



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÉTICA DE
CEPAS DE *Mycobacterium bovis* EN INFECCIONES SERIADAS
EN COBAYOS.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

CARLOS OLINTO SERNA GONZÁLEZ

DIRIGIDO POR

MVZ MSc. PhD. FELICIANO MILIÁN SUAZO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO. MARZO DE 2003

No. Adq. 68076

No. Título _____

Clas. TS

579.3

S486d

RESUMEN

El objetivo de este trabajo, fue determinar la estabilidad genética de cepas de *M. bovis* en infecciones seriadas en cobayos. Una cepa de *M. bovis* obtenida de una lesión de bovino, fue reactivada en dos cobayos y posteriormente, usada para inocular 3 grupos de 6 cobayos, cada uno en forma seriada: 2 ml de una suspensión de 3 ml de *M. bovis* en solución salina, fueron inoculados al primer grupo de cobayos por vía peritoneal, aproximadamente a las 5 semanas los cobayos fueron sacrificados para tomar muestras de tejidos con lesiones tuberculosas. Dichas muestras fueron procesadas y cultivadas en medios de Lowenstein-Jensen y Stonebrink para el crecimiento de *M. bovis*. Los aislamientos obtenidos en el medio de cultivo se cosecharon y suspendieron en solución salina fisiológica, para ser utilizados en la inoculación del segundo grupo de cobayos, y así sucesivamente, hasta inocular los 3 grupos. De un total de 18 cobayos, 14 vivieron hasta el momento del sacrificio, todos presentaron algún tipo de lesión en mayor o menor grado; el órgano con las lesiones más notorias fue el nódulo mesentérico. El periodo de incubación fue diferente para los distintos grupos de cobayos, el del segundo grupo fue mas corto que el del primero (40 días), y el del tercero (28 días) menor que el segundo (36 días), lo que indicó que las cepas se fueron haciendo cada vez más patógenas para los cobayos. El aislamiento de *M. bovis* en los cultivos Lowenstein-Jensen y Stonebrink a partir de lesiones, se logro aproximadamente a los 30 días.

De un total de 14 muestras procesadas, se logro extraer ADN genómico de 13. Para determinar los patrones genéticos de los aislados se utilizó la técnica de Spoligotyping. La diferenciación de las cepas se realizó determinando la similitud de bandas, de acuerdo a la presencia o ausencia de alguno de los 43 espaciadores previamente fijados a una membrana de nylon. De un total de 13 muestras se obtuvieron 4 grupos genéticos. Los grupos involucrados aislados de diferentes grupos de cobayos y por conveniencia, éstos fueron nombrados A, B, C y D. El grupo A incluyó a los aislados G2.3, G3.2, G2.2, G2.1, G1.6 y G1.2, donde el primer dígito indica el número del grupo, y el segundo el número del cobayo dentro del grupo. Todos estos aislados presentaron idéntico patrón genético. El grupo B incluyó los aislados G1.4 y G2.4, el grupo C incluyó a los aislados G1.5, G3.1 y G3.3, y finalmente, el grupo D incluyó a los aislados G1.3 y G1.1. Como era de esperarse, la cepa AN5 de *M. bovis* tuvo mayor similitud genética con los aislados obtenidos de las lesiones; la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* por su parte, mostró la mayor disimilitud genética observada.

Los resultados obtenidos mostraron que la diversidad genética de las cepas de *M. bovis* observadas en las poblaciones animales, no son necesariamente debidas a la mezcla de animales de diferente origen; sin embargo, tampoco puede decirse con certeza que se deba a la presencia de mutaciones no letales que dan origen a nuevas líneas genéticas. Dada la diversidad genética observada en el primer grupo de cobayos, es posible que ésta se deba a la presencia de varias cepas en un mismo tubo de cultivo, o bien, a la presencia de varias cepas en la lesión del tejido afectado. Otro estudio sería necesario para determinar el origen de la diversidad genética de cepas de *M. bovis*, para entender mejor la epidemiología de la tuberculosis bovina.

ÍNDICE

RESUMEN	i
INDICE	ii
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS	iii
I. INTRODUCCIÓN	
1. Historia	1
2. Zoonosis	2
3. Importancia Económica	4
4. Agente etiológico	5
5. Patogenia	8
6. inmunidad	9
7. Signos clínicos	10
8. Resistencia	12
9. Vías de contagio	13
10. Epidemiología	14
11. Diagnóstico	16
12. Pruebas diagnósticas	17
II. OBJETIVO	23
III. HIPÓTESIS	24
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	25
V. RESULTADOS	29
VI. DISCUSIÓN	31
VII. CONCLUSIÓN	38
VIII. BIBLIOGRAFÍA	39
IX. ANEXOS	45

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1: Clasificación de las micobacterias de acuerdo a su patogenicidad hacia el humano.	7
Cuadro 2: Actividades efectuadas durante el desarrollo del trabajo para determinar estabilidad de cepas de <i>M. bovis</i> en infecciones seriadas en cobayos.	28
Cuadro 3: Órganos con presencia de lesiones compatibles a tuberculosis en cobayos infectados de manera seriada para determinar estabilidad genética de <i>M. bovis</i> .	32
Figura 1: Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas de <i>M. bovis</i> en los tres grupos de cobayos infectados.	33
Figura 2: Placa de gel mostrando el ADN extraído de los 13 aislamientos de <i>M. bovis</i> obtenidos de cobayos infectados en forma seriada con una misma cepa.	34
Figura 3: Patrón genético (puntos de hibridación en la membrana de nylon) de los diferentes aislados de <i>M. bovis</i> obtenidos con Spoligotyping de tres grupos de cobayos infectados en forma seriada.	35
Figura 4: Dendrograma que muestra los grupos genéticos formados por los aislados de <i>M. bovis</i> obtenidos de 3 grupos de cobayos infectados en forma seriada. El primer número indica el número de grupo y el segundo el número de cobayo dentro del grupo.	36
Figura 5: Dendrograma que muestra los grupos genéticos formados con los aislados de <i>M. bovis</i> ; del primer grupo de cobayos. El primer número indica el número del grupo y el segundo el número de cobayo dentro del grupo.	37

I. INTRODUCCIÓN

1. Historia.

La tuberculosis es tan antigua como la humanidad. Es una enfermedad que ha constituido y constituye en la actualidad un problema serio de salud pública, debido a su alta difusión, a la alta mortalidad y a su carácter socioeconómico, propio de una infección de curso crónico. En 1882, Roberto Koch conmovió al mundo al anunciar su descubrimiento del "germen" de la tuberculosis; demostrando de la manera más convincente que todas las formas de la enfermedad se deben a la misma causa: el bacilo tuberculoso (*Mycobacterium tuberculosis*) demostró que los animales se enfermaban de tuberculosis al ser inoculados con cultivos puros de este organismo, obteniendo bacilos idénticos de los tejidos enfermos de animales. Con la ayuda de Ehrlich, perfeccionó un método especial de tinción (tinción ácido-resistente) para descubrir la presencia del bacilo tuberculoso bajo el microscopio. En 1884 Koch expuso los postulados o leyes esenciales mediante los cuales se puede probar que un organismo es el agente de determinada enfermedad, y demostró cómo había cumplido estos postulados en sus estudios sobre la causa de la tuberculosis. Este trabajo dio a la humanidad por primera vez la explicación de la causa de una de las enfermedades humanas más comunes y mortales y sentó las bases racionales para la práctica de medidas preventivas. En 1904 Koch y sus colaboradores prepararon una vacuna a la que nombraron "Tauruman", basada en bacilos humanos desecados, sin obtener resultados satisfactorios. A partir de esto, se han practicado varios tipos de

vacunas atenuadas elaboradas con diferentes variedades de bacilos (Kenneth y Williams 1982).

2. Zoonosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa de tipo bacteriano causada por varias especies del género *Mycobacterium*, caracterizada por la formación de tubérculos (lesión patognomónica), de curso crónico y que puede afectar a todos los órganos de todos los animales vertebrados, incluyendo al hombre, por lo que se le considera como una zoonosis importante (Russell *et al.*, 1980).

La tuberculosis es la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso entre humanos adultos en el mundo (Cosivi *et al.*, 1995). Aunque *Mycobacterium tuberculosis* es la causa más común de tuberculosis humana, una proporción desconocida de casos es debida a *Mycobacterium bovis* (Acha y Szyfres, 1987). En países industrializados los programas de control de tuberculosis que dictan la eliminación de animales reactivos a la tuberculina, junto con la pasteurización de la leche han reducido drásticamente la incidencia de la enfermedad causada por *M. bovis* en seres humanos y ganado bovino; sin embargo, en países en vías de desarrollo, la tuberculosis en animales se distribuye extensamente, debido a que las medidas de control no se aplican o se aplican esporádicamente y la pasteurización se practica raramente (Collins y Grange, 1983). La correlación directa entre la infección por *M. bovis* en ganado y la enfermedad en la población humana ha estado bien documentada en países

industrializados; mientras que en países en desarrollo existe poca información disponible en cuanto a factores de riesgo por *M. bovis* para humanos y ganado bovino (Cosivi *et al.*, 1995).

La tuberculosis es también la principal infección oportunista en personas infectadas con el virus del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Raviglione *et al.*, 1995), la gran mayoría de la población que carga consigo esta doble infección, vive en países subdesarrollados; sin embargo, esta doble infección, SIDA y tuberculosis por *M. bovis*, ha sido también reportada en países industrializados (Houde y Dery, 1988; Boletín Epidemiológico Semanal, 1995). La epidemia por infección de SIDA en países subdesarrollados, particularmente en los cuales la infección por *M. bovis* está presente en el ganado y las condiciones favorecen la transmisión zoonótica (animal-humano), pueden lograr que la “tuberculosis zoonótica” se convierta en una seria amenaza de salud pública para personas en riesgo. De acuerdo con cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1990 existían 8 millones de casos activos en el mundo, de los cuales 7.6 millones estaban en países en vías de desarrollo y sólo 400 mil en países industrializados (Daborn y Grange, 1993). En ese mismo año, las muertes por tuberculosis fueron de alrededor de 2.9 millones de personas y la mayoría de ellas ocurrieron en países del tercer mundo. En México, la tuberculosis ha sido reportada como problema emergente de salud pública (Vaca-Marín *et al.*, 1999), la cual ha incrementado su incidencia en 28 Estados de la República, en algunos de ellos hasta en un 100% de un año para otro, de 1996 a 1997; por ejemplo.

Actualmente la tuberculosis en México ocupa el sexto lugar como prioridad de prevención y control por parte de la Secretaría de Salud (1999).

3. Importancia económica.

De acuerdo a diferentes estudios, en una vaca tuberculosa la producción de leche disminuye en promedio del 10% al 18% con respecto a un animal sano, (Bawinek y Taylor, 1996; Nader y Husberg, 1988). Las pérdidas por decomisos en mataderos por lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis se calculan por el porcentaje de animales que sufren decomisos parciales y totales (Latini *et al.*, 1997; Thoen y Steele, 1995). Cuando la sensibilidad diagnóstica de la inspección veterinaria es alta, como ocurre generalmente en los países exportadores de carne, y hay tuberculosis endémica, esos porcentajes pueden alcanzar hasta un 5% global, (Bawinek y Taylor, 1996; Nader y Husberg, 1988). Los animales tuberculosos ganan menos peso a lo largo de su vida, y ello puede significar una pérdida del 15% en la tasa de conversión alimenticia. La fertilidad también disminuye en cerca del 6% en las hembras tuberculosas, y en consecuencia se producen menos terneros por año (WHO, 1992; WHO, 1993).

Las consecuencias sobre el comercio nacional e internacional de ganado y de sus productos es evidente e importante para los países productores exportadores. Hay un descrédito y las barreras sanitario-comerciales son fácilmente impuestas, pero levantadas con gran dificultad (Thoen y Steele, 1995; Kantor y Alvarez, 1991; PAHO/WHO, 1997; PAHO/WHO, 1992). En México la tuberculosis representa una barrera no arancelaria para la libre comercialización

de animales y productos derivados exportados a otros países. México vende a Estados Unidos entre 800 mil y un millón y medio de becerros para engorda al año, lo que significa un fuerte ingreso a los productores nacionales de ganado, sin embargo, cuando los inspectores estadounidenses detectan a un animal infectado toman medidas que limitan el paso de animales provenientes de México, lo que trae como consecuencia descontrol en el mercado interno, disminución de los precios y sobrepastoreo (Milián, 2000).

4. Agente etiológico.

Los agentes etiológicos de la tuberculosis en mamíferos están clasificados como miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y son: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. necroti* y *M. africanum*, donde el último consiste básicamente de un grupo heterogéneo de cepas aisladas de humanos en África Ecuatorial (Collins y Grange, 1987). Los bacilos tuberculosos de humanos y bovinos son de crecimiento lento, se multiplican por división directa y tienen un tiempo de generación de 15 a 20 horas, lo que causa que transcurran de 3 a 6 semanas antes de que las colonias sean visibles en medios artificiales (Bates y Stead, 1993). Los bacilos están formados por proteínas y carbohidratos, y tienen un alto contenido de lípidos, lo que los hace ácido-resistentes (Kuthy y de la Escosura, 1991). Al ser teñidos por la técnica de Ziehl-Neelsen (fucsina básica con fenol en calor), los microorganismos se pigmentan de color púrpura y se ven fácilmente al microscopio como bacilos alargados y ligeramente curvos (Pacheco *et al.*, 1992).

Los bacilos tuberculosos son aeróbicos estrictos pero pueden crecer en medios líquidos si la superficie está expuesta a un suministro libre de oxígeno (Cosío, 1995). Son muy sensibles a la desecación y a la luz solar (Kuthy y de la Escosura, 1991); también son inmóviles, no forman esporas y se consideran parásitos estrictos; cuentan con un alto poder necrosante, magnífica adaptación a los tejidos vivos y protección contra la fagocitosis por sus factores constituyentes de pared celular. Sus colonias son rugosas, usualmente en cordones o en bandas serpentinas. Se les puede aislar con relativa facilidad en medios sólidos con huevo (Lowenstein-Jensen, Stonebrinck), los cuales contienen inhibidores del crecimiento de otras bacterias que pudieran acompañar al inóculo. Para poder distinguir a *M. bovis* y *M. tuberculosis* de otras bacterias se toma en cuenta su crecimiento lento y que no tengan pigmento, que produzcan niacina y reduzcan nitratos, que sean catalasa termolábil y sensibles a la isoniacida (Pacheco *et al.*, 1992).

M. bovis es el agente etiológico de la enfermedad en bovinos y tiene quizá el mayor rango de huéspedes de todos los patógenos conocidos. Entre las especies afectadas además de los bovinos se cuentan: caprinos, porcinos, ovinos, equinos, felinos, caninos salvajes, venados, bisontes, búfalos, tejones, antílopes, llamas, humanos y otros primates no humanos (Collins y Grange, 1983). La tuberculosis causada por *M. bovis* es una zoonosis con un patrón epidemiológico complejo, el cual incluye la transmisión de infecciones entre animales domésticos y poblaciones salvajes (Neill *et al.*, 1994).

Cuadro 1. Clasificación de las micobacterias de acuerdo a su patogenicidad hacia el humano.

Micobacterias potencialmente patógenas para el hombre.	Micobacterias patógenas para el hombre solo en circunstancias especiales.
<p>A) Complejo tuberculoso y lepra</p> <p><i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. leprae</i> <i>M. lepraemurium</i></p> <p>B) Micobacterias no tuberculosas</p> <p>I. De crecimiento lento</p> <p><i>M. scrofulaceum</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. marinum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. simiae</i></p> <p>II. De crecimiento rápido</p> <p><i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i></p>	<p>I. De crecimiento lento</p> <p><i>M. gordonae</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. flavescens</i></p> <p>II. De crecimiento rápido</p> <p><i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i></p>

Modificado de Wolinsky, 1979, citado por Pumarola *et al.*, 1987.

5. Patogenia.

El bacilo de la TB ingresa al organismo generalmente a través del tracto respiratorio por inhalación de material infectante expulsado en la tos de individuos enfermos. Los aerosoles expulsados de 1 a 5 micrones de tamaño alcanzan el alvéolo del pulmón. Los bacilos que llegan a los espacios alveolares son primero fagocitados por macrófagos locales, en pocos días se multiplican en el macrófago hasta que éste muere y los nuevos bacilos liberados son ingeridos por otros macrófagos, y así sucesivamente, por un periodo de tiempo (Dunlap y Briles, 1993; Pacheco *et al.*, 1992). A esta primera fase de la enfermedad se le conoce como "Primoinfección." Para que la TB se pueda diagnosticar clínicamente es necesario que ocurran por lo menos dos exposiciones al agente: la primoinfección mencionada anteriormente y la superinfección o reinfección. En la primoinfección ocurre la formación de un proceso pequeño de necrosis e inflamación conocido como complejo primario o foco de Ghon-Ranke, linfadenitis y linfangitis (Frappe, 1981). Histológicamente el foco queda constituido como un núcleo central con presencia de gérmenes viables y necrosis por caseificación, una segunda capa de infiltración leucocitaria y exudado seroso; finalmente, una tercera capa que es un halo de edema con exudado seroso. En animales bien nutridos y en estado de buena salud, este foco primario (foco de Ghon) se llega a calcificar aproximadamente dos semanas después de su formación, quedando estéril. En animales débiles infectados este foco primario queda con gérmenes vivos (foco de Puhl), de tal forma que el continuo contacto con gérmenes vivos produce un estado de sensibilización o alergia, que se manifiesta en la prueba de la tuberculina. Este estado de sensibilización continua predispone al animal a una

superinfección o reinfección, la cual se puede dar a partir de los gérmenes ya presentes en el organismo o gérmenes provenientes del exterior (Frappe, 1981).

6. Inmunidad.

La infección causada por *M. bovis* induce una lenta respuesta inmune en el huésped, tanto celular como humoral, siendo la respuesta inmune de tipo celular la de mayor importancia. En cuanto a la respuesta humoral, la producción de anticuerpos contribuye a la patogenia a través de la formación del complejo antígeno-anticuerpo, que puede subsecuentemente dañar al tejido por activación de complemento o inhibir la fagocitosis por macrófagos (Grange, 1994). La inmunidad mediada por células está dada por el reconocimiento de las células T a los antígenos micobacterianos, en asociación con el complejo de histocompatibilidad mayor (CMH). Esta interacción puede activar la capacitación antimicobacteriana por los macrófagos vía liberación de citocinas por las células T. Posteriormente, los monocitos sanguíneos que tienen mayor capacidad antimicobacteriana que los macrófagos residentes, pueden ser atraídos dentro de la lesión (Kaufmann, 1990; citado por Neill, 1994). Así, la inmunidad mediada por células puede beneficiar al huésped por iniciación de un proceso que puede destruir o inhibir a la micobacteria.

La presencia de micobacterias produce una inflamación crónica de larga duración (hipersensibilidad tardía). En este caso, el estímulo continuo y prolongado de tipo quimiotáctico hace que lleguen continuamente nuevos macrófagos y fibroblastos, y que se deposite un exceso de colágeno en torno al foco de irritación. Pocos neutrófilos o linfocitos son atraídos hacia la lesión; sin

embargo, existe la formación de células gigantes con el objetivo de enclaustrar o encerrar eficazmente el material dañino (Tizard, 1994).

7. Signos clínicos.

Los animales se encuentran en estado de depresión y suelen presentar anorexia y elevación de la temperatura. La presentación pulmonar se caracteriza por tos crónica debida a bronconeumonía. Esta tos casi nunca es fuerte o paroxística y suele presentarse en forma de uno o dos golpes con carácter apagado retenido y húmedo. La tos es estimulada fácilmente por presión sobre la faringe o por el ejercicio realizado por el animal, y es mas frecuente en la mañana o en tiempo de frío. Frecuentemente presenta disnea con aumento de la frecuencia y de la profundidad de las respiraciones. En esta etapa pueden descubrirse anomalías por auscultación y percusión del tórax, y suelen percibirse estertores rechinantes y pleuresía tuberculosa. La disnea es provocada por constricción de las vías aéreas debido al agrandamiento de los nódulos linfáticos bronquiales, asimismo el agrandamiento de nódulos linfáticos mediastínicos suele acompañarse de timpanismo ruminal, primero recurrente y luego persistente. La hipertrofia de nódulos linfáticos retrofaringeos provoca disfagia y respiración ruidosa por obstrucción de la faringe (Hagan y Bruner, 1983; Ocádiz, 1987).

Rara vez se presenta inflamación de nódulos supramamarios, precurales, preescapulares y submaxilares. Tampoco es frecuente la tuberculosis del útero por cepas bovinas salvo en casos avanzados. En la metritis tuberculosa pueden existir dificultades en la concepción incluyendo problemas de abortos recurrentes

en fases avanzadas de la gestación, o incluso nacer terneros vivos los cuales en su mayoría mueren pronto por una tuberculosis generalizada (Hagan y Bruner, 1983; Ocádiz, 1987) o meníngea (Fajardo y Valero, 1987).

En cuanto a la presentación de tuberculosis en glándula mamaria (mastitis tuberculosa), esta posee una especial importancia ya que representa un alto riesgo en salud pública, así como riesgo de diseminación de la enfermedad a los becerros; además de la dificultad de diferenciarla de otros tipos de mastitis. Su rasgo característico es una induración manifiesta con hipertrofia que suele desarrollarse, en principio, en la parte superior de la ubre, sobre todo en los cuartos glandulares posteriores.

Siempre que se sospeche de mastitis tuberculosa es necesaria la palpación de los nódulos linfáticos supramamarios. La hipertrofia de los nódulos con fibrosis del cuarto glandular no indica de forma obligada tuberculosis, pero el agrandamiento sin induración de la ubre sugiere tuberculosis o linfomatosis. Más tarde aparecen floculos muy finos que sedimentan después que la leche permanece en reposo, dejando un líquido claro y de color ámbar. Posteriormente, la secreción en su totalidad puede consistir en un líquido de color ámbar.

En general los signos variaran según la distribución de los tubérculos en el organismo, cuando estos se ubican en pulmones se presentará tos, disnea y neumonía; si se presenta en nódulos linfáticos, principalmente de cuello y cabeza, se observará agrandamiento y drenado. Cuando el daño se encuentre en el aparato digestivo se va a presentar diarrea intermitente y constipación, y en las fases finales habrá emaciación, disnea respiratoria aguda y muerte (Hagan y Bruner, 1983; Ocádiz, 1987; Blood *et al.* 1992).

8. Resistencia de *M. bovis*.

En décadas pasadas, algunos autores han mencionado que *M. bovis* vive en heces por 5 meses en condiciones de inviernos fríos, 2 meses en el verano y en el suelo hasta por 2 años (Wray, 1975). Se ha encontrado que el bacilo es eliminado rápidamente por luz solar directa en unas cuantas horas, pero los bacilos presentes en pus o en descargas nasales, pueden durar viables por varias semanas (Maddock, 1933). Datos recientes sugieren que *M. bovis* desaparece del medio ambiente mucho más rápido de lo que se creía (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1979). Estudios experimentales en Australia demostraron que *M. bovis* sólo sobrevive por cuatro semanas en suelos húmedos a la sombra, en la oscuridad o en el laboratorio (Duffield y Young, 1985). En Inglaterra, el bacilo no pudo ser recuperado de pasto contaminado con orina infectada después de los tres días, y tampoco de heces infectadas después de 1 a 2 semanas (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1979). La descomposición de las canales destruye también al *M. bovis*. En un cadáver dejado en la llanura, se observó que el nivel de infección cae drásticamente después de las dos semanas a grado tal que después de las 4 semanas el bacilo ya no pudo ser recuperado. En cadáveres enterrados el *M. bovis* no pudo ser recuperado después de las tres semanas. Se sabe que mientras *M. bovis* es depositado en heces estériles y suelo almacenado fuera de la luz solar, puede sobrevivir por varios meses; bajo condiciones naturales parece morir mucho más rápidamente (O' Reill y Daborn, 1995).

9. Vías de contagio.

Las vías de contagio de tuberculosis más comunes son: la vía aerógena, que ocasiona lesiones principalmente en el aparato respiratorio; se considera a ésta como la principal forma de transmisión de la tuberculosis en el humano y el bovino. La vía digestiva, que se da a través de la ingestión de agua y alimentos contaminados. Otras menos frecuentes son la sexual, que causa cuadros de tuberculosis genital y el contacto directo, que ocasiona cuadros de tuberculosis cutánea (Russell *et al.*, 1980). Las infecciones con *M. bovis*, han sido siempre consideradas como un problema de salud pública por la transmisión del agente al hombre vía leche contaminada (Collins y Grange, 1983). De hecho, inicialmente la tuberculosis se consideraba una enfermedad sólo de niños, donde involucraba daño a los nódulos linfáticos, el tracto intestinal o las meninges; sin embargo, la situación cambió debido a la introducción de la pasteurización de la leche y sus subproductos (Stahl, 1939). Estudios epidemiológicos recientes indican que los humanos se infectan principalmente por *M. bovis* a través de la vía respiratoria después del contacto frecuente con vacas o humanos tuberculosos (Collins y Grange, 1987; Ritacco y de Kantor, 1992). Por ejemplo, en Argentina, donde la prevalencia de la tuberculosis en la población bovina es relativamente alta y existe la pasteurización de leche y productos de ésta, combinados con buena inspección sanitaria de la carne se observa que la mayor parte de los pacientes infectados con *M. bovis*, son trabajadores de rastro o trabajadores rurales (Ritacco y de Kantor, 1992). Asimismo, un reporte de 48 casos de tuberculosis en San Diego menciona a la presentación pulmonar como la única manifestación clínica de

infección con *M. bovis* (Danker *et al.*, 1993). En la Gran Bretaña ya se ha reportado la transmisión de *M. bovis* de humano a humano (Collins *et al.*, 1981).

10. Epidemiología.

La tuberculosis humana es principalmente causada por *Mycobacterium tuberculosis*; sin embargo, *M. bovis* causante de la tuberculosis bovina es también responsable de casos humanos (Milián *et al.*, 2000); de hecho, existe una relación cruzada de infección: tuberculosis en humanos causada por *M. tuberculosis*, tuberculosis en humanos causada por *M. bovis*, tuberculosis en bovinos causada por *M. tuberculosis* y tuberculosis en bovinos causada por *M. bovis* (Committee on Bovine Tuberculosis, 1994). Resultados de estudios epidemiológicos, post-mortem y experimentales, indican que la tuberculosis tanto en animales como en humanos, es una enfermedad principalmente respiratoria. Un estudio demostró que la prevalencia de la tuberculosis en bovinos jóvenes se mantiene baja hasta que dichos animales son llevados con el hato de animales adultos, que es cuando la incidencia se dispara. De igual forma, se ha establecido que en promedio, la incidencia de la tuberculosis en bovinos se incrementa de manera uniforme a 7.5% por cada año de vida, alcanzando el 40% en animales de 5 a 6 años de edad (Francis, 1947). De esta forma, cuando los becerros no son colocados con vacas adultas, cerca del 90% de ellos alcanzan la madurez (2 años) sin infección alguna (Francis, 1950). Se estima que mientras en animales en explotaciones extensivas la prevalencia de la tuberculosis se mantiene entre 1% a 5%, en explotaciones intensivas esta prevalencia se incrementa hasta 25% a 50% (Francis, 1947; Sawa *et al.*, 1974; Steele y Raney, 1958). También se menciona que la prevalencia de la

enfermedad es directamente proporcional al tamaño del hato, a mayor número de animales, mayor es la prevalencia (Toledo, 1997).

El problema de la tuberculosis a nivel nacional es grave, especialmente en ganado lechero; donde de manera oficial se reconoce una prevalencia de 16% y de forma extraoficial, se dice que puede ser tan alta como del 60% al 70% (Milián, 2000). Se ha estimado que el problema continúa incrementándose debido a que la mayor parte de los hatos lecheros del país no participan en la campaña de control; además de que se sigue vendiendo leche cruda, que representa un riesgo de transmisión de tuberculosis para la salud pública (CONASA, 1994).

Se han hecho predicciones basadas en modelos matemáticos que muestran que con una "transmisión constante" (sin intensificación de la producción); en un país cuya prevalencia de infección por tuberculosis en el ganado fuera inicialmente 3%, ésta llegaría a 5% en unos 25 años. Sin embargo, con la intensificación del sector lechero, mejora genética, creciente concentración y tamaño de los hatos, aumentan la susceptibilidad y el riesgo de infección. En este "escenario" la prevalencia llegaría a 30% (10 veces más que la inicial) en el mismo período de 25 años (Bawinek y Taylor, 1996). Es cierto que las variaciones climáticas y el peso relativo de la industria lechera en conjunto con la producción, entre otras causas, influyen en el intervalo de variación de estos porcentajes. En los Estados Unidos de Norteamérica, se consideraba en los años 20, que si no se efectuaban intervenciones de control; la prevalencia se duplicaría cada 30 años (Steele y Raney, 1958). Actualmente la infección por *Mycobacterium bovis* en el ganado estadounidense es muy rara; esto como resultado de un exitoso programa de control, superando así las expectativas para la enfermedad. En 1994, fue

confirmado un brote *M. bovis* en donde se comprobó que el portador era un ciervo (*Odocoileus virginianus*) en la península baja de Michigan; a raíz de este brote se comenzaron a realizar pruebas en varios estados para detectar animales en estado salvaje positivos (Michigan Department of Natural Resources, 2000).

11. Diagnóstico.

Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la tuberculosis incluye a aquellas que detectan a las micobacterias que pertenecen al complejo *Mycobacterium* y también a las que miden las respuestas específicas del huésped a las infecciones micobacterianas. Las primeras están enfocadas a detectar micobacterias o sus productos, por ejemplo: microscopía directa, aislamiento de la micobacteria, prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Toledo 1997); y una prueba molecular recientemente diseñada denominada "spoligotyping". Las pruebas que miden la respuesta inmune del hospedero se basan en la inmunidad humoral y en la inmunidad celular (Verbon, 1994).

La prueba de microscopía directa con tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) es una prueba rápida y barata cuando se trabaja con muestras positivas; sin embargo, el método tiene poco valor en pacientes con tuberculosis extrapulmonar. El diagnóstico definitivo depende del cultivo de la micobacteria, el cual es lento, problemático, y en algunas ocasiones falso negativo. Para incrementar la precisión del diagnóstico y poder iniciar un tratamiento a la brevedad posible, es deseable tener una prueba que sea, tanto rápida como precisa. La detección de DNA

micobacteriano en muestras clínicas por medio de PCR es altamente sensible, pero laboriosa y cara (Toledo, 1997).

11.1. Tinción de Bacilos Acido- Alcohol Resistentes (BAAR)

Debido a su alto contenido lipídico, las paredes celulares de las micobacterias tienen la capacidad única de ligarse a la fucsina, no siendo decoloradas por el ácido alcohol. Esta reacción ácido-alcohol resistente de las micobacterias, junto con su tamaño y forma característicos, constituyen una ayuda valiosa para la detección temprana de la infección y para el control y tratamiento de la enfermedad en humanos (Toledo, 1997).

11.2. Aislamiento Bacteriano

Dentro de los métodos bacteriológicos clásicos utilizados desde hace varios años se encuentra el examen por medio de microcolonias en gel agar de Middelbrook y la observación de características con patrones morfológicos definidos. Actualmente se utilizan los medios de Löwenstein-Jensen, Stonebrink y medio de cultivo con yema de huevo (Payeur *et al.* 1993).

11.3. Tuberculina

En el diagnóstico de la tuberculosis bovina en vivo generalmente se utilizan dos métodos: la prueba tuberculínica simple y la prueba tuberculínica doble comparativa. La primera es una medida de una reacción cutánea del animal después de la inyección con la tuberculina bovina en la tabla del cuello o en el pliegue anocaudal. La segunda es una comparación de la reacción a las

tuberculinas bovina y aviar, aplicadas al mismo tiempo en la tabla del cuello. La prueba doble comparativa se considera más específica, puesto que elimina la posibilidad de reacción por exposición al *M. avium*. Por ejemplo, algunos animales libres de *M. bovis* pero infectados con otra micobacteria pueden dar una reacción positiva a la tuberculina bovina y ser considerados como infectados al utilizar la prueba simple. En este caso, si se usa la prueba doble comparativa, la reacción a la tuberculina aviar será mayor. Esta reacción puede ser debida a infecciones con *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. farcinogenes*, o algunas otras micobacterias atípicas como *M. kansaii*, *M. fortuitum*, *M. aquae* o *M. vaccae* (Martrenchar *et al.*, 1993; O' Reilly, 1995). Una de las dificultades que tiene la prueba caudal es que los resultados son muy subjetivos, que se define por la interpretación realizada por el Médico Veterinario que ejecuta la prueba (Whipple *et al.*, 1995).

11.4. Interferón Gama

Dos de las principales ventajas del uso del ensayo de interferón-gama como prueba diagnóstica de la enfermedad en bovinos, es que no compromete el estado inmune del animal, lo que hace posible que se puedan volver a probar animales sospechosos y que el resultado de esta prueba esté disponible dentro de 24 a 48 horas (Wood y Rothel, 1994). Otra ventaja de esta prueba es su practicidad, de tal forma que se puede utilizar en grupos grandes de ganado (Whipple *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1992). La prueba del interferón-gama, junto con la prueba tuberculínica simple, es considerada como una prueba con alta sensibilidad, debido a la respuesta celular dominante que se observa en el ganado con infecciones micobacterianas (Wood *et al.*, 1992; Wood y Rothel, 1994).

11.5. Pruebas moleculares

En la actualidad, las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta de gran valor en el entendimiento de la epidemiología de las enfermedades. En España, las técnicas moleculares recientemente demostraron una muy particular resistencia a varios antibióticos por parte de *M. bovis*, tal fue el caso de una cepa responsable de un brote en un hospital que afectó al menos 16 pacientes VIH positivos (Zumárraga *et al.*, 1998).

Mediante un análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en Inglés), demostró el patrón molecular (“huellas digitales”) de esta línea multirresistente de *M. bovis* a los antibióticos y, demostró además que ésta misma cepa fue responsable de otro brote en un segundo hospital (Zumárraga *et al.*, 1998).

Una técnica conocida como “Spoligotyping” (Cousins *et al.*, 1998) ha sido introducida para estudiar la epidemiología de la tuberculosis humana. Esta técnica consiste de una simple PCR que se basa en la amplificación del material genético de la bacteria, de tal forma que una vez amplificado este material y multiplicado, la técnica detecta ciertas porciones variables dentro del genoma bacteriano y comienza a estructurar el patrón genético único de la cepa analizada; por lo tanto, la técnica a la vez que hace el diagnóstico de la presencia del agente etiológico, también hace la diferenciación de la especie (*M. tuberculosis/M. bovis*) y la diferenciación de cepas, dentro de cada especie. Utilizando Spoligotyping un estudio demostró 35 tipos genéticos diferentes de *M. bovis*, partiendo de 273 aislados (Cousins *et al.*, 1998), muchos de ellos relacionados con el lugar de origen. Otro estudio encontró que aislados de jabalí y venado presentaban el

mismo patrón genético que los bovinos de una misma región, sugiriendo transmisión directa entre estas especies de animales; resaltando la importancia que tiene el realizar estudios en poblaciones de especies animales que pudieran estar actuando como reservorios naturales de la enfermedad. Uno de los grupos genéticos incluyó solamente los aislados obtenidos de cabras de una misma región, lo que se consideró como indicativo de infección permanente de los animales del mismo hato (Aranáz *et al.*, 1996). Un estudio más encontró que todos los aislados de un mismo hato con historia de no introducción de animales de ninguna fuente externa por al menos 10 años, tenían el mismo patrón genético (Perumaalla *et al.*, 1996). Lo que demuestra que la técnica de Spoligotyping es capaz de identificar estabilidad genética y también cambios que hacen que dos microorganismos de la misma especie se presenten como dos cepas diferentes.

Una de las maneras de reducir el riesgo de infección en las poblaciones animales es eliminar los focos de infección; sin embargo, esto no es nada fácil, especialmente porque los animales que son detectados con lesiones tuberculosas en rastro son difíciles de rastrear hasta el hato de origen, por carecer de documentos que lo permitan. Para solucionar este problema se han hecho varios estudios epidemiológicos al estilo de los mencionados, utilizando técnicas moleculares para tratar de relacionar aislados de *Mycobacterium* obtenidos en el laboratorio con su zona geográfica de origen (Milián *et al.*, 2000). Los resultados a la fecha son que no se pueden agrupar aislados por origen, debido a una alta diversidad genética del *Mycobacterium* en todas las regiones estudiadas (Milián *et al.*, 2000; Perumaalla *et al.*, 1996; Aranáz *et al.*, 1996; Cousins *et al.*, 1998). Sin embargo, dichos estudios son controversiales en cuanto al origen de la diversidad

de cepas observada; mientras unos mencionan que ésta se debe a la alta tasa de mutaciones no letales de las micobacterias debida al tipo de reproducción clonal que manifiestan (Milián *et al.*, 2000), otros argumentan que se debe a la indiscriminada movilización y mezcla de animales entre las explotaciones de una región a otra (Perumaalla *et al.*, 1996), lo que es común que se presente en México. Milián *et al.* (2000) basan su hipótesis en el hecho de que un análisis discriminante de *M. bovis*, les arrojó un índice de asociación de 1.13 ± 0.14 , muy parecido al de otras bacterias de reconocida reproducción clonal y en que a través de un cuestionario a productores, se encontró que menos del 5% de las explotaciones lecheras encuestadas (n=76) en diferentes regiones, venden o compran animales de otras explotaciones lecheras, por lo que es poco probable que la diversidad de cepas sea debida a mezcla de animales. Perumaalla *et al.* (1996) por su lado, fundamentan su teoría en que en un estudio de una sola explotación lechera se encontró la misma cepa de *M. bovis* después de 10 años, estudio que no coincide con los resultados de otros, donde la diversidad genética dentro de la misma explotación ha sido evidente (Milián *et al.*, 2000; Aranáz *et al.*, 1996; Cousins *et al.*, 1998). Resultados como los anteriores demuestran que el origen de la diversidad genética de *M. bovis* dentro de una explotación bovina, e incluso de poblaciones bovinas de una región geográfica no ha sido totalmente esclarecido.

La investigación epidemiológica tiene la misión de medir los riesgos de infección y de identificar factores que puedan ser susceptibles de cambiar a través de medidas de intervención específicas. Si hay suficiente diversidad genética en una población, al encontrar un grupo de individuos infectados con una misma cepa

de *M. bovis*, identificada porque tienen el mismo patrón genético, sugiere que este grupo está relacionado epidemiológicamente, habiendo infectado uno a otro o ambos tuvieron una fuente común de infección. A su vez el riesgo de infección es alto con considerable diversidad clonal entre *M. bovis* de un mismo lugar y la mayoría está infectado con cepas únicas (Smith y Moss, 1994). Todo esto hace necesario determinar con precisión el origen de la diversidad genética de *M. bovis*, a fin de darle una mejor interpretación a los resultados de estudios de epidemiología molecular de la tuberculosis bovina.

II. OBJETIVO.

Determinar si la diversidad genética de las cepas de *M. bovis* es una consecuencia de la ocurrencia de mutaciones en la multiplicación celular que sufren las bacterias en el tejido infectado, demostrado a través de infectar grupos de cobayos (*Cavia porcellus*) en forma seriada y utilizando el método de "Spoligotyping", para formar patrones genéticos que permitan la comparación molecular de las cepas entre un grupo y otro de cobayos.

III. HIPÓTESIS.

La diversidad genética de cepas de *M. bovis* se debe a la presencia de mutaciones no letales de la micobacteria que dan origen a nuevas clonas, lo que se puede demostrar con la comparación de la cepa de infección inicial y la cepa aislada al final de los pases seriados en los cobayos, si las mutaciones no existen, la cepa inicial y la cepa final deberían ser genéticamente similares.

IV. MATERIAL Y METODOS

Se trabajó con 3 grupos de 6 cobayos cada uno. Los cobayos fueron de la raza peruana-Hartley con un peso promedio de 650 g. que fueron colocados en parejas en cajas de plástico con alimento y bebida suficiente. Para la infección inicial se utilizó una cepa de *M. bovis* aislada de una lesión de ganglio linfático de un bovino en el Estado de Jalisco en 1996 mantenida en refrigeración. Previo a la infección inicial, la cepa de *M. bovis* fue activada por inoculación en 2 cobayos, y posteriormente aislada en un medio líquido de Middlebrook 7h10, conteniendo 4.16mg de piruvato de sodio/ml enriquecido con 10% (vol/vol) de OADC y colocada posteriormente en una estufa de cultivo a 37°C hasta su crecimiento, el cual se logró a los 32 días de cultivo. Las infecciones a los cobayos fueron de manera seriada de la siguiente manera: 2 ml de una suspensión de raspado de cultivo de micobacterias diluido en 3 ml de agua destilada, fueron inoculados por vía peritoneal en cada una de los animales del primer grupo. Aproximadamente cinco semanas después los animales fueron sacrificados con aplicación de clorofomo a vías respiratorias altas. De cada uno de los animales se obtuvieron muestras de lesiones de hígado, bazo y pulmones de donde se hicieron aislados de *M. bovis* siguiendo el procedimiento de Payeur *et al.* (1993)(anexo I). La cepa aislada de este primer grupo de cobayos fue utilizada para inocular al segundo grupo; y así sucesivamente hasta completar los tres grupos. La reactivación de la cepa y el aislamiento de *M. bovis* del primer grupo de cobayos fue realizado en el Laboratorio de Tuberculosis del CENID-Microbiología del INIFAP en Cuajimalpa, D. F. El resto de los aislados fue realizado en el Laboratorio de Bacteriología del

Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal de SAGARPA en Tecamac, Estado de México.

El análisis molecular de los aislados de *M. bovis* en cada grupo de animales se realizó utilizando el método de Spolygotyping (anexo II) en el Laboratorio de Biotecnología del CENID-Microbiología del INIFAP en Palo Alto, D. F. El primer paso de este análisis consistió en la extracción del ADN genómico de los aislados obtenidos de los animales infectados; posteriormente se corrió una PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la amplificación de las secuencias espaciadoras utilizando los iniciadores DRa y DRb con secuencias: 5' –GGT TTT GGG TCT GAC GAC- 3', marcado con banda en la terminación 5', y 5' –CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3, respectivamente. La mezcla total para el PCR fue de 50 µl, y se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 1 ciclo a 96°C por 3 minutos, y 20 ciclos a 96°C por un minuto, seguido por 55°C por 1 minuto y 72°C por 30 segundos. En el segundo paso los productos de la PCR fueron hibridados con oligonucleótidos previamente fijados a una membrana de nylon (38 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* H37Rv y 1 de *M. bovis* AN5).

Después de la eliminación del producto que no hibridó, se hizo la detección de la hibridación del aislado probado con los oligonucleótidos conocidos pegados a la membrana. El patrón genético de la cepa original fue comparado con el de la cepa obtenida de la última inoculación y con lo obtenido en las generaciones intermedias.

Los patrones genéticos individuales de los aislados fueron utilizados para calificar la presencia (1) o ausencia (0) de bandas específicas, de acuerdo a las

secuencias espaciadoras fijadas a la membrana. Con esta calificación se elaboró una matriz de 1's y 0's, que fue utilizada para determinar el índice de distancia genética entre pares de aislados, siguiendo la fórmula de Nei y Li (1979); donde la distancia genética ($D=1-S$) se deriva de la fórmula: $S=2 N_{ab} / (N_a + N_b)$, donde N_{ab} es el número de bandas que los aislados **a** y **b** tienen en común, N_a es el número de bandas en el aislado **a**, y N_b es el número de bandas en el aislado **b**. La matriz de las distancias genéticas fue sometida a un análisis estadístico de clusters, siguiendo el procedimiento de Sneath y Sokal (1973), conocido como UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method Average). Estos análisis estadísticos se realizaron con el paquete de análisis estadísticos SPSS® versión 9 para Windows®. La distancia genética se determinó utilizando el procedimiento de "Squared Euclidean Distance" bajo la opción de "Hierarchical cluster" y "Nearest Neighbor", como el método de agrupamiento con la elaboración final de un dendrograma.

Cuadro 2. Protocolo experimental para determinar estabilidad de cepas de *M. bovis* en infecciones seriadas en cobayos.

Grupo	Adaptación (días)	Fecha de inoculación	Presencia de signos post-infección (días)	Animales post-infección muertos antes del sacrificio	Duración de la infección (días)	Fecha de Sacrificio
Reactivación de la cepa	0	30/Abril/01	No se observaron	Ninguno	41	9/Junio/01
1°	8	29/Agosto/01	No se observaron	1 cobayo 27 días	36	01/Octubre/01
2°	8	04/Diciembre /01	20	1 cobayo 34 días	40	13/Enero/02
3°	8	13/Marzo/02	17	2 cobayos 32 días	30	10/Abril/02

V. RESULTADOS

De un total de 18 cobayos inoculados, 14 vivieron hasta el momento del sacrificio, los cuales se sacrificaron a las 5 semanas post-inoculación, todos presentaron algún tipo de lesión en mayor o menor grado, y de las muestras obtenidas, de 13 se logró aislar *M. bovis*. El órgano con las lesiones más notorias fue el linfonódulo mesentérico. El hígado y el bazo presentaron gran cantidad de lesiones diminutas en la superficie; sin embargo, las lesiones en pulmón no aparecieron en todos los animales y en aquellos que aparecieron fueron muy escasas. La mayor parte de las lesiones en el último grupo de animales aparecieron en la piel en el sitio de la inoculación, de donde también fue posible hacer el aislamiento. El periodo de incubación fue diferente para los distintos grupos de cobayos; el del segundo grupo fue más corto que el del primero (38 días para el primer grupo y 33 para el segundo), y el del tercero aún menor que el del segundo (28 días), lo que indica que las cepas se fueron haciendo cada vez más patógenas para los cobayos. Los signos clínicos que se notaron fueron: inapetencia, recogimiento, pelo hirsuto y debilidad aproximadamente a los 24 días promedio postinfección. El aislamiento del *M. bovis* en cultivo a partir de lesiones se logró en un promedio de 33 días.

Análisis molecular

De un total de 14 muestras procesadas se logró extraer ADN geonómico de 13. Aunque la muestra restante mostraba la presencia de *M. bovis* en el cultivo, por alguna razón no se pudo obtener ADN suficiente para realizar los análisis moleculares. El resultado de la extracción de ADN se presenta en la Figura 2.

Para el análisis molecular se utilizó spoligotyping, de un total de 13 muestras se obtuvieron 4 grupos genéticos. Por conveniencia los grupos fueron nombrados A, B, C y D. El grupo A incluyó a los aislados G2.3, G3.2, G2.2, G2.1, G1.6 y G1.2, donde el primer dígito indica el número del grupo y el segundo el número del cobayo dentro del grupo; todos estos aislados presentaron idéntico patrón genético. El grupo B incluyó los aislados G1.4 y G2.4, el grupo C incluyó los aislados G1.5, G3.1 y G3.3, y finalmente, el grupo D incluyó a los aislados G1.3 y G1.1. Como era de esperarse, la cepa AN5 de *M. bovis* tuvo mayor similitud genética con los aislados obtenidos de las lesiones, de hecho quedó incluida en el grupo D, la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* por su parte mostró la mayor disimilitud genética observada en el dendrograma (Figura 4).

VI. DISCUSIÓN.

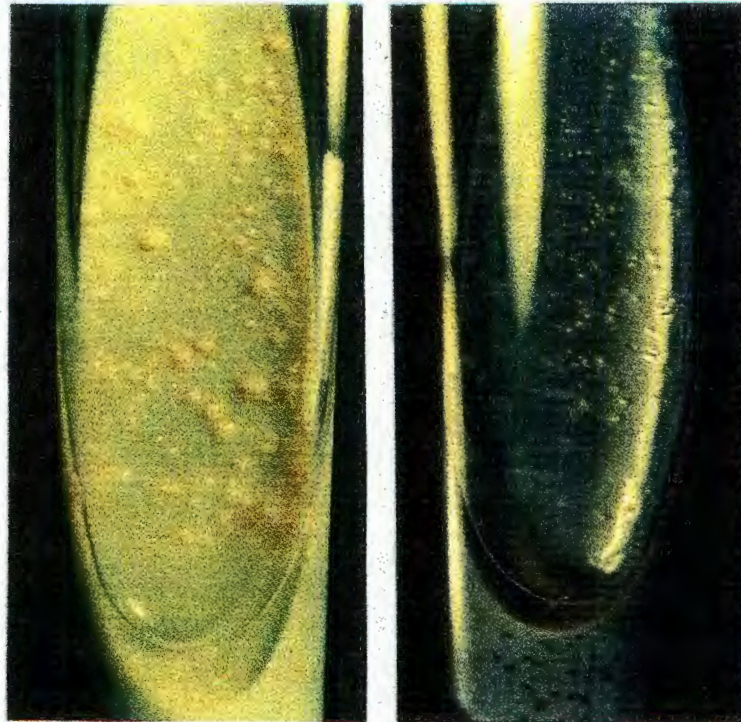
Los resultados obtenidos muestran que la diversidad genética de cepas de *M. bovis* se presenta aun cuando no existe mezcla de animales de diferente origen, lo que difiere con lo reportado por Perumaalla *et al.* (1996). Dada la presencia de diversidad genética en el primer grupo de animales, tampoco se puede afirmar que dicha diversidad se deba únicamente a la presencia de mutaciones no letales que dan origen a nuevas líneas genéticas, como lo mencionan Milián *et al.* (2000). La diversidad observada puede venir de dos situaciones: puede ser el resultado de la generación de nuevas cepas en el cultivo o bien de la presencia de varias cepas en la lesión del tejido afectado. Para aclarar esta situación sería necesario quizá hacer pases en medio de cultivo separando micobacterias a partir de una sola colonia, y hacer varios pases en cultivo, y no hacer el clásico raspado de la superficie del cultivo, donde muchas cepas pueden estar presentes, dando por resultado la observada diversidad genética. En cuanto a determinar la presencia de más de una cepa en el tejido lesionado sería necesario hacer varios cultivos de una misma lesión y hacer un análisis molecular de varias colonias en diferentes cultivos. De cualquier modo, la importancia que la diversidad genética de cepas de *M. bovis* en las poblaciones animales tiene sobre la epidemiología de la tuberculosis, aun necesita de mucha investigación.

El presente trabajo no estuvo libre de errores, el no haber incluido en el análisis molecular la cepa original aislada de la lesión del bovino para compararla genéticamente con las cepas aisladas del primer grupo de cobayos, para dar seguimiento al patrón genético a través de los grupos y ver qué tanto se mantiene en los diferentes pases fue obviamente un error.

Cuadro 3. Órganos con presencia de lesiones compatibles a tuberculosis en cobayos infectados de manera seriada para determinar estabilidad genética de *M. bovis*.

ORGANO AFECTADO	GRUPO DE REACTIVACIÓN	GRUPO 1	GRUPO 2	GRUPO 3
Piel	0	0	+	++++
Bazo	+	+++	+++	+++
Hígado	+++	++	0	++
Pulmón	0	+	++	+
Nódulo mesentérico	++++	++++	++++	0
Tiempo de crecimiento (días)	40	38	33	28

(+) Indica carga de lesiones en cada órgano.



LOWENSTEIN-JENSEN

STONEBRINK

Figura 1. Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las cepas de *M. bovis* en los tres grupos de cobayos infectados.

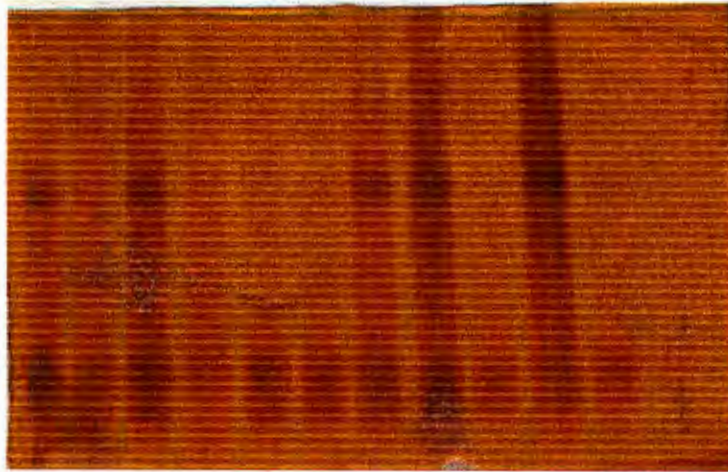


Figura 2. Placa de gel mostrando el ADN extraído de los 13 aislados de *M. bovis* obtenidos de cobayos infectados en forma seriada con una misma cepa.

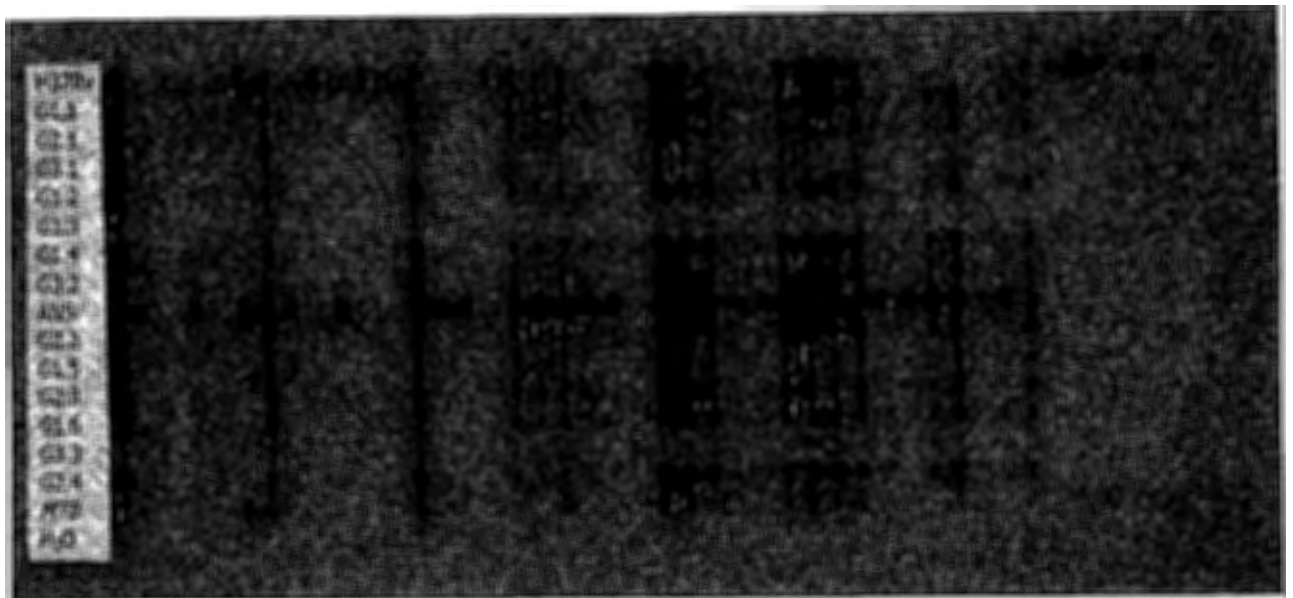


Figura 3. Patrón genético (puntos de hibridación en la membrana de nylon) de los diferentes aislados de *M. bovis* obtenidos con Spoligotyping de tres grupos de cobayos infectados en forma seriada.

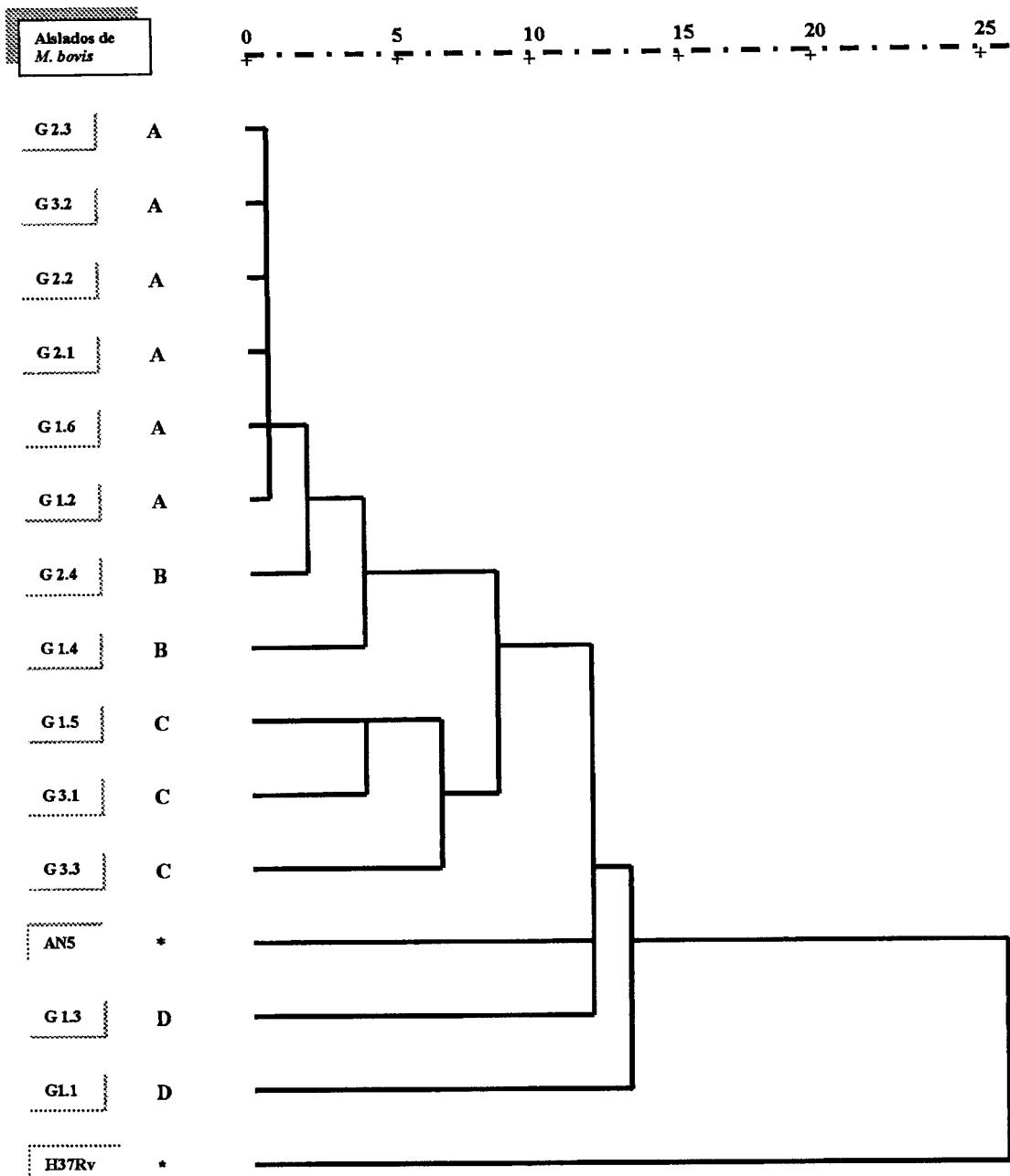


Figura 4. Dendrograma que muestra los grupos genéticos formados por los aislados de *M. bovis* obtenidos de 3 grupos de cobayos infectados en forma seriada. El primer número indica el número de grupo y el segundo el número de cobayo dentro del grupo.

(*) Controles correspondientes a *M. bovis* (AN5) y *M. tuberculosis* (H37Rv)

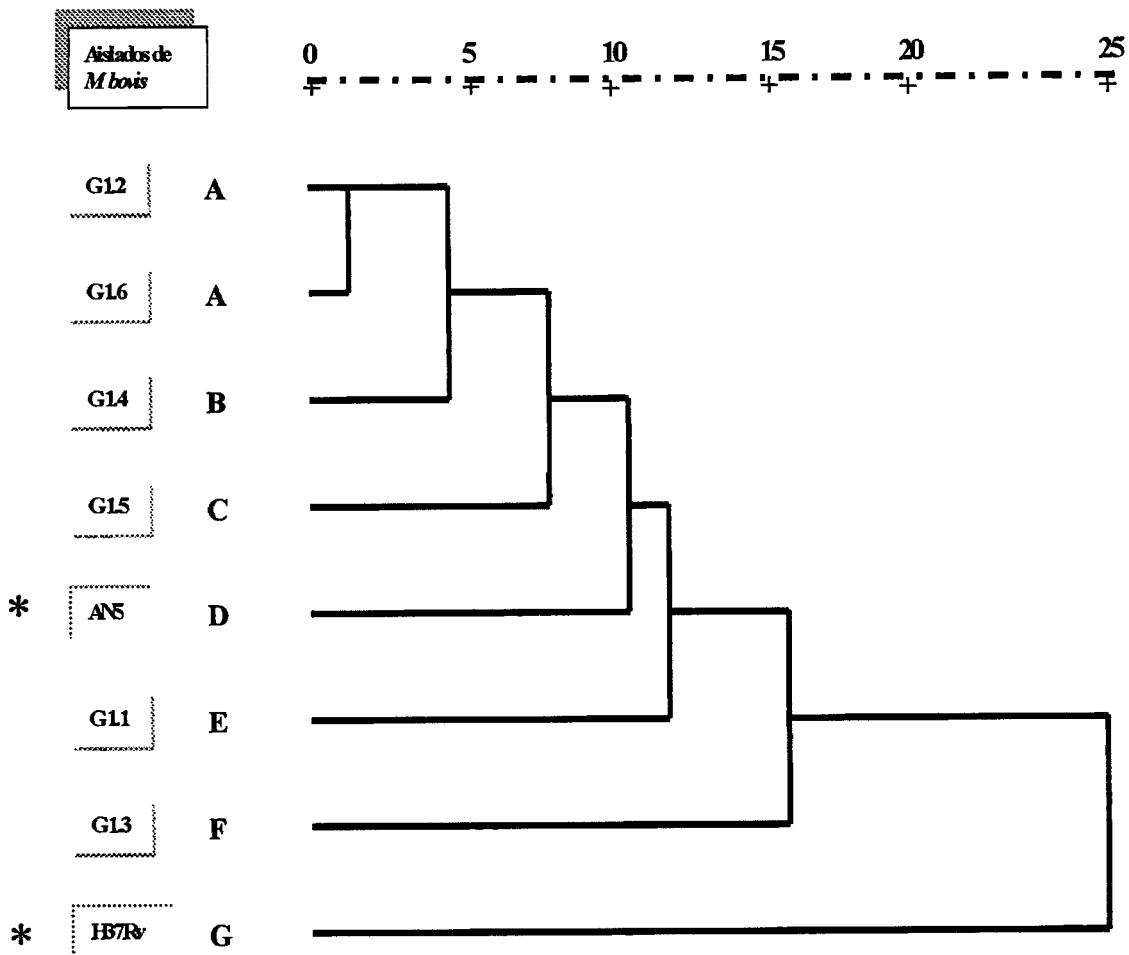


Figura 5. Dendrograma que muestra los grupos genéticos formados con los aislados de *M. bovis*; del primer grupo de cobayos. El primer número indica el número del grupo y el segundo el número de cobayo dentro del grupo.

(*) Controles correspondientes a *M. bovis* (AN5) y *M. tuberculosis* (H37Rv)

VII. CONCLUSIÓN.

Del presente trabajo se puede concluir que para que la diversidad genética de *M. bovis* se presente en las poblaciones no es necesaria la mezcla de animales y probablemente tampoco se deba únicamente a la generación de nuevas cepas como resultado de mutaciones no letales tal como se menciona en la discusión; sino que también llevándose a cabo una "reactivación" de una infección latente existirá considerable diversidad genética, reflejando los diferentes tiempos en que los animales fueron infectados (Smith and Moss, 1994). Por otro lado, es necesario un nuevo estudio que permita determinar en dónde se origina la mencionada diversidad de cepas, es decir, si se lleva a cabo en el cultivo o en la lesión.

El método de Spolygotyping es muy conveniente, ya que lleva a una rápida detección y tipificación directa de cepas de *M. bovis*, lo cual es esencial para su aplicación en programas de control incluso de erradicación, ya que los resultados de este método ayudarán a una mejor comprensión de la diseminación de la enfermedad.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Acha P.N., Szyifres B. 1987. Zoonotic tuberculosis. In: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. 2nd edition. Washington: Pan American Health Organization World Health Organization: Scientific Publication No. 503.
- Aranaz A., Liébana E., Mateos A., Domínguez L., Vidal D., Domingo M., González O., Rodríguez-Ferri E.F., Bunschoten A.E., Van Embden J.D.A., Cousins D. 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of Tuberculosis. *J Clin Microbiol*. 34 (11): 2740.
- Asociación Argentina de Microbiología, "Tuberculosis, historia de una zoonosis emergente"; Boletín No. 151 Noviembre-Diciembre, 2001.
- Bates H.P., Stead W.W. 1993. Historia de la tuberculosis como epidemia global. (1^a. Edición). Edit Mc Graw-Hill; 6:1278-1284.
- Bawinek F., Taylor N.M. 1996. Assessment of the socio-economic importance of Bovine Tuberculosis in Turkey and possible strategies for control or eradication. Turkish- German Animal Health Information Project. General Directorate of Protection and Control, Ankara.
- Blood D. C. Y Radostits O.M. 1992. Medicina veterinaria. McGraw-Hill. Organización Panamericana de la salud. Vol. 1, p: 776-782.
- Boletín Epidemiológico Semanal. 1995. Vigilancia de la Tuberculosis zoonótica por *M. bovis*: Sistema de enfermedades de declaración obligatoria 1982-1995. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica de España, Centro Nacional de Epidemiología; 3:183-4.
- Collins C.H., Yates M.D., Grange J.M. 1981. A study of bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from humans in South East England; 62:113-116.
- Collins C.H., Grange J. M. 1983. A Review: The bovine tubercle bacillus. *J Appl Bact*. 55: 13-29.
- Collins, C.H., Grange, J.M. 1987. Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* Infection. *Irish Vet J*. 41:363-366.
- Committee on Bovine Tuberculosis, Board of Agriculture. 1994. National Academy Press 2101 Constitution Avenue, NW Washington D.C., 20418.
- Comisión Nacional en Sanidad Animal (CONASA), Memorias Reunión Anual. 1994.

- Cousins D.V., Williams S.N., Liébana E., Aranaz A., Bunschosten A.E., van Embden J.D.A., Ellis T. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microb*. 31(1):168-178.
- Cosío I. 1995. Enfermedades infecciosas crónicas del pulmón (13ª edición). Edit. Méndez México.
- Cosivi O., Meslin F.X., Daborn C.J., Grange J.M. 1995. The Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans, with particular reference to Africa. *Scientific and Technical Review*; 14:733-46.
- Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D.V., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F.A.K., De Kantor I., Meslin F.X. 1995. Zoonotic Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *EID Vol.4 No.1*:1-16.
- Daborn C.J., Grange J.M. 1993. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *British Vet J*. 149, 403.
- Danker M.W., Waecker N.J., Norman W., Essey M.A., Mosser K., Thompson M., Davis E. 1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: A clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine*. 72:11-37. USA.
- Duffield B.J., Young F.A. 1985. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. *Vet Microb*. 10:193-197.
- Dunlap N.E., Briles D.E. 1993. *Inmunología de la Tuberculosis (1ª Edición)* Edit Mc Graw-Hill; 6:1306-1308.
- Fajardo R.C. y Valero G., 1987. Estudio de un caso de meningo-encefalitis tuberculosa en bovinos. *Tec. Pec. Méx*. Vol 25. 2:231-232.
- Francis J. 1947. *Bovine tuberculosis including a contrast with human tuberculosis* London:Stamples Press Ltd; 220.
- Francis J. 1950. Control of infection with the bovine tubercle bacillus. *Lancet*; 258: 34 - 39.
- Frappe M.C.R. 1981. *Manual de Infectología Veterinaria, 1ª Edición*, Edit. Francisco Méndez Oteo, México D. F.; 174-177.
- Grange J.M. and Yates, M.D. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*, 40:137-151.

- Hagan y Bruner, 1983. Enfermedades infecciosas de los animales doméstico. 4ª edición, edit. Prensa Médica Mexicana, S.A. p: 228-247.
- Houde C., Dery P. 1988. *Mycobacterium bovis* sepsis in an infant with human immunodeficiency virus infection. *j ped infect d.* 7:810-2.
- Kantor I.N., Alvarez E. 1991 Current Status of Bovine Tuberculosis in Latin America and the Caribbean. Pan American Zoonoses Center/ Pan American Health Organization, Buenos Aires.
- Kaufmann S.H.E., 1989. In vitro analysis of the cellular mechanism involved in immunity to tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.* 11 (supp 2):s448-s454. CITADO POR: Nelly, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B. and Hanna, J., 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology*, 40, 41-52
- Koch Robert, La Etiología de la Tuberculosis. 1965. Buenos Aires; 49-86. Citado por Kenneth L. B., Williams A.B., *Microbiología*, 1982. Ed. Publicaciones Culturales S.A. pp. 37-38.
- Kuthy J., De la Escosura G. 1991. Tratado de Medicina Interna. (1ª edición). Edit. Médica Panamericana. México.
- Latini O., Canal A.M., Ferrara M.E., Sequeira M.D., Bagnaroli R., Torres P. 1997. Confiabilidad en la determinación de prevalencia de infección por *Mycobacterium bovis* en ganado bovino por decomiso en frigoríficos. *arch med v.* 29: 197-203.
- Leslie I.W. 1972. Diagnóstico de laboratorio de la Tuberculosis animal. Centro Panamericano de Zoonosis y Organización Panamericana de la Salud, Nota técnica #16.
- Maddock E. C. G. 1933. Studies on the Survival time of the bovine tubercle bacillus in soil and dung, in dung and on grass, organic matter and the cultivation of the organism. *j hyg camb.* 33:103-117.
- Martrenchar A., Nijanpop B.M., Yaya A., Njoya A., Tulasne J.J. 1993. Problems associated with tuberculosis and brucellosis skin-test methods in northern Cameroon. *prev med v.* 15:221-229.
- Michigan Department of Natural Resources, May 2000. Summary of Michigan Wildlife TB Surveillance. , Wildlife Bureau.
- Milián S. F., Salman, William C.B., Joni T., Ramirez C., Payeur J., Torres M. 2000. Molecular Epidemiologic Analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Mexico. *j am vet res.* 61 (1):90-95.

- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1979. Third report. Bovine tuberculosis in badgers. London: HMSO.
- Nader A., Husberg H. 1988. Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. *rev med v. (B.Aires)*; 68:36-9.
- Neill S.D., Pollock J.M., Bryson D.B., Hanna J. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *vet micr.* 40: 41-52.
- Ocádiz J., 1987. Epidemiología de los animales domésticos, control de enfermedades, 1ª edición, Edit. Trillas, p:86:90.
- O'Reilly L.M. 1995. Tuberculin skin test: Sensivity and specificity. In: Thoen C.O., Steele J.M., eds. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State University. 85-91.
- O'Reilly L.M., Daborn C.J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease*, 76, Supplement 1, 1-46. Edinburgh University, Scotland.
- Pacheco C., Vázquez V., Badillo N. 1992. Vacuna del bacilo de Calmette y Guerin (BCG). 1ª reimpresión México.
- Pan American Health Organization. 1992. Plan of Action for the eradication of bovine tuberculosis in the Americas. Phase I. PAHO/WHO, Washington.
- Pan American Health Organization. 1997. Guide for Bovine Tuberculosis Projects. Technical Note (Revised Version), INPPAZ (PAHO/WHO), Buenos Aires.
- Payeur J. 1993. Laboratory methods for the isolation and identification of Mycobacteria National Veterinary Service Laboratories. Animal and Plant Health Inspection Service. United States Department of Agriculture. Ames, Iowa.
- Perumaalla V.S., Adams L.G., Payeur J.B., Jamagin J.L., Baca D.R., Guemes F.S., Ficht T.A. 1996. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis* In Texas and Mexico. *j clin micr.* 34(9):2066- 2071.
- Pumarola A., Rodríguez-Torres, A., García-Rodríguez, J.A. y Piedrota-Angulo, G., 1987. Microbiología y parasitología médica, 2ª edición, Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. Marson Salvat medicina p: 527; 530-533.

- Raviglione M.C., Snider D.E., Kochi A. 1995. Global Epidemiology of Tuberculosis. *am j med a.* 273:220-266.
- Ritacco V., De Kantor I.N. 1992. Zoonotic tuberculosis in Latin America *J CLIN MICR.* 30: 3299-3300.
- Rusell A. R., William S.M., Andrew W.M. 1980. *Principios de Patología Veterinaria*, 7ª. Edición, Editorial Continental, S.A. de C. V., 216, 258 y 673.
- Sawa T.R., Thoen C.O., Nagoa W.T. 1974. *Mycobacterium bovis* infections in wild axis deer in Hawai. *j am vet med a.* 165: 998-999.
- Smith P.G., Moss A. R. 1994. Epidemiology of the tuberculosis. In: Tuberculosis, pathogenesis, protection and control. Ed. By Barry R. Bloom. ASM Press, Washington DC.
- Sneath P.H.A., Skoal R.R., 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 2nd Edition. Freeman, New York, pp 774-775.
- Stahl S.A. 1939. A tuberculosis epidemic caused by milk-born infection. *j british child;* 56:83-89.
- Steele J.H., Raeney A.F., 1958. Animal tuberculosis. *Am Rev Respir Dis;* 77:908-921.
- Tizard I. 1994. *Inmunología veterinaria*, 4ª Edición, Edit. Interamericana. Mcgraw-Hill, México D.F.; p. 373.
- Thoen C.O., Steele J.H., editors. 1995 *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Ames (IA): Iowa State University Press.
- Toledo O.P. 1997. Estudio retrospectivo de 5 años de la Tuberculosis humana y bovina en Querétaro. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
- Vaca M.M.A., Tlacuáhuac Ch., Olvera C.R. 1999. Tuberculosis pulmonar entre sintomáticos respiratorios detectados en las unidades de salud de la SSA, en el estado de Tlaxcala, México. *Rev Inst Nal de Enf Resp. México* 12 (1):29-34.
- Verbon A. 1994. Development of a serological test for tuberculosis. Problems and potencial. *Tropical and Geographical Medicine;* 46, 5:275-279.

- Whipple D.L., Bolin C., Davis A.J., Jamagin J.L. 1995. Comparison of the sensitivity of the caudal fold skin test and commercial gamma interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Am J. Vet Res*; 56, 4:415-419.
- Wood P.R., Comer L.A., Rothel J.S., Ripper J.L., Fifis T. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*. 31: 71-79.
- Wood P.R., Rothel J.S. 1994. *In vitro* immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology*; 40:125-135.
- World Health Organization. Report of the WHO meeting on animal tuberculosis. 1992 Apr 27; Cairo, Egypt. Geneva: The Organization; 1992. Unpub. Document WHO/CDS/VPH/92.112.
- World Health Organization. Report of the WHO meeting on zoonotic tuberculosis (*Mycobacterium bovis*), with the participation of the FAO. 1993 Nov 15. Geneva, Switzerland. Geneva: The Organization; 1993. Unpub. Document. WHO/CDS/VPH/93.130.
- Wray C. 1975. Survival and spread of pathogenic bacteria of veterinary important within the environment. *Vet Bull*. 45:543-550.
- Zumárraga M.J., Martín C., Samper S., Alito A., Latini O., Bigi F., Roxo E., Cicuta A.E., Errico F., Castro Ramos M., Cataldi A., Van Soolingen D., Romano M.I. 1998. Usefulness of Spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium Bovis* –Related infections in South America. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (2):296.

ANEXO I

METODO DE AISLAMIENTO DE LAS MICOBACTERIAS

1. Identificación de cada caso.
2. Limpiar tejido, posteriormente colocarlo en Hipoclorito de Sodio a 1:1000 en 200ml (se puede mantener toda la noche en esta solución en refrigeración).
3. Sacar el tejido y licuar con 50ml de rojo de caldo –fenol, moler por 1 ó 2 minutos.
4. Con una pipeta de 10ml , poner 7ml en 5ml de Na OH (hidroxido de sodio) a 0.5 N en un tubo de ensayo con tapón de rosca (no dejar mas de 10 minutos).
5. Añadir gotas HCl (ácido clorhidrico) a 1 N hasta que se torne amarillo, unavez logrado esto, agregarle NaOH a 5 N hasta que se torne en un color rosa pálido.
6. Centrifugar por 2 minutos.
7. Decantar el 90% del líquido.
8. Sembrar con isopo. (tomado de Payeur et al 1993).

Debido a que las muestras pueden contener una flora bacteriana mixta se tratan con un agente descontaminante (NaOH y HCl) para reducir el sobredesarrollo bacteriano indeseable y licuar el mucus. Luego del tratamiento con los agentes descontaminantes, el ácido o el álcali se neutralizan y se continúa el proceso(Koneman et al, 1985).

PREPARACIÓN DEL MEDIO MIDDLEBROOK

Ingredientes	Por cada 1000 ml
Agar base Middelbrook 7H-10 (difco 06217)	20.0 gm
Agua destilada con 5ml de glicerina	900.0 ml
Medio enriquecido Middlebrook *OADC (difco 0722)	100.0 ml

* OADC- ácido oleico, fracción V de albúmina bovina, dextrosa y catalasa bovina

Método de preparación

Mezclar y calentar el agar base 7H-10 junto con el agua con glicerina hasta que que se logre disolver completamente en solución. Verter esta en el envase aspirador cuidando de hacerlo asépticamente. Esterilizar en el autoclave a 121°C por 15 a 20 min. Enfriar a 56° y adicionar enriquecimiento Middelbrook OADC. Mezclar bien. Distribuir en tubos de ensaye con taparroscas en cantidades de 9 ml.; se dejan los tubos en posición inclinada para permitir la solidificación. Si se utilizan cajas de Petri deberán ser cantidades de 25ml. E incubar a 37°C por 48 horas revisando periódicamente su esterilidad.

PREPARACIÓN DEL MEDIO STONEBRINK MODIFICADO (Leslie, 1972.)

INGREDIENTES	Para 1200ml del Medio
--------------	-----------------------

Mezcla de sales

Piruvato de Sodio (Sal pirúvica ácida de Sodio)	5.0gm
-------------------------------------------------	-------

Fosfato potásico monobásico (KH ₂ PO ₄)	2.0gm
----------------------------------------------------------------	-------

Agua destilada	300ml
----------------	-------

Fosfato Sódico dibásico (NA ₂ HPO ₄)	aprox. 1.4gm
-------------------------------------------------------------	--------------

Para un pH de 6.5

Mezcla del colorante

Cristal violeta	100mg
-----------------	-------

Verde Malaquita (forma de Oxalato)	800mg
------------------------------------	-------

Agua destilada	100ml
----------------	-------

Mezcla de huevo

20 huevos enteros, preparados asépticamente	800ml
---------------------------------------------	-------

Esta preparación sirve para 140 medios

Método de preparación

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

Preparación de la mezcla de huevos

Los huevos deben ser frescos, las aves de postura no debieron haber recibido medicamentos en el alimento o como tratamiento. Remojar los huevos en solución de alcohol isopropílico durante 30 minutos. Secar con toallas estériles. Sumergir

en alcohol luna pequeña parte. Abrir el huevo por la parte estéril y verter el contenido en el recipiente. Mezclar los huevos hasta que se homogenicen pero que no se produzcan burbujas. Agregar la mezcla de colorante a la mezcla de sal en el matraz servidor. Filtrar los huevos y añadirlos a la mezcla en el bote aspirador, mezclar y homogeneizar. Depositar la mezcla en tubos asépticos. Inclinar los tubos por 30 minutos a 82°C, enfriar e incubar por 24 a 48 horas (Payeur et al, 1993).

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE LOWENSTEIN-JENSEN

Ingredientes	Para 1612 ml de medio
Base de medio Lowenstein	37.2g
Glicerina	12.0 ml
Agua destilada	600.0 ml
Huevos completos (Asépticos)	1000 ml
1 N HCL	20.0 ml

Método de preparación

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

Preparación de la mezcla de huevos

Los huevos deben ser frescos, las aves de postura no debieron haber recibido medicamentos en el alimento o como tratamiento. Remojar los huevos en solución de alcohol isopropílico durante 30 minutos. Secar con toallas estériles. Sumergir en alcohol luna pequeña parte. Abrir el huevo por la parte estéril y verter el contenido en el recipiente. Mezclar los huevos hasta que se homogenicen pero que no se produzcan burbujas. Agregar la mezcla de colorante a la mezcla de sal en el matraz servidor. Filtrar los huevos y añadirlos a la mezcla en el bote aspirador, mezclar y homogeneizar. Depositar la mezcla en tubos asépticos. Inclinar los tubos por 30 minutos a 82°C, enfriar e incubar por 24 a 48 horas (Payeur et al, 1993)

ANEXO II

EXTRACCION DE ADN GENOMICO

PROCEDIMIENTO:

1. Tomar el cultivo de Lowenstein-Stonebrink y transferir aproximadamente 100mg de peso húmedo, a un tubo de microcentrifuga, que contenga 400 μ l TE 1X.
2. Activar las bacterias a 80° C y enfriar a temperatura ambiente.
3. Adicionar 50 μ l de lisozima , agitar e incubar a 37° C durante 1 hora (este procedimiento puede dejarse durante toda la noche).
4. Adicionar 75 μ l de SDS 10% / proteinasa K(70 μ l de SDS 10% mas 5 μ l de proteinasa K 10 mg) agitar e incubar a 65° C durante 10 minutos.
5. Adicionar 100 μ l de NaCl 5M.
6. Adicionar 100 μ l de CTAB/NaCl (esta solución debe precalentarse a 65° C) agitar hasta que la solución tome una consistencia lechosa. Incubar a 65° C durante 10 minutos.
7. Adicionar 750 μ l de solución de cloroformo / isoamílico, agitar para hacer una solución homogénea. Centrifugar a 12, 000 g durante 5 minutos.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (aproximadamente 600 μ l), teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia, ya sea que esto puede contaminar el ADN. Transferir en volúmenes de 200 μ l .
9. Adicionar 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico (300 μ l aproximadamente) para precipitar los ácidos nucleicos.
10. Dejar la mezcla a -20° durante 30 minutos.
11. Centrifugar a 12,000 g durante 15 minutos .
12. Decantar la mayoría del sobrenadante, dejando aproximadamente 20 μ l por encima del botón de ADN.
13. Adicionar 1ml de etanol al 70% frío (mantener a -20°)
14. Centrifugar a 12,000g durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante. Dejar 20 μ l por encima del ADN.
15. Centrifugar a 12,000g durante un minuto y decantar cuidadosamente el sobrenadante.
16. Permitir que el ADN se seque a temperatura ambiente. Mas o menos 20 minutos.
17. Disolver el ADN, en 20 μ l amortiguador de TE 1X o en agua destilada, puede ser almacenados a 4° o a -20° hasta su uso en el laboratorio.
18. Para una estimación rápida de la concentración de ADN, se puede correr 1 μ l del ADN en solución en un gel de agarosa al 1%
19. Corrido de cámara de electroforesis a 120 volts durante 35 minutos

Técnica de Spoligotyping

PCR

1. Se toman aproximadamente 50mg de muestra en base húmeda, a ésta se le agrega TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.4) a ésta suspensión se le agrega Lisozima Sigma Co. (10mg/ml) y se incuba a 37° C durante 1 hora o toda la noche.
2. A la mezcla se agrega 100 ul de SDS 10% y 6 ul de proteinasa K (10mg/ml). Se incuba a 65° C durante 10 minutos.
3. Se adiciona 100ul de NaCl 5M, se agita y se le agrega 80 ul de CTAB (CTAB10% en NaCl 3M). Se agita y se incuba a 65° C durante 10 minutos.
4. Se añade 750 ul de una solución de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), se centrifuga a 12,000 g durante 5 minutos.
5. Se prepara la fase acuosa y se pone en un tubo nuevo, a ésta se le agrega el 60% del volumen de alcohol isopropílico, se deja 30 minutos a -20° C.
6. La muestra se centrifuga, a 12,000g durante 15 minutos, se decanta el sobrenadante.
7. Se agregas alcohol etílico (frío) y se centrifuga a 12,000g durante 5 minutos. El sobrenadante se deshecha.
8. Se agrega alcohol etílico absoluto (frío) y se centrifuga a 12000g durante 5 minutos. El sobrenadante se separa y se centrifuga de nuevo durante un minuto.
9. El tubo se pone en una centrifuga de vacío para secar el ADN.

El ADN se resuspende en 45 ml de agua y se congela hasta su uso en el laboratorio.

SPOLIGOTYPING.

Todas las soluciones amortiguadoras deben de precalentarse antes de usarse

1. 250ml 2 x SSPE / 0.1% SDS 60
 2. 500ml 2 x SSPE / 0.5% SDS 60
 3. 500ml 2 x SSPE / 0.5% SDS 42
 4. 500ml 2 x SSPE. Temperatura ambiente.
- a) Se adiciona 20 ul de producto de PCR a 150 ul de 2 x SSPE / 0.1 % SDS
 - b) Se calienta el PCR diluido durante 10 minutos a 100° C y enfriarlo en hielo inmediatamente.
 - c) Se la va la membrana con 250 ml de 2 x SSPE / 0.1 % SDS, 5 minutos a 60° C
 - d) Poner la membrana en el minibloter en forma perpendicular a los oligonucleótidos aplicados sobre ella.
 - e) Se remueve los fluidos residuales de los carriles del minibloter por aspiración.

- f) Se llena cada carril con los productos de amplificación (evitando la formación de burbujas) e hibridizar durante 60 minutos a 60° C. Evitar la contaminación de carriles vecino.
- g) Se remueve las muestras den minibloter por aspiración y poner la membrana en un tubo de hibridación.
- h) Se lava la membrana dos veces en 250ml de 2 x SSPE / 0.5 %SDS durante 10 minutos a 60° C.
- i) Se enfría la membrana a 42° C, para evitar que se inactive la peroxidasa en el siguiente paso.
- j) Se incuba la membrana con un conjugado de peroxidasa streptoavidina a una dilución de 1: 4000 : 2.5 ul de streptoavidina / peroxidasa en 10 ml de 2 x SSPE /0.5 % SDS, durante 45 60 minutos a 42° C.
- k) Se lava la membrana dos veces en 2 x SSPE / 0.5 por 10 minutos a 42° C.
- l) Se enjuaga la membrana en 2 x SSPE a temperatura ambiente.
- m) Para la detección por quimiluminiscencia, incubar la membrana durante 1 minuto en 20 ml de líquido ECL.
- n) Se cubre la membrana con plásticos transparentes y se expone la película de rayos X durante 5 minutos.