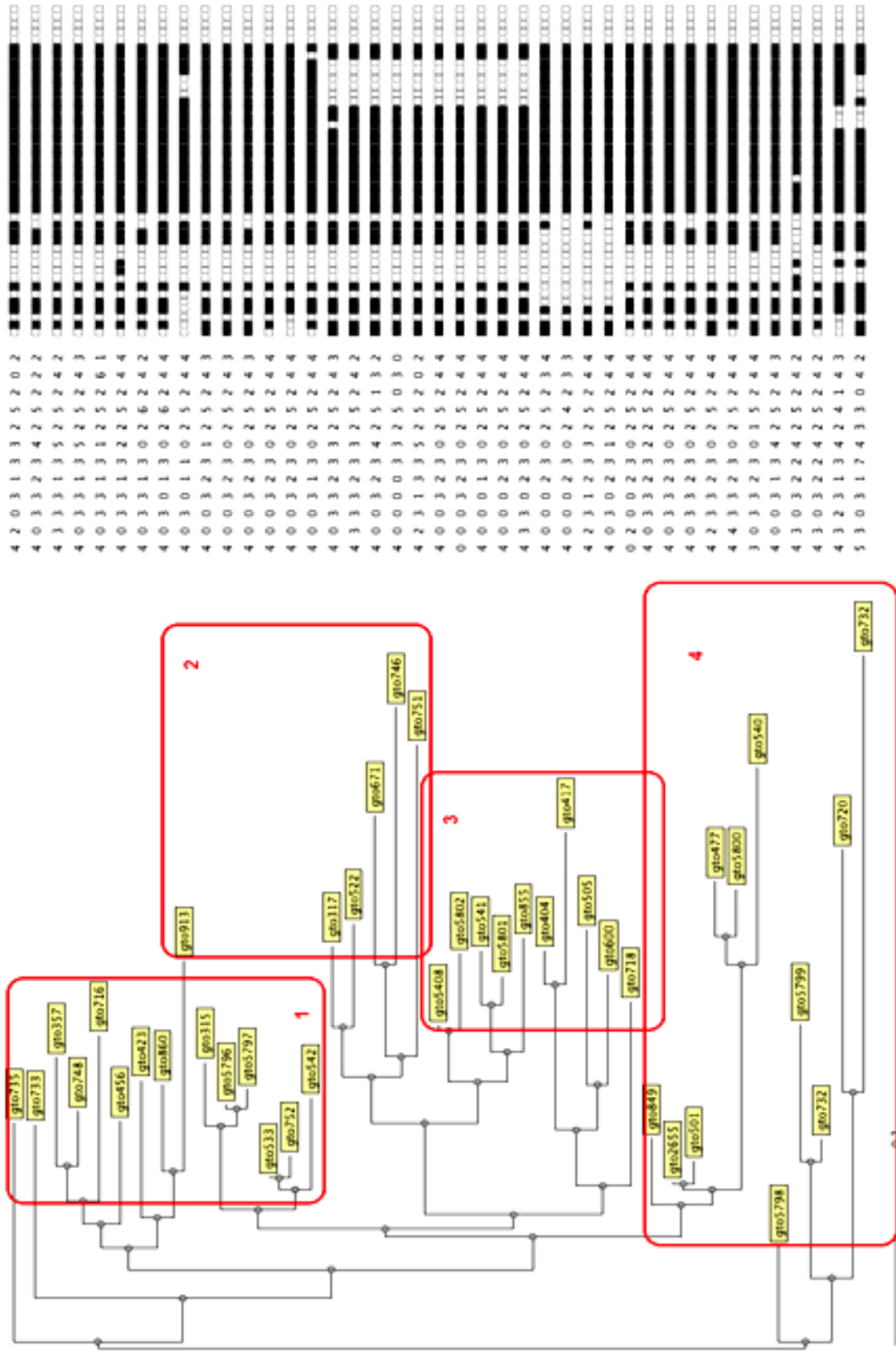


Figura 7. Dendrograma de los 42 aislados de *M. bovis* provenientes del estado de Guanajuato

En la Figura 8 se muestra la distribución en el estado de Guanajuato de los principales genotipos MIRU compartidos entre dos o más cepas, y los municipios entre los que estas circulan.

El municipio predominante fue Guanajuato seguido de León, poniendo en evidencia estas dos localidades como posibles focos de infección en el estado.

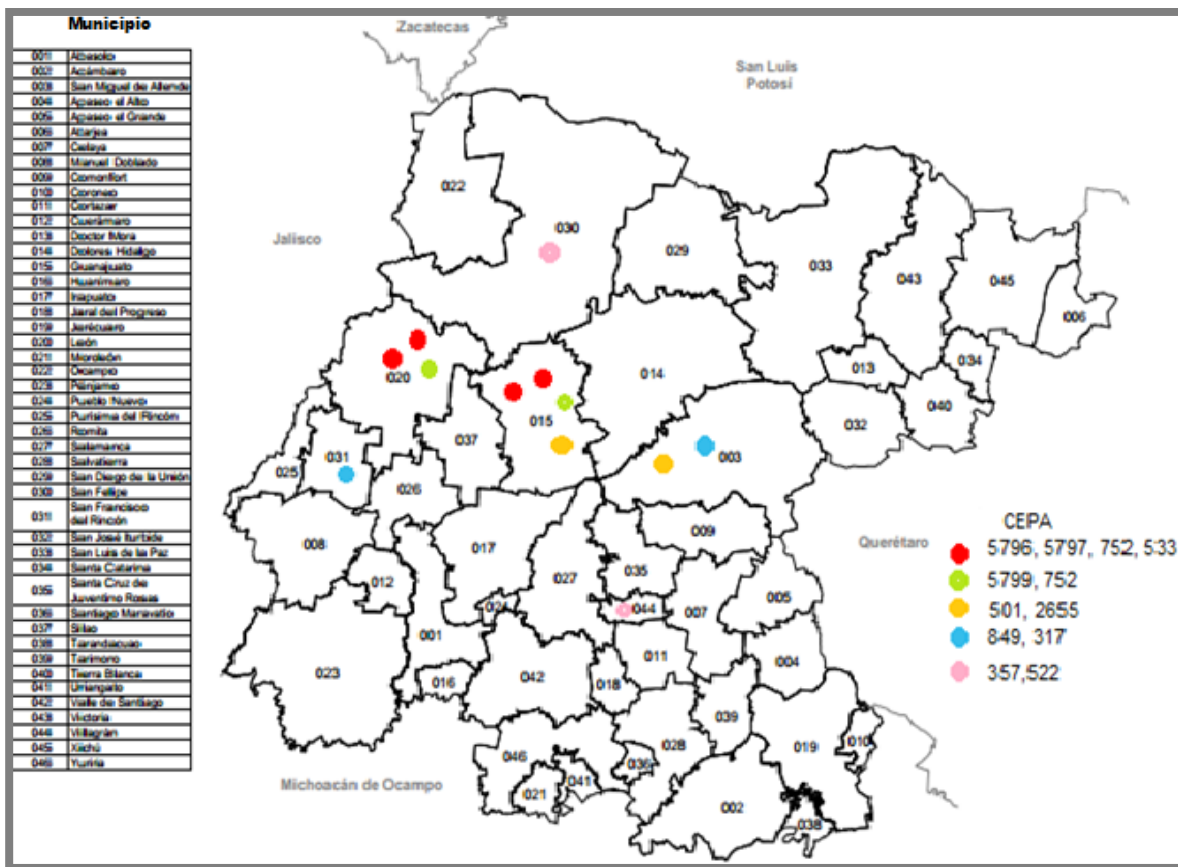


Figura 7. Distribución de cepas por municipio en el estado de Guanajuato con el mismo perfil MIRU.

7. DISCUSIÓN

En un estudio realizado en México sobre la diversidad genética y distribución de cepas de *M. bovis*, reveló que de un total de 872 aislados, los Estados que mayor cobertura tuvieron en términos de número de aislados fueron Jalisco (n=153), el Estado de México (n=110), Hidalgo (Tizayuca, n=106), Aguascalientes (n=78), Querétaro (n=71), Baja California (n=55), Guanajuato (n=51) y Coahuila (n=48); el resto tuvo entre 23 y 1 aislados. El 66 % (n=585) provinieron de ganado especializado en leche, el 7.5 % fueron de cruces de otras razas con ganado especializado en leche, el 4 % de ganado especializado en carne y del 21 % no se obtuvo información. Aunque en general se observa una gran diversidad regional de espoligotipos, en algunos de ellos se observa cierta regionalización (Milián y col., 2012).

En el presente trabajo de tesis, único de su tipo en el estado, se tipificaron 42 aislados de *M. bovis* de ganado bovino de carne y leche provenientes del estado de Guanajuato, predominando aquellos que son destinados a la producción de leche, lo cual concuerda con lo reportado por Milián y col.

La presencia de espoligotipos idénticos en ganado especializado en leche y ganado para carne, indica transmisión de tuberculosis de una raza de ganado a la otra, lo cual puede tener serias repercusiones epidemiológicas por razones de comercialización y de exportación de ganado (Milián y col., 2012). Aunque la mayoría de aislados provenían de ganado especializado en leche, también se encontraron espoligotipos idénticos en ambas razas.

Con la base de datos generada, se puede observar que se algunas cepas coinciden en el número de repeticiones en uno o varios MIRU-VNTR, sin embargo existen diferencias entre otros.

La caracterización molecular por VNTR de las cepas aisladas reveló 13 genotipos de los cuales dos fueron los de mayor prevalencia SB0673 y SB067. Se obtuvieron 35 diferentes perfiles MIRU, de los cuales los más frecuentes fueron 4,

9, 13, 18 y 21. Algunas cepas comparten el mismo espoligotipo, pero poseen distinto patrón VNTR, lo cual confirma que esta técnica es posible diferenciar entre los genotipos encontrados en el estado

Se observó que utilizando los loci 2461, 2163b, 1644, 577 y 2165 se obtiene un poder discriminatorio adecuado para diferenciar aislados provenientes de la región, y además los perfiles alélicos obtenidos que se obtengan posteriormente, se pueden comparar con los perfiles de aislados provenientes de otras regiones en todo el país.

La genotipificación por VNTR es una metodología basada en PCR resultando útil, rápida y de fácil realización para la tipificación de aislados de *M. bovis* obteniéndose un alto poder discriminatorio (0.988), comparado con un estudio realizado en Baja California (0.90) (Martínez y col., 2011), el cual es adecuado para diferenciar aislados provenientes de diferentes municipios del estado.

La distribución de un mismo perfil MIRU en diferentes regiones del estado puede ser un indicativo de su movilización hacia municipios vecinos. De acuerdo a la frecuencia de dichos perfiles, se encontró que esta movilización es más frecuente entre los municipios de Guanajuato y León. San Felipe, Villagrán y San Francisco del Rincón parecen tener menos intercambio de animales, lo cual puede ser una consecuencia de la distancia geográfica entre estos municipios, caso contrario a la cercanía que presenta Guanajuato y León.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis se logró la genotipificación por VNTR de 42 aislados de *M. bovis* de ganado bovino de carne y leche provenientes de ganado del estado de Guanajuato.

Con la técnica de genotipificación por VNTR es posible evaluar las diferencias y similitudes genéticas entre las cepas aisladas, pues aunque estas compartan el mismo espilogotipo poseen distinto patrón VNTR. Se obtuvo un alto poder de discriminación lo cual sugiere que dicha técnica es adecuada para el análisis.

Los datos generados en el presente trabajo son la primera aproximación para conocer los genotipos de *M. bovis* presentes en el estado de Guanajuato. Por otra parte, los resultados obtenidos también sugieren que mediante esta técnica es posible identificar el lugar de origen de un brote así como la ruta de infección y diseminación, lo cual podría ser una herramienta útil para el control y erradicación de la Tuberculosis bovina en el estado de Guanajuato y en el resto del país.

Sin embargo, cabe destacar que hacen falta estudios más amplios para obtener los datos suficientes que puedan ayudar directamente a la campaña de control y erradicación de la Tuberculosis bovina en la región, y así disminuir la incidencia de esta enfermedad como problema de salud pública.

9. REFERENCIAS

- Abbas**, A. Lichtman A., Pober J. Inmunología celular y molecular. **1999**. 3a. edición. Ed. McGraw-Hill.
- Ablordey** A, Hilty M, Stragier P, Swings J, Portaels F. Comparative nucleotide sequence analysis of polymorphic variable-number tandem-repeat Loci in *Mycobacterium ulcerans*. J Clin Microbiol **2005**;4310:5281-5284.
- Acosta** S., Estrada C., Milian S. Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión. Téc Pecu Méx **2009**;47(4):389-412.
- Aranaz**, A., Liebana, E., Gomez-Mampaso, E., et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. *nov.*, a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int. J. Syst. Bacteriol. **1999**; 49, 1263-1273.
- Aranaz** A, Liébana E, Mateos A, Domínguez L, Cousins D. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol **1998**;614:311- 324.
- Biet** F, Boschirolu ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium aviumintracellulare* complex MAC. Vet Res **2005**; 363:411-436.
- Barathur** R. y col. A multiplex approach to molecular detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* infection in cattle. J. Clin. Microbiol **2000**; 38:2602-2610.
- Brosch** R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci. USA. **2002**; 996:3684-3689.
- Caimi** K, Romano MI, Alito A, Zumarraga M, Bigi F, Cataldi A. Sequence analysis of the direct repeat region in *Mycobacterium bovis*. J Clin Microbiol **2001**;393:1067-1072.
- Cobos** M, Montes V, Zumarraga M, Cataldi A, Romano MI, Estrada G, González JA. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. Can J Microbiol **2005**;5111:996-1000.
- Collins**, C.H., J.M. Grange. The bovine tubercle bacillus. J. Appl. Bacteriol. **1983**; 55:

13-29.

Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, De Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. J Clin Microbiol **1993**;315:1143- 1147.

Comité Mixto, **FAO/OMS** de expertos en brucelosis y tuberculosis. Sexto informe, serie de informes técnicos. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. **1986**.

Corner LA. Postmortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet Microbiol **1994**; (40):53-63.

Costello E, Egan JW, Quigley FC, O'Reilly PF. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. Vet Rec **1997**;141:222-224.

Costello E, Flynn O, Quigley F, O'Grady D, Griffin J, Clegg T, McGrath G. Genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from badgers in four areas of the Republic of Ireland by restriction fragment length polymorphism analysis. Vet Rec **2006**;15919:619-623.

Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol **1992**;30:255-258.

Cousins DV, Wilton SD, Francis BR. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. Vet Microbiol **1991**;27:187-195.

Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. Rev Sci Tech **2000**;193:689-701.

Fauville-Dufaux M. 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. J Clin Microbiol **2006**;446:1951-1962.

Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. Microbiology. **1998**;144 Pt 5:1189-1196.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci. USA. **2003**;10013:7877-7882.

Gascoyne DM, Barlow RE, Frothingham R, Robinson G, Collyns TA, Gelletlie R, Hawkey PM. Rapid identification of laboratory contamination with *Mycobacterium tuberculosis* using variable number tandem repeat analysis. J Clin Microbiol **2001**;391:69-74.

Gasque, G.R., Blanco, O.M.A. **2004**. Sistema de producción animal I. Volumen 1. Bovinos. 2ª ed. México. División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Glennon M, Jäger B, Dowdall D, Maher M, Dawson M, Quigley F, Costello E, Smith T. PCR-based fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates. Vet Microbiol **1997**;54:235-245.

Guillén A. Avances en el diagnóstico de la infección tuberculosa. Arch Bronconeumol. **2011**; 47(10):521–530.

Gutierrez, M., Samper, S., Jiménez, M.S., et al. Identification by spoligotyping on a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. J. Clin. Microbiol **1997**; 35, 3328-3330.

Gutiérrez M, Samper S, Gavigan JA, García M, Martín C. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. J Clin Microbiol **1995**;3311:2953-2956.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog **2005**;11:e5.

Haddad N, Masselot M, Durand B. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. Res Vet Sci **2004**;761:1-18.

Javed MT, Aranaz A, de Juan L, Bezos J, Romero B, Álvarez J, Lozano C, Mateos A, Domínguez L. Improvement of spoligotyping with additional spacer sequences for characterization of *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* isolates from Spain. Tuberculosis Edinb **2007**;875:437-45.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongarnpim P, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol **1999**; 378:2607-2618.

Martínez V, Oshima H, De la Mora V, Bermudez H, Rentería E, López V, Galván L., Medina B. Genotipificación por VNTR de aislados de *Mycobacterium bovis* de ganado sacrificado en Baja California. Rev Mex Cien Pecu **2011**; 2(4):393-401.

Milián S, Harris B., Arriaga D., Thomsen B, Stuber T., González S., Álvarez O., Santillán F., Morales L., Estrada C. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Rev Mex Cien Pecu **2010**; 1(4):403-415.

Milián S, Harris B., García C, Romero T, Germinal J., Cantó A, Gutiérrez R, Mercado P, Mejía E, Peña C, Estrada C, Pizano M. Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* del ganado en México. Rev Mex Cien Pecu **2012**; 2(4):459-471.

NOM-031-ZOO-1995. Comité Consultivo Nacional de Normalización de Protección Zoonosaria (CONAPROZ), Normas Oficiales Mexicanas en materia de Salud Animal.

Olive DM, Bean P. Principles and Application of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organism. J Clin Microbiol **1999**;376:1661-1669.

Pérez G., Milián S., Arriaga D., Romero T., Escartín C. Molecular epidemiology of cattle and human tuberculosis in Mexico. Salud Pública Mex **2008**;504:286-291.

Michel AL, Hlokwe TM, Coetzee ML, Maré L, Connaway L, Rutten VP, Kremer K. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. Vet Microbiol **2008**;1261- 3:151-159.

Morales L. Diagnóstico molecular de tuberculosis bovina mediante PCR- Anidada a partir de exudado nasal. Folleto técnico. INIFAP. **2011**

OIE. Tuberculosis bovina. Manual de la OIE sobre animales terrestres. **2008**

O'Reilly, L.M., Daborn, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animal and man: a review. Tubercle and Lung Diseases **1995**; 76 (1): 1-46.

Rhodes S., R. Hewinson, H. Vordermieier. Antigen recognition and immunomodulation by gamma/delta T cells in bovine tuberculosis. *J. Immunol.* **2001**; 166:5604-10.

Rodwell TC, Moore M, Moser KS, Brodine SK, Strathdee SA. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerg Infect Dis* **2008**;146:909-916.

Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, Hughes MS, Skuce RA, van Embden JD, Neill SD. Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Vet Microbiol* **1998**; 611-2:111-120.

SAGARPA. Situación actual de la producción de leche de bovino en México 2004. Coordinación General de Ganadería. **2004**. Consulta: marzo 2012

SAGARPA. Anuario Estadístico de la Producción Pecuaria, de los Estados Unidos Mexicanos. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON). **2005**

SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de bovino en México. **2006**. www.sagarpa.gob.mx. Consulta: marzo 2013.

SAGARPA. Duplica México exportaciones de productos cárnicos de bovino. **2011**. www.sagarpa.gob.mx/boletines. Consulta: marzo 2013.

SAGARPA. Monografía de carne de bovino. **2011**. www.sagarpa.gob.mx. Consulta: marzo 2013.

SAGARPA. Ficha acumulada de la producción pecuaria por estado: Guanajuato. **2013**. Consulta: marzo 2013.

Santillán F. Tuberculosis y paratuberculosis. 1er. Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. **2010**.

Santillan F, Flores J, Arriaga D, Romero T, Suárez G, Espitia C. Polymorphism of the PE domain of PE/PE_PGRS sequences in clinical isolates of *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Vet Microbiol* **2006**;1154:364-369.

Singh SK, Verma R, Shah DH. Molecular fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from India by restriction fragment length polymorphism. *J Vet Sci* **2004**;54:331-335.

Skuce RA, Brittain D, Hughes MS, Neill SD. Differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates from animals by DNA typing. J Clin Microbiol **1996**;34(10):2469-2474.

Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsck-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unitvariable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 44(12):4498-4510. **2006**.

Tortoli E. The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol. Med. Microbiol, 48, 159-178. **2006**.

Volk W., Gerbhardt B., Hammarskjöld M., Kadner R., Essentials of Medical Microbiology **1996**; (5)

Weniger T., Krawczyk J., Supply P., Niemann S., Harmsen, D. MIRU-VNTR_{plus}: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Nucl Ac Res. **2010**;38:326-331.

Zanini MS, Moreira EC, **Salas** CE, Lopes MT, Barouni AS, Roxo E, Telles MA, **Zumarraga** MJ. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from south-east Brazil by spoligotyping and RFLP. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health **2005**;523:129-133.