

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Mycobacterium*  
*bovis* OBTENIDOS A PARTIR DEL GANADO BOVINO DE  
MEXICO.**

**TESIS**

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER  
EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL  
SUSTENTABLE**

**PRESENTA:**

**MVZ. ALEJANDRO NAVA VARGAS**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

**GENOTIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *Mycobacterium bovis* OBTENIDOS A PARTIR DEL GANADO BOVINO DE MEXICO.**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**MAESTRO EN SALUD Y PRODUCCIÓN SUSTENTABLE**

**Presenta:**

Mvz. Alejandro Nava Vargas

**Dirigido por:**

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

**Codirigido por:**

Dr. Oscar Enrique Pizano Martínez

**SINODALES**

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
Presidente

Dr. Oscar Enrique Pizano Martínez  
Secretario

Dr. Feliciano Milián Suazo  
Vocal

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú  
Suplente

Dra. Elba Rodríguez Hernández  
Suplente

Firma  
Firma  
Firma  
Firma  
Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Abril de 2015  
México

## RESUMEN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad causada por *Mycobacterium bovis* que afecta al ganado y otras especies, incluyendo al humano. La TBb es considerada un problema de salud pública, además de que es una barrera no arancelaria para la comercialización del ganado, principalmente con los EU, nuestro principal socio comercial, por lo que México tiene una campaña nacional enfocada a su erradicación. La técnica de VNTR's, es una herramienta de biología molecular basada en la PCR útil en el diagnóstico y la genotipificación de *M. bovis*, identifica de 6 a 24 *loci* para establecer similitudes genéticas en aislados bacterianos, lo que permite determinar la presencia de *M. bovis*, así como establecer rutas de diseminación y focos de infección. El objetivo del presente trabajo fue comparar los patrones genéticos entre aislados de *M. bovis* provenientes del ganado bovino de distintas regiones de México y determinar su distribución geográfica. La PCR se realizó con 12 juegos de iniciadores y los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio para evaluar el tamaño del producto, el cual indica el número de copias de cada *loci* que dan origen al VNTR. Los resultados muestran que los 467 aislados obtenidos de muestras de bovinos sospechosos a la infección con *M. bovis* en diferentes estados de México, se asocian en 13 grupos que comparten el genotipo, mientras que al combinar los patrones VNTR's con el espoligotipo se generaron 17 grupos con relación genética. El dendrograma revela que existe tendencia de agrupación por región, al formarse grupos donde se encuentran aislados de un solo estado, integrados por dos estados de la región, sin embargo también se forman grupos con estados de diferentes regiones. El análisis por VNTR's reveló un alto poder de discriminación de 0.99. La diversidad alelica obtenida para cada uno de los *loci* fue desde 0.239 hasta 0.857. El *loci* que presentó mayor poder de discriminación fue el 2461 (D= 0.857), seguido de 0577 (D= 0.804), mientras que el 2686 (0.239) obtuvo el más bajo.

**Palabras clave:** Genotipificación, *Mycobacterium bovis*, Tuberculosis, VNTR, MIRU, *loci*.

## SUMMARY

Bovine tuberculosis (BTb) is a disease caused by *Mycobacterium bovis*, that affects cattle and other species, including humans. BTb generate large economic losses and is considered a risk to public health; in addition it is a non-tariff barrier to free trade of cattle, mainly with the US, our largest trading partner, so that Mexico has a national campaign aimed to eradication. Is a molecular biology tool in the diagnosis and genotyping of *M. bovis*. VNTR's, a molecular biology tool based on PCR, identifies 6-24 *loci* to establish genetic similarities in bacterial isolates, allowing you to identify the presence of *M. bovis* and establish dissemination routes and sources of infection. The aim of this study was to compare genetic patterns among isolates of *M. bovis* from cattle from different regions of Mexico to determine their geographical distribution. PCR was performed with 12 sets of primers and the products were ran in 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide to assess product size, which indicates the number of copies of each *loci* to generate a specific VNTR. The results show that the 467 isolates obtained from samples of suspected cattle to infection with *M. bovis* in different states of Mexico, were grouped into 13 groups that share the genotype VNTR's while combining the patterns VNTR's with spoligotype, 17 genetically related groups were generated. The dendrogram reveals that there is a tendency to grouping by region, by forming groups which are isolated from one state, composed of two states in the region, but also form groups with states in different regions. A general discrimination for VNTR's of 0.99 was obtained. Diversity results for each of the *loci* ranged from 0.239-0.857. The *loci* that presented the highest discriminatory power was 2461 (D = 0.857) followed by 0577 (D = 0.804), while the 2686 (0.239) had the lowest discriminatory power.

**Key words:** Genotyping, *Mycobacterium bovis*, Tuberculosis, VNTR, MIRU, *loci*.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo recibido para la realización de este trabajo como estudiante de posgrado.

Al cuerpo académico de la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable en general por su apoyo durante la realización del presente trabajo.

A mis padres Violeta y Alejandro por todo el apoyo y confianza brindados durante este tiempo tan importante.

A mi hermana Kelly y a mi hermano Kelvyn por su apoyo y cariño.

A mi director de tesis, Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón por confiar en mí, su apoyo y tolerancia en todo momento.

A mi codirector de tesis Dr. Oscar Pizano por el tiempo dedicado a la realización de este trabajo.

A cada uno de mis sinodales Dr. Feliciano Milián, Dra. Gabriela Aguilar y Dra. Elba Rodríguez, gracias por su tiempo y disposición de formar parte de este comité.

A Yesenia por todas sus ocurrencias que hacen ameno el tiempo en el laboratorio.

A Susy por su apoyo y amistad en el laboratorio.

A Erendira y Carolina por su apoyo en la realización de este trabajo.

A Citlali por ser tan especial en mi vida y por todo su apoyo, comprensión, cariño y buenos consejos dándome ánimos de fuerza y valor para seguir a delante.

A Ulisses, Rolando, Juan Carlos, Víctor Hugo, Ilwikatzin, a Mario por todos esos momentos de distracción y desestres.

A mis compañeros de la maestría por su apoyo en todo momento.

Agradezco por el financiamiento parcial de este trabajo a los fondos económicos:

- Fondos Fiscales INIFAP 2012. Numero de SINASO 17195919662.
  - Proyecto FORDECYT 2012 con Número 193512.
    - Proyecto FOFI-UAQ FNV-2012-08.
    - Proyecto FOPER-UAQ 2014.

# ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>I</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>VII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISION DE LITERATURA</b>	<b>3</b>
2.1 Historia de la tuberculosis	3
2.2 Características Generales de la tuberculosis	4
2.3 Epidemiología de la tuberculosis	6
2.4 Características generales de <i>M. bovis</i>	7
2.5 Hospederos de <i>M. bovis</i>	10
2.6 Patogenia de <i>M. bovis</i>	13
2.7 Genoma de <i>M. bovis</i>	15
2.8 Identificación molecular de <i>M. bovis</i>	17
2.9 Caracterización genotípica de micobacterias por espoligotipificación	19
2.10 Genotipificación mediante el Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR)	20
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
3.1 Objetivo General	24

3.2	Objetivos Específicos	24
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1	Extracción de ADN de <i>M. bovis</i> en cultivo	25
4.2	Preparación de la PCR	25
4.3	Evaluación de los amplicones de los VNTR's en gel	26
4.4	Evaluación de la información epidemiológica y molecular	26
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
5.1	Aislados de <i>M. bovis</i>	28
5.2	Genotipificación de los aislados de <i>M. bovis</i>	29
5.3	Evaluación de la información molecular	31
5.4	Discriminación genética de los aislados de <i>M. bovis</i>	38
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>42</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>43</b>
<b>VIII.</b>	<b>APÉNDICE</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1.	Clasificación taxonómica de <i>M. bovis</i> .	7
2.	Distribución y vías de transmisión de <i>M. bovis</i> en hospederos de vida libre.	12
3.	Número de aislados analizados por estado.	28
4.	Estados que constituyen los 13 grupos generados por los patrones VNTR.	32
5.	Determinación de la heterogenicidad de cada <i>loci</i> MIRU-VNTR en los aislados de <i>M. bovis</i> .	40



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Árbol filogenético basado en el análisis del gen ribosomal 16S del grupo de micobacterias de crecimiento lento.	5
2.	Estructura morfológica del bacilo <i>Mycobacterium bovis</i> .	8
3.	Componentes de la pared celular de micobacterias.	10
4.	Representación esquemática del genoma de <i>M. bovis</i> .	16
5.	Representación esquemática de la ubicación de los marcadores moleculares dentro del cromosoma de <i>M. tuberculosis</i> cepa X.	18
6.	Esquema de la localización de los 41 MIRU's en el genoma de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	22
7.	Electroforesis en gel de agarosa de la cepa de referencia de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	29
8.	Electroforesis en gel de agarosa de la cepa de referencia de <i>M. bovis</i> AN5.	29
9.	Frecuencia de los espoligotipos de <i>M. bovis</i> .	31
10.	Análisis filogenético de los patrones obtenidos por VNTR's.	34
11.	Análisis filogenético de los patrones VNTR's y espoligotipo.	35
12.	Dendrograma de los patrones VNTR's y Spoligotipo integrado por aislados únicos de Hidalgo.	36
13.	Dendrograma de los patrones por VNTR's y espoligotipo integrado por aislados de diversos estados.	36
14.	Dendrograma de los patrones VNTR's y espoligotipo integrado por aislados de Coahuila y uno solo de Jalisco.	37

## I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBb) es una enfermedad bacteriana crónica causada por *Mycobacterium bovis*, una bacteria patógena intracelular obligada que se caracteriza por producir granulomas en diferentes órganos, especialmente pulmones y nódulos linfáticos de varias especies animales y el hombre (Pollock y Neill, 2002; Gibson *et al.*, 2004; Lari *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2006). En bovinos se caracteriza por la formación de estos granulomas, conocidos también como tubérculos, en cualquier tejido del cuerpo, aunque las lesiones se observan con mayor frecuencia en linfonodos de cabeza, cuello, tórax y en pulmón (Palmer *et al.*, 2007; García-Jiménez *et al.*, 2013).

La Campaña Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina se basa en la utilización de la prueba de tuberculina para el diagnóstico de rutina, para disminuir la prevalencia de TBb en el ganado bovino. La Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 ordena la eliminación de animales reactivos a la prueba; sin embargo, el comportamiento epidemiológico de la prueba ha sido una preocupación constante por su irregular sensibilidad (40%-90%) y especificidad (78%-96%) (Francis *et al.*, 1978; Costello *et al.*, 1997). El porcentaje estimado de ganado infectado que no reacciona a la prueba de tuberculina está alrededor del 19% (Neill *et al.*, 1992; 1994a) y con frecuencia los animales que reaccionan no presentan lesiones en rastro. El desecho de animales falsos positivos es un costo extra para el productor debido a la eliminación de animales que se encuentran libres de la infección (Milián *et al.*, 2010), de igual manera, la reincidencia de hatos previamente saneados genera problemas socioeconómicos y de credibilidad en las campañas de erradicación (Wilesmith y Williams, 1987).

El estudio epidemiológico dentro de la microbiología se enriqueció con la utilización de técnicas de biología molecular, orientadas a la tipificación de los microorganismos con base en sus características genéticas. A esta rama de la microbiología, cuando se complementa con estudios de relaciones epidemiológicas, se le denomina epidemiología molecular. La aplicación de técnicas de biología molecular en la identificación de micobacterias aisladas a

partir de medio líquido o sólido permite establecer diagnósticos más rápidos y confiables. La mayor parte de las técnicas comercializadas se basan en la amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de secuencias génicas específicas de especies del género *Mycobacterium* que son de utilidad para distinguir los miembros del complejo de *M. tuberculosis* de otras micobacterias, pero no entre ellos. Algunos de los métodos que se emplean para el estudio de la epidemiología molecular de la TB son, el análisis de las Unidades Repetitivas Interespaciadas de Micobacterias junto con el Numero Variable de Repeticiones en Tandem (MIRU-VNTR, por sus siglas en inglés) y la determinación de espoligotipos (Amadio *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2008; Milián-Suazo *et al.*, 2008).

En este trabajo se determino el perfil genotípico de aislados de *M. bovis* mediante la técnica de VNTR's; lo que permitirá comprender con detalle la epidemiología de la enfermedad y establecer con ello el origen y las rutas de infección de *M. bovis* en las regiones estudiadas; estos datos podrán ser considerados para el diseño de nuevas estrategias para el control y erradicación de la tuberculosis bovina en demanda del acuerdo binacional México-Estados Unidos para disminuir la prevalencia de la enfermedad en menos del 0.5% en el hato nacional.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Historia de la tuberculosis

La existencia del género *Mycobacterium* data desde hace más de 150 millones de años y se dice que el ancestro de *Mycobacterium tuberculosis* coevolucionó con los primeros homínidos hace alrededor de tres millones de años (Small, 1999; Ospina, 2001).

Se han identificado ácidos nucleicos de *Mycobacterium tuberculosis* en momias egipcias de hace 5.000 años, en India desde hace 3,300 años y en China 2,300 años, en Colombia se identificaron micobacterias en restos óseos y dentarios de los años 1200 a 1600 DC, en el departamento del Cauca y en una momia prehispánica encontrada en el departamento de Santander en Colombia. Aquí fue posible diagnosticar tuberculosis ya que presentaba las lesiones típicas de la enfermedad en los huesos, Mal de Pott y posteriormente fue confirmada por ribotipificación 16S, confirmando la presencia de la enfermedad (Rodríguez *et al.*, 2000; Ospina, 2001; Sotomayo *et al.*, 2004).

Inicialmente la TB fue denominada como “tisis” en la literatura griega. Hipócrates describió la enfermedad como la más diseminada de todos los tiempos, además dijo que casi siempre era fatal y que ocurría más frecuentemente en personas entre 18 y 35 años de edad. Aunque Aristóteles consideró la tuberculosis como una enfermedad contagiosa, la mayoría de los griegos creían que era una enfermedad hereditaria; luego Hipócrates definió la tisis como una ulceración en los pulmones aunado a síntomas como dolor en el pecho acompañado de tos, fiebre ligera, y expulsión de esputo con pus y asoció la enfermedad con malnutrición (Gutiérrez *et al.*, 2005).

En el siglo XVII se inician las descripciones anatómo-patológicas de la enfermedad, se describen los tubérculos que estaban siempre presentes en los pulmones y el nombre de tisis es sustituido por tuberculosis (Palomino *et al.*, 2007), además se describen tres fases de la enfermedad: inflamación, ulceración y tisis (Herzog, 1998). En 1546, se explica la naturaleza contagiosa de la

enfermedad en el libro *De Morbus contagiosus*, en donde se explica que es causada por partículas que podían sobrevivir fuera del cuerpo por años (Sledzik y Bellantoni, 1994). En 1970 Benjamin Marten habla del contagio de la TB por pequeñas criaturas vivas que entran al cuerpo y causan TB, además plantea que las personas que viven muy cerca de un enfermo, que duermen en la misma cama o que conviven con él son susceptibles de sufrir también la enfermedad (<http://www.state.nj.us/health/cd/tbhistory.htm>).

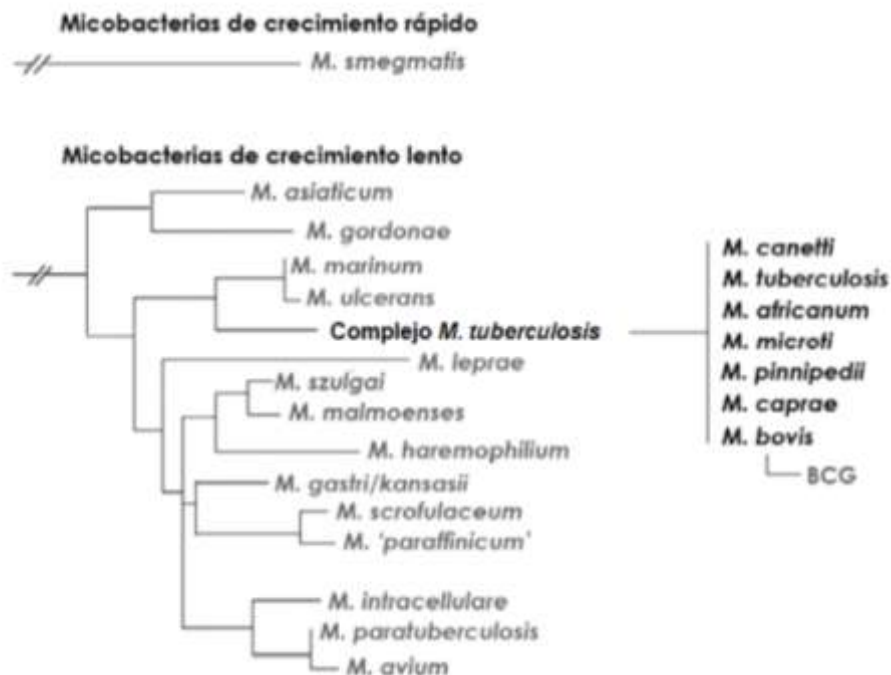
En 1882, Robert Koch hizo su más famosa presentación en Berlín acerca de la etiología de la TB (*Die aetiologie der Tuberculose*), él utilizó un medio de cultivo compuesto de papa y agar para obtener microorganismos puros, y además desarrollo nuevas metodologías para la tinción de bacterias basadas en azul de metileno para evidenciar la bacteria (Koch, 1882; Koch, 1891; Kaufmann y Schaible, 2005).

## **2.2 Características Generales de la tuberculosis**

El género *Mycobacterium* pertenece al filo Actinobacteria, Clase Actinobacteria, Orden Actinomycetales, Suborden Corinebacterinae, y tiene su propia familia, la Micobacteriaceae (Murray y John, 2005). La característica común del género es que son bacterias gram-positivas, ácido alcohol resistente, tiene forma de varilla delgada, es inmóvil, aerobia, de crecimiento lento y no tiene la capacidad de la esporulación. Los estándares mínimos para la asignación de una cepa al género *Mycobacterium* incluye ADN con el contenido de G+C en un rango de 61 a 71%, y síntesis de una cadena larga de ácido micólico que contenga entre 60 y 90 átomos de carbono que se adhieren del C22 al C26 esteres metílicos de ácidos grasos (Lévy-Frébault y Portaels, 1992). Las micobacterias patógenas contienen una estructura capsular que protege a la bacteria de actividades microbicidas de los macrófagos y también contribuye a la barrera de permeabilidad de la envoltura celular micobacteriana (Daffé y Draper, 1998; Rastogi *et al.*, 2001).

A través de los años se han elaborado numerosas clasificaciones de este género, dentro las cuales la que se aplica más fácilmente es aquella que divide a las micobacterias en dos grupos: micobacterias no cultivables o difíciles de cultivar y las cultivables, dentro de esta última se establece una subdivisión en bacterias de crecimiento rápido (colonias visibles en medios de cultivo sólido en menos de 7 días) y las de crecimiento lento (colonias visibles en más de 7 días) (Romero, 2012).

Dentro del grupo de micobacterias de crecimiento rápido se encuentra la mayoría de especies saprófitas de vida libre a las que se les conoce como “micobacterias ambientales”, “micobacterias atípicas” ó “micobacterias no tuberculosas”. Por otra parte, en el grupo de micobacterias de crecimiento lento se encuentran las de mayor importancia veterinaria y de Salud Pública (Figura 1) (Biet *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Árbol filogenético basado en el análisis del gen ribosomal 16S del grupo de micobacterias de crecimiento lento. Se demuestra que el complejo tuberculosis incluyendo *M. tuberculosis* y *M. bovis* difieren genotípicamente del complejo *Mycobacterium avium-intracelular* (Modificado de Biet *et al.*, 2005).

### **2.3 Epidemiología de la tuberculosis**

La tuberculosis sigue siendo un grave problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en continentes como Asia y África en donde las condiciones socioeconómicas favorecen la transmisión de la enfermedad y las tasas de incidencia alcanzan los 363 casos por 100,000 habitantes. Para el año 2006 se reportaron 9.2 millones de casos nuevos de la enfermedad, con una tasa de incidencia de 139 por 100,000 habitantes, con 1.7 millones de muertes para este mismo año; de estos, 0.7 millones de infectados eran pacientes con VIH y 0.2 millones de estas muertes se presentaron en este mismo grupo de población (WHO Report, 2008).

Se estima que a nivel mundial una de cada tres personas está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculosis es la responsable del 2.5% de la carga de enfermedad global, se estima que el número total de casos nuevos a nivel mundial alcanza los 14.4 millones de personas infectadas, de 0.5 millones de casos, se estiman 25 causados por MDR TB (Tuberculosis multirresistente a drogas). El 75% de las personas infectadas con TB se encuentran en edad productiva, de 15 a 59 años, afectando principalmente más a los hombres que a las mujeres; sin embargo, la TB causa más muertes en mujeres jóvenes que todas las causas de mortalidad materna juntas (OMS, 2004; WHO Report, 2008).

En 1993, la tuberculosis fue declarada por la OMS como emergencia sanitaria mundial, debido al aumento sostenido del número de casos en los últimos años y a algunos macroindicadores que le confieren a la enfermedad esta característica de emergencia mundial como son: la tercera parte de la población mundial está infectada con el bacilo, de los cuales uno de cada 10 personas desarrollará la enfermedad; más de la mitad de las personas morirán a causa de la enfermedad si no reciben tratamiento oportuno; por cada persona infectada con el bacilo, se infectan aproximadamente de diez a quince personas en el lapso de un año. Cada día 20,000 personas desarrollan tuberculosis y de ellas 5,000 mueren por su causa. Entre las enfermedades de etiología infecciosa, la tuberculosis es la segunda causa de muerte a nivel mundial, se estima que entre

el 2000 y el 2020 se infectarán cerca de un billón de personas, de las cuales morirán aproximadamente 200 millones si no se aplican medidas eficaces para el control de la enfermedad (WHO Report, 2008).

#### 2.4 Características generales de *M. bovis*

*M. bovis* es el agente etiológico de la tuberculosis bovina, pero se sabe que tiene una amplia gama de hospederos entre los miembros del CMTB. En 1898, el patólogo Theobald Smith mostró que el bacilo de la tuberculosis aislado de humanos y aquellos aislados de ganado difería en su capacidad de infectar diferentes especies animales (Smith, 1898); a pesar de la aceptación de que *M. bovis* es diferente de *M. tuberculosis*, no fue hasta 1970 que *M. bovis* fue oficialmente reconocido como especie (Cuadro 1) (Karlson y Lessel, 1970).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de *M. bovis* (Karlson y Lessel, 1970).

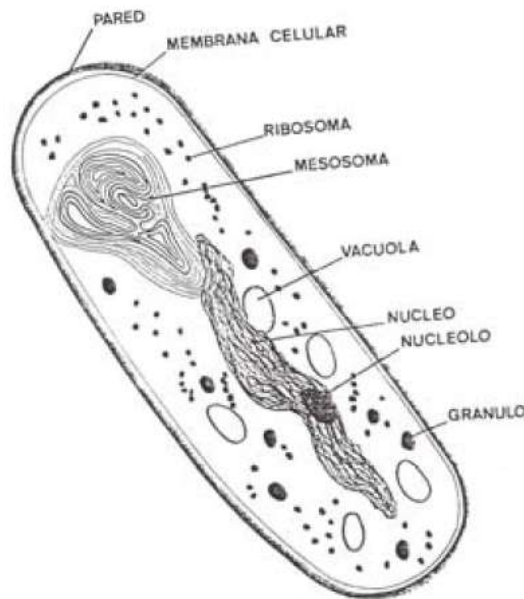
TAXÓN	NOMBRE
Reino	<i>Bacteria</i>
Filo	Actinobacteria
Orden	Actinomycetales
Suborden	Corynebacterineae
Familia	Mycobacterineae
Género	<i>Mycobacterium</i>
Especie	<i>M. bovis</i>

*M. bovis* tiene forma bacilar estructurada morfológicamente por una pared celular y una membrana celular, contiene ribosomas, mesosomas, vacuolas, núcleo, nucléolo y gránulos (Figura 2). Considerando el rango de tamaños propios del género, puede resultar corto y relativamente grueso cuando se observa en frotis teñidos con Ziehl-Neelsen, o bien moderadamente largo, delgado y formando cadenas en las preparaciones obtenidas a partir de medios de cultivo (Timoney *et al.*, 1988). Al igual que las demás micobacterias son ácido-alcohol-resistente. Esta característica se debe a que su pared celular contiene lípidos de alto peso molecular que las hace impermeables a los colorantes habituales de anilina, por lo que no se pueden apreciar con claridad en la tinción de Gram, por lo que para poder visualizar este bacilo es necesario utilizar colorantes arilmetanos



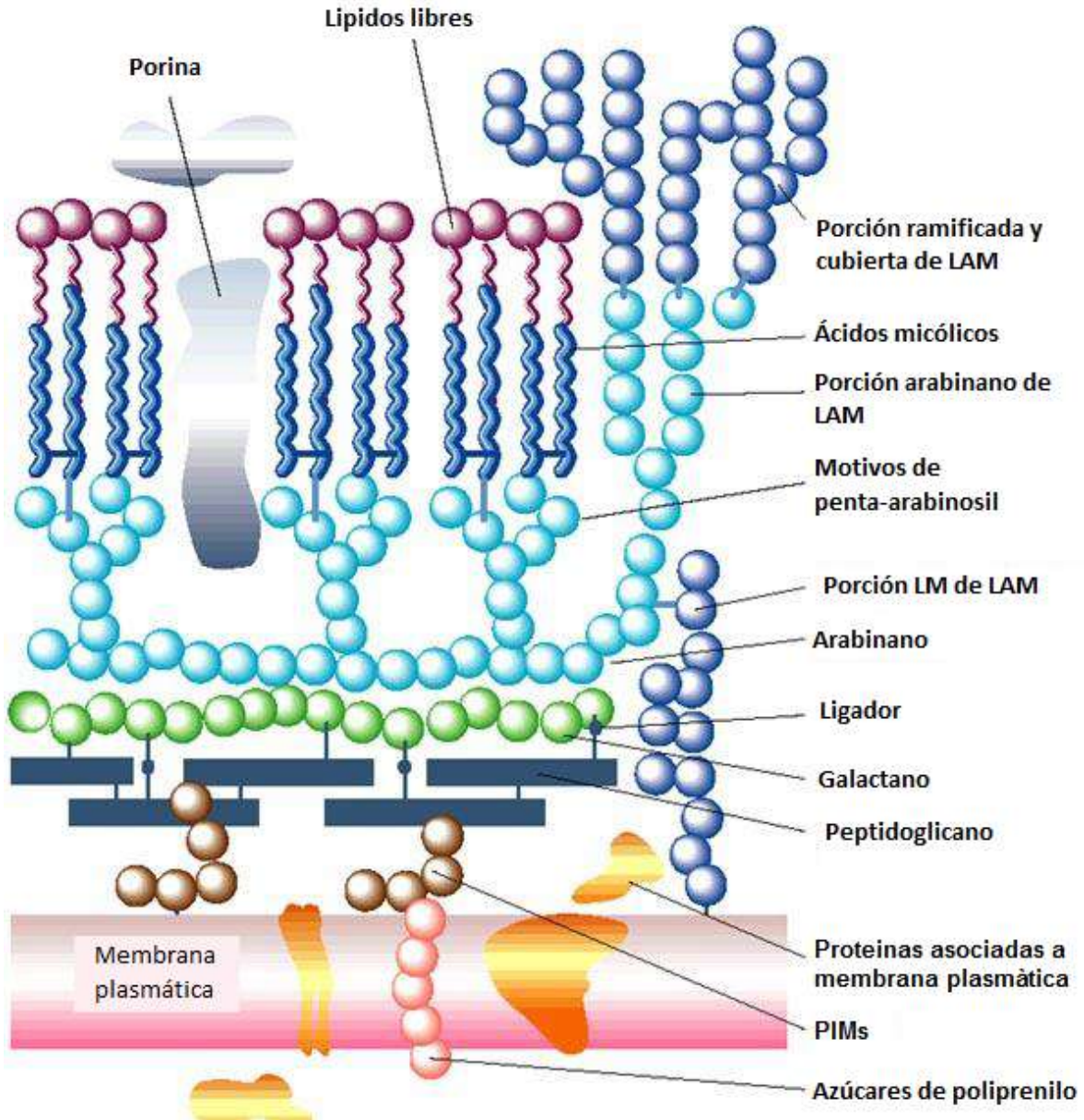
con los que una vez teñidas no se decoloran (Prat *et al.*, 2003; López *et al.*, 2006; Dorronsoro y Torroba, 2007).

El bacilo es resistente a los ácidos, los álcalis y a la desecación, puede sobrevivir varios meses en ambientes fríos, particularmente en condiciones de humedad, oscuridad y bajas temperaturas. En invierno perdura por 5 meses en las heces y en verano por 2 meses (O'Reilly y Daborn, 1995), es sensible a la luz solar directa, rayos UV, temperaturas mayores a los 70°C y a desinfectantes orgánicos como el fenol y los cresoles (Vadillo *et al.*, 2002; Falkinham, 2003). En condiciones de laboratorio, requiere una incubación de 4 a 8 semanas para producir colonias visibles, las cuales son lisas, redondas e irregulares, presentan un crecimiento disgónico y no producen pigmentos carotenoides (no cromógenas) (Lake *et al.*, 2002). Debido a su exigencia nutritiva no crecen en medios de cultivo simples, el de elección es Stonebrick ya que el piruvato sódico beneficia su crecimiento (Rebhon *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Estructura morfológica del bacilo *Mycobacterium bovis* (Tomado de Hermoso de Mendoza, 1992).

La membrana externa está formada principalmente por fosfatidil-inositol manosidasa, lipomanano, lipoarabinomanano (LAM) y otros componentes. La pared celular se compone de un núcleo interno de ácidos micólicos, arabinogalactano, peptidoglicano y lipoarabinomanano (Crick *et al.*, 2001). Contiene lipoproteínas y lipoglicoproteínas de superficie, algunas se han asociado a la virulencia del bacilo, sin embargo, hay muchas otras que aún tienen una función desconocida (Wolfe *et al.*, 2010). La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados, dando lugar a moléculas como el LAM, que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad (Gorocica *et al.*, 2005). Los tres principales tipos de AM que produce el *M. bovis* son el alfa micolato, metoximicolato y ketomicolato (Barry *et al.*, 1998), éste tipo de ácidos grasos consta de 90 átomos de carbono, formando una rama larga, llamado meromicolato y una más corta rama- $\alpha$  (Niederweis *et al.*, 2010). Están unidos covalentemente al PG por un polímero de arabinogalactano (D- arabinosa y D- galactosa) (Brennan y Nikaido, 1995). Aunque el genoma de los bacilos parece codificar para más de 100 proteínas de membrana externa, sólo unas pocas han sido identificadas y caracterizadas; la porina MspA es necesaria para el transporte de moléculas y la OmpAtb se requiere para la virulencia (figura 3) (Niederweis *et al.*, 2010).



**Figura 3.** Componentes de la pared celular de micobacterias (Modificado de Park y Bendelac, 2000).

### 2.5 Hospederos de *M. bovis*

Algunas especies animales únicamente son susceptibles a la infección por un solo tipo de micobacteria, pero otras pueden infectarse con dos o hasta tres tipos. *M. bovis* es el más común ya que produce infecciones graves en el hombre

y en todos los animales domésticos, exceptuando las aves (Gillespie y Timoney, 1983).

Los principales animales hospederos de *M. bovis* son especies de la familia *Bovidae*, incluyendo la subfamilia *Bovinae* y *caprinae*. El patógeno ha sido aislado con más frecuencia en ganado doméstico (*Bos taurus*) pero también de varias otras especies de la familia *Bovidae*, incluyendo varias especies de bisonte, búfalo y antílope (cuadro 2) (Clancey *et al.*, 1977; Bengis *et al.*, 1996; Radunz, 2006; Wobeser, 2009; de Garine-Wichatitsky *et al.*, 2010 y Himsforth *et al.*, 2010).

La tuberculosis bovina en animales salvajes ha sido descrita en todo el mundo, sin embargo, es variable entre países y depende de las diversas condiciones epidemiológicas y medioambientales. Los miembros del CMTB, principalmente *M. bovis*, han sido aislados en una amplia gama de especies tales como búfalos, bisontes, cabras, caballos, camellos, cerdos, jabalíes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorros, visones, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, kudús, elanes, tapires, alces, elefantes, sitatungas, órices, addaxes, rinocerontes, zarigüeyas, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como el león, el tigre, el leopardo o el lince, entre otros (O'Reilly y Daborn, 1995; Romero *et al.*, 2008; Thoen *et al.*, 2009; Kaneene *et al.*, 2010; Good y Duignan, 2011). Las consecuencias que tiene esta infección en animales salvajes se centran en tres aspectos fundamentales: 1) el papel de estas especies como reservorio de la infección para los animales domésticos; 2) la morbilidad y la mortalidad que la infección puede causar en la población salvaje, especialmente en las especies protegidas y en peligro de extinción, y 3) el posible impacto en Salud Pública (Fritsche *et al.*, 2004).

Los animales domésticos y de vida libre pueden ser considerados tanto reservorios o no reservorios de la tuberculosis bovina (Morris y Pfeiffer, 1995). En los reservorios, la infección persiste en la especie afectada sin ninguna fuente de reinfección externa y pueden también ser la fuente de infección de otras especies

animales. En un hospedero no considerado reservorio, la infección no persiste indefinidamente a menos que haya una reinfección por parte de otras especies (domésticos o salvajes). Sin embargo, en muchas ocasiones *M. bovis* se ha transmitido del ganado bovino a una especie salvaje susceptible mediante una especie no reservoria. El hospedero no reservorio puede ser considerado el hospedero final y no tener implicación en la transmisión de la enfermedad, o puede actuar como hospedero transmisor de la misma a otras especies animales salvajes o , incluso, volver a los animales domésticos. Por lo tanto, tanto el reservorio como el hospedero no reservorio pueden actuar como vectores de la enfermedad (Palmer, 2007).

El papel de los animales salvajes en el mantenimiento y transmisión de la infección por *M. bovis* al ganado representa un problema en el control de la infección en Europa (Wilson *et al.*, 2009) y Norte América debido a que pueden infectarse por vía oral o respiratoria como se reporta en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Distribución y vías de transmisión de *M. bovis* en hospederos de vida libre (Biet *et al.*, 2005).

<b>ESPECIES</b>	<b>VÍA DE TRANSMISIÓN</b>	<b>PAÍSES</b>
<b>Búfalo africano</b>	Respiratoria	Uganda
<b>Babuino</b>	Oral / Respiratoria	Kenia
<b>Tejón</b>	Respiratoria	Irlanda, Inglaterra
<b>Bisonte americano</b>	Respiratoria	Estados Unidos de América, Canadá
<b>Oso negro</b>	Oral	Estados Unidos de América
<b>Lince</b>	Oral	Estados Unidos de América
<b>Zarigüeya Australiana</b>	Respiratoria	Nueva Zelanda
<b>Guepardo o Chita</b>	Oral / Respiratoria	Sudáfrica
<b>Coyote</b>	Oral	Estados Unidos de América
<b>Ciervo común</b>	Oral / Respiratoria	Nueva Zelanda
<b>Jabalí</b>	Oral	Italia, España, Australia, Hawái, Nueva Zelanda
<b>Hurón</b>	Oral	Nueva Zelanda
<b>Gran kudú</b>	Oral / Respiratoria	Sudáfrica
<b>Leopardo</b>	Oral / Respiratoria	Sudáfrica
<b>León</b>	Oral / Respiratoria	Sudáfrica
<b>Mapache</b>	Oral	Estados Unidos de América
<b>Zorro Rojo</b>	Oral	Inglaterra, Estados Unidos de América
<b>Facóquero Oriental</b>	Oral / Respiratoria	Uganda
<b>Venado cola blanca</b>	Oral / Respiratoria	Estados Unidos de América, Canadá

En Europa occidental, Canadá y Estados Unidos, la infección se ha reducido a niveles inferiores al 0.1 % (Reviriego Gordejo y Vermeersch, 2006; United States Department of Agriculture, 2009; Wobeser, 2009; Koller-Jones, 2010). Centro América, con excepción de Nicaragua y el Caribe, tiene porcentajes de animales afectados muy bajos (menos del 1%) (Abalos y Retamal, 2004; de Kantor y Ritacco, 2006), estando Cuba libre de la enfermedad (Abdala, 1998). Los mayores niveles de infección se encuentran en América del Sur (de Kantor y Ritacco, 2006); en buena parte del territorio de África y ciertas partes de Asia, con prevalencias del 1% o superiores, las cuencas lecheras son las más afectadas (Cosivi *et al.*, 1998).

La tuberculosis bovina tiene un gran impacto en el bienestar animal y en la conservación de la biodiversidad, misma que se ve afectada por el riesgo a la supervivencia de especies en peligro de extinción (Daszak *et al.*, 2000; McCallum y Hocking, 2005; Littin y Mellor, 2005). La presencia de *M. bovis* genera un aumento en la morbilidad y la mortalidad en las poblaciones de animales salvajes. Este evento puede tener efectos catastróficos en la conservación de pequeñas especies protegidas en los que la muerte de un individuo podría representar la pérdida de la especie. En Europa, la escasa población del protegido lince ibérico (*Lynx pardinus*) podría estar en peligro debido a la vulnerabilidad de esta población a la tuberculosis bovina, incluyendo otras causas de mortalidad (Briones *et al.*, 2000; Pérez *et al.*, 2001; Aranaz *et al.*, 2004).

## **2.6 Patogenia de *M. bovis***

Es importante señalar los conceptos de animal infectado y animal enfermo. Un animal infectado es aquel que ha estado en contacto en algún momento con las micobacterias incluidas en el CMTB y que, debido a ello, su sistema inmunológico responde frente a los antígenos de estos patógenos en una segunda exposición. Un animal enfermo es aquel que presenta sintomatología y/o lesiones compatibles con la tuberculosis y, por lo tanto, puede estar excretando el bacilo y transmitiendo la infección a otros animales. La reacción de un animal a

las pruebas inmunológicas indica infección y no necesariamente desarrollo de la enfermedad (Romero, 2012).

*M. bovis* es un bacilo intracelular facultativo que tiene la capacidad de sobrevivir dentro de los macrófagos, esto gracias a que se inhibe la fusión fagosoma-lisosoma, por lo que el bacilo no es digerido y queda en estado de latencia (Aldwell *et al.*, 2001).

Debido a que la transmisión se produce principalmente por vía aerógena, la exposición a los aerosoles está considerada como la ruta más frecuente para la infección de los animales (Menzies y Neill, 2000). Sin embargo, la infección por la ingesta de material contaminado también puede ocurrir (Goodchild y Clifton-Hadley, 2001). En la zona donde se establece el foco primario de infección se produce una lesión muy simple, consistente en una pequeña zona necrótica que acumula bacilos vivos y muertos, rodeada de una capa de macrófagos. A partir de la cual la micobacteria pasará por vía hemolinfática a los nódulos linfáticos (NL) regionales donde se desarrollan las lesiones, quedando constituido el complejo primario de Ranke (Hermoso de Mendoza, 1992). Esta lesión primaria junto con el nódulo linfático regional es denominada como “el complejo primario”. En el foco infectado los macrófagos y las células epiteliales se aglutinan entre sí para formar a las células gigantes de tipo Langerhan, para de esta forma retener a los bacilos y que no afecten a otros órganos. Al utilizar este mecanismo de contención de la infección, se promueve el desarrollo del granuloma, proceso en el cual participan linfocitos, células plasmáticas y monocitos. Si el proceso inflamatorio se vuelve crónico, el tejido circundante presenta una lesión con fibrosis periférica y necrosis caseosa central (Bryson *et al.*, 1994).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad, natural o producida experimentalmente, están influenciadas por varios factores como son: 1) la ruta de infección o inoculación, 2) los factores derivados del hospedero, principalmente la calidad de la respuesta inmune desarrollada, 3) la virulencia de la cepa de microorganismo, y 4) la dosis recibida (Neill *et al.*, 1994b).

Otros factores como la edad del animal, su comportamiento o el sistema de producción influyen en la patogénesis de la enfermedad. En general, los animales jóvenes desarrollan lesiones más severas que los adultos (Martín-Hernando *et al.*, 2007). Además, la enfermedad es más frecuente en vacas lecheras debido al hacinamiento y un mayor periodo de vida y estrés productivo (Ramírez-Villaescusa *et al.*, 2010). Sin embargo, los hatos de producción cárnica pueden verse afectados con alta morbilidad si entran animales infectados y comparten el mismo bebedero.

La virulencia de las cepas depende de una serie de complejas interacciones entre los microorganismos y el hospedero (Collins, 2001). Los bacilos contienen unos factores de virulencia, algunos de ellos asociados a los lípidos de la pared celular, que le permiten contrarrestar las defensas del hospedero, multiplicándose en el punto de entrada antes de su diseminación a otros órganos. Cuanto más virulenta sea una cepa, más tiempo continuará creciendo en el pulmón, aunque comience una resistencia en otros órganos.

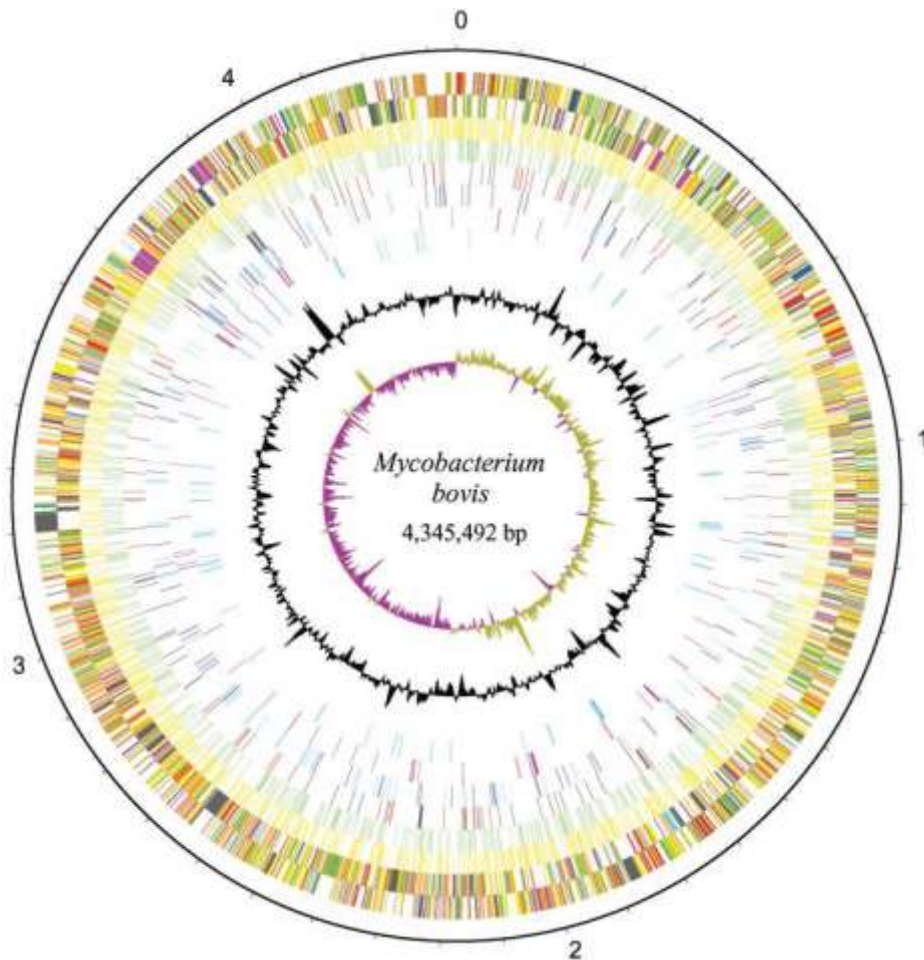
La dosis de infección también afecta a la distribución y severidad de las lesiones. La dosis mínima de infección depende en gran medida de la ruta de infección. En numerosos estudios realizados en cobayos a la infección por vía oral requiere dosis infectivas muy superiores a las requeridas por aerosoles. De hecho, dosis tan bajas de 1-5 bacilos pueden producir infección mediante la vía respiratoria (Neill *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2007).

## **2.7 Genoma de *M. bovis***

La secuencia completa del genoma de *M. bovis* fue publicada en el año 2003 por Garnier *et al.* Este es un genoma circular de 4,345,492 pares de bases que contienen aproximadamente 4 mil genes (figura 4). Las especies que integran el CMTB se caracterizan por presentar una homología a nivel nucleotídico del 99,95% en su genoma, con una proporción elevada de bases G+C (aproximadamente el 65%), y poseer una secuencia idéntica entre estas especies en la subunidad ribosomal 16S (Böddinghaus *et al.*, 1990; Sreevatsan *et al.*, 1997;



Brosch *et al.*, 2002). Sin embargo, estas especies difieren ampliamente en la preferencia de hospedero, fenotipos y patogenicidad. La identificación de estas especies se ha realizado basándose en sus características fenotípicas, existiendo una amplia lista de pruebas bioquímicas, tales como la reducción de nitratos, la producción de niacina o la resistencia a la pirazinamida, y las propiedades de cultivo que ayudan a discernir entre varias especies de micobacterias (Rastogi *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Representación esquemática del genoma de *M. bovis*. El círculo negro exterior muestra la escala en Megabases, donde 0 representa el origen de replicación. Los siguientes dos círculos moviéndose desde el exterior muestran las hebras sentido y antisentido de las secuencias codificantes. A continuación, se muestran las comparaciones con la secuencia de *M. tuberculosis* H37Rv; las transiciones en amarillo y transversiones en verde, las inserciones (rojo, 1 pb; negro >1 pb) y deleciones (azul oscuro, 1 pb; azul claro >1 pb); las secuencias reemplazadas por nuevas regiones en *M. bovis* son mostradas en purpura. Los elementos IS y fagos se muestran en el siguiente círculo, con el contenido de G+C y luego finalmente se muestra la polarización de GC (G-C)/(G+C) (Tomado de Garnier *et al.*, 2003).

## 2.8 Identificación molecular de *M. bovis*

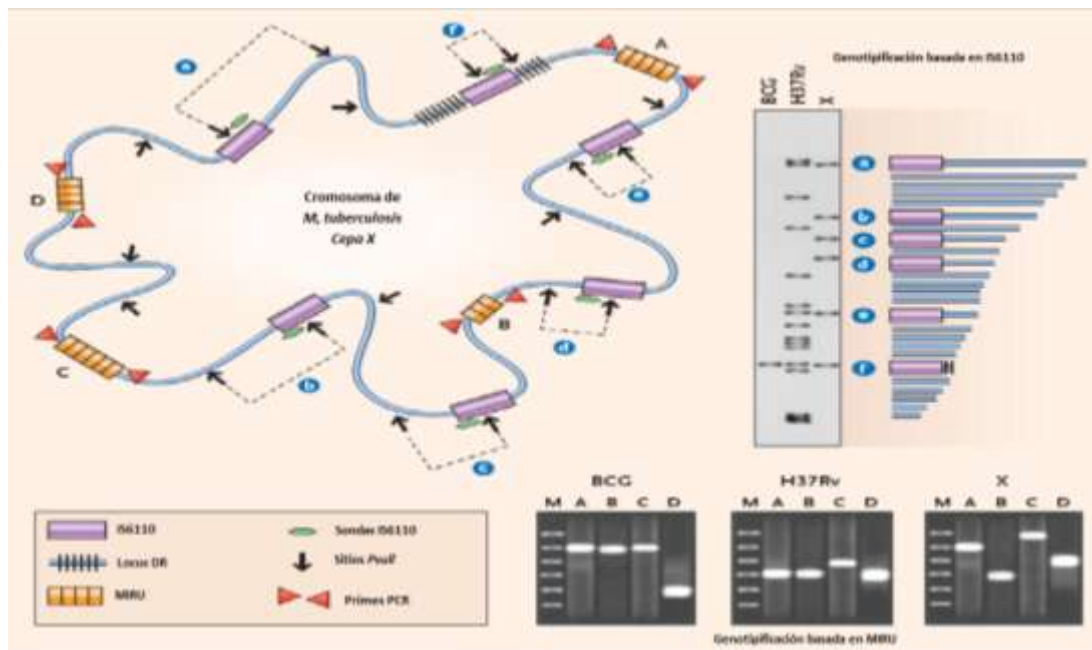
La identificación y caracterización de los aislados de micobacterias anterior a la década de los 90 se realizó principalmente mediante técnicas fenotípicas, y fue a partir de los años 90 cuando comenzó la aplicación de técnicas basadas en el estudio del ADN de las bacterias gracias a los avances en el campo de la biología molecular (Romero, 2012).

La necesidad de técnicas moleculares que permitan la diferenciación molecular de las micobacterias es evidente. La aplicación de estas técnicas ha sido muy importante ya que ayudan a determinar el origen de los brotes, a comprender el vínculo entre los distintos brotes, a mostrar las relaciones entre los casos de tuberculosis en animales domésticos y salvajes, o incluso a identificar la fuente de infección en humanos (Romero, 2012).

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. La rastreabilidad con el principio de estabilidad genética, permite determinar si un animal recientemente introducido es el causante de un brote de tuberculosis, si el brote deriva de reactivación de una infección latente o proviene de la infección de fauna silvestre. La genotipificación requiere de marcadores polimórficos que permitan identificar diferencias entre cepas, estos también pueden llegar a detectar polimorfismos y distinguir entre cepas como clonas diferentes (Acosta *et al.*, 2009).

Gracias a la secuenciación total del genoma de *M. tuberculosis* se han identificado diversos marcadores genéticos utilizados para la caracterización y la diferenciación de cepas que infectan personas en un periodo de tiempo determinado, los cuales facilitan la caracterización de las cepas sin tener que realizar la secuenciación completa de las bacterias, lo cual constituye un ahorro en costos y tiempo. El método estándar para la genotipificación de aislados de *M. tuberculosis* es el polimorfismo de fragmento de restricción (RFLP) análisis de la distribución de la secuencia de inserción IS6110 en diferentes cepas, y grandes

bases de datos de genotipos basada en IS6110 que están disponibles; El genoma de *M. tuberculosis* contiene muchas unidades repetitivas interespaciadas de las micobacterias (MIRUs), algunos contienen unidades repetidas idénticas y otras que contienen repeticiones que varían ligeramente en la secuencia y longitud. (Figura 5) (Cole *et al.*, 1998; Kwara *et al.*, 2003; Hawkey *et al.*, 2003).



**Figura 5.** Representación esquemática de la ubicación de los marcadores moleculares dentro del cromosoma de *M. tuberculosis* cepa X para genotipificación: RFLP IS-6110, espigotipificación y MIRUs VNTR. Resultados de la genotipificación basada en IS6110 y genotipificación basado en MIRU. (Modificado de Barnes y Cave, 2003).

La genotipificación requiere marcadores moleculares polimórficos que definan diferencias sutiles entre las diversas cepas, algunos de estos son capaces de detectar polimorfismos y distinguir a la cepa como una clon diferente, pero no todos son capaces de detectar dichas diferencias. Por lo tanto, para genotipificar cepas de micobacterias se debe de considerar el cambio que cada uno es capaz de detectar de manera efectiva. Se deben seleccionar marcadores genéticos dependiendo de su tasa de mutación (Haddad *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 1999).

La conservación de secuencias entre todos los miembros de CMTB tiene una consecuencia práctica muy importante: las técnicas desarrolladas para la caracterización molecular de una especie se pueden adaptar a las otras. A pesar de esta homogeneidad genética entre los miembros de CMTB existen varias regiones del ADN muy polimórficas, que varían tanto en el número y/o posición del elemento genético estudiado o en la estructura primaria del mismo. Estas regiones polimórficas corresponden en muchas ocasiones a genes que codifican proteínas, cuya variabilidad les proporciona una ventaja selectiva sobre otras bacterias (Telenti *et al.*, 1993) o los antígenos implicados en la evasión de la respuesta inmune (Baena y Porcelli, 2009). Otros polimorfismos se encuentran en regiones intergénicas que pueden inducir variabilidad en los genes adyacentes, como pueden ser las secuencias de inserción (*insertion sequence*, IS) o la repetición de una misma secuencia (Otal *et al.*, 2008).

Las técnicas de diagnóstico basadas en la amplificación de ADN de *M. bovis*, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede amplificar cantidades extremadamente pequeñas de ADN (Milián *et al.*, 2010). Los métodos más usados en la actualidad para la tipificación de cepas de *M. bovis* en estudios con fines epidemiológicos macro es la espiligotipificación (Kamerbeek *et al.*, 1997) y el análisis de las unidades repetitivas interespaciadas de las micobacterias ó el análisis del número variable de repeticiones en tandem.

## **2.9 Caracterización genotípica de micobacterias por espiligotipificación**

La espiligotipificación es una de las técnicas más utilizadas para la genotipificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Acosta *et al.*, 2009). La espiligotipificación es un método que detecta la presencia de espaciadores de secuencias repetidas (DR) en un locus del genoma de las micobacterias que integran en CMTB. Cuando se compararon las DRs de varios aislados, se observó que el orden de los espaciadores era similar, pero que ocurrían algunas deleciones o inserciones. De este modo, el polimorfismo viene de la ausencia/presencia de uno o más de estos espaciadores variables. Así, la

espoligotipificación detecta la presencia o la ausencia de estos espaciadores de secuencia conocida, característica que es utilizada para determinar similitud genética entre cepas. Aunque esta técnica es básicamente utilizada para la tipificación de cepas extraídas de cultivo, también ha demostrado su utilidad para simultáneamente detectar y tipificar cepas del complejo *M. tuberculosis*. Dado que el procedimiento involucra la amplificación de la región DR por PCR, seguido de la hibridación con oligonucleótidos específicos para cada espaciador, esta técnica muestra mayor sensibilidad y especificidad que otros métodos basados en PCR (Milián *et al.*, 2010).

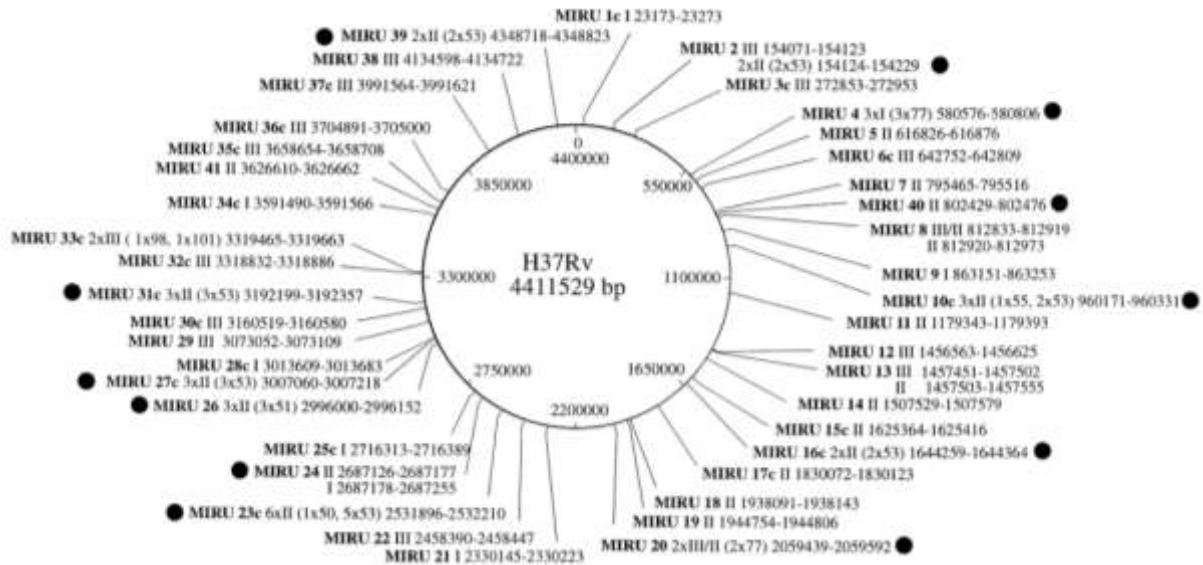
El *locus* de DR es el único en el genoma de los miembros de CMTB que muestra un considerable grado de polimorfismo. Esta región está formada por dos tipos de secuencias: unas secuencias denominadas DR que son todas ellas idénticas y de un tamaño de 36 pb, separadas por otras secuencias llamadas espaciadores con un tamaño entre 34 y 41 pb (Hermans *et al.*, 1991; van Soolingen *et al.*, 1993; Groenen *et al.*, 1993). La diferencia entre dos aislados reside en la presencia/ausencia de estos espaciadores. A la secuencia formada por un DR y su espaciador adyacente se le denomina DVR (*direct variant repeat*). Estos polimorfismos se han empleado para distinguir entre las cepas de los miembros de CMTB (Aranaz *et al.*, 1998; Kremer *et al.*, 1999), así como los taxones dentro del grupo de CMTB (van Soolingen *et al.*, 1997; van Soolingen *et al.*, 1998; Aranaz *et al.*, 1999).

## **2.10 Genotipificación mediante el Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR)**

Estos marcadores genéticos, antes denominados minisatélites, fueron identificados inicialmente en seres humanos, donde han tenido su mayor aplicación en pruebas forenses y de paternidad. 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. 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. La utilización de esta técnica ha permitido genotipificar diversos microorganismos, como: *M. leprae*, *M. ulcerans*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 2005; Koeck *et al.*, 2005; Hilty *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Ciammaruconi *et al.*, 2008; Pourcel *et al.*, 2009; Moon *et al.*, 2010; Cuyck *et al.*, 2011).

Las secuencias repetidas en tándem se describieron por primera vez en los genomas eucariotas, se les llama microsatélites a los *loci* con secuencias cortas repetidas (*short sequence repeats*, SSRs) de 1-4 pb; mientras que a los *loci* con 10-100 pb se les conoce como minisatélites. Muchas de estas secuencias presentan hipervariabilidad alélica relacionada con el número de repeticiones y/o con la variabilidad entre las secuencias (VNTR's). En las últimas décadas, se han descrito en las micobacterias regiones similares a los minisatélites encontrados en humanos (Supply *et al.*, 1997; Frothingham y Meeker- O'Connell, 1998). La mayoría de los VNTR's encontrados en los genomas secuenciados disponibles, por ejemplo *M. tuberculosis* y *M. bovis*, corresponden con las llamadas MIRUs (figura 6), que son minisatélites compuestos por secuencias de un tamaño entre 40-100 pb, distribuidos en 41 localizaciones del cromosoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Supply *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Esquema de la localización de los 41 MIRU's en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Los puntos negros indican las posiciones de los 12 MIRU's que presentan mayor polimorfismo (Tomado de Supply, 2000).

La localización intergénica de los marcadores MIRU-VNTR en las especies incluidas en el género *Mycobacterium* (por ejemplo *M. tuberculosis* y *M. leprae*), hace que la mayoría de los minisatélites MIRU-VNTRs que contienen un marco de lectura abierto, se superponga con los codones de terminación e iniciación de los genes adyacentes (Supply *et al.*, 1997).

Los MIRU se agrupan en tres familias de acuerdo a su tamaño: de 46 a 53 pb, de 58 a 101 pb y de 77 a 101 pb, se estiman de 40 a 50 MIRU en el genoma de *M. tuberculosis*, cuya diferencia con otros VNTR radica en su asimetría y orientación en fase con los genes adyacentes. Para la genotipificación del complejo *M. tuberculosis* se han utilizado las 12 MIRU con mayor polimorfismo. Las MIRU tienen una estabilidad mayor de 18 meses y debido a que su análisis implica a más de un *locus*, su poder de discriminación es comparable al descrito para los RFLP -IS6110 y -DR. Además, tienen una reproducibilidad intra e interlaboratorios, hasta de un 98 %, por lo que son buenos marcadores para estudios de epidemiología molecular. La genotipificación por las MIRU basada en PCR tiene la ventaja de analizar cantidades mínimas de ADN y que en

combinación con la espiligotipificación permite discriminar entre un mayor número de cepas no relacionadas. Los resultados expresados con el número de secuencias repetidas presente por *locus* permiten comparar rápidamente cepas y crear bases de datos mundiales (Acosta *et al.*, 2009).



### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Comparar los patrones genéticos entre aislados de *M. bovis* provenientes del ganado bovino de distintas regiones de México para determinar su distribución geográfica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Obtener los patrones genéticos específicos de cada aislado bacterianos.
- Establecer la relación genética de los aislados mediante un análisis filogenético de los espoligotipos y el perfil VNTR.
- Determinar el poder de discriminación general y particular de los patrones de VNTR para la validación de los genotipos obtenidos.
- Identificar la distribución espacial de los genotipos obtenidos en el estudio.

#### **IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

Los aislados de *Mycobacterium bovis* incluidos en este estudio fueron 467, obtenidos de muestras de bovinos que presentaban lesiones compatibles con la infección, en diferentes estados de México.

La identificación de los patrones genéticos de los aislados se realizó mediante la técnica de VNTR's, para lo cual se utilizó una serie de 12 iniciadores específicos (Apéndice 1), utilizando las cepas H37Rv (cepa humana) y AN5 como controles positivos.

##### **4.1 Extracción de ADN de *M. bovis* en cultivo**

La extracción de ADN se realizó a partir de 100 mg del aislado en cultivo, los cuales fueron disueltos en 0.2 ml de amortiguador TE 1X y se incubaron en baño María a 95 °C durante 45 minutos para lisar la micobacteria y obtener el material genético.

Posteriormente se realizó la cuantificación del ADN en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific) y se evaluó la integridad del ADN por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

##### **4.2 Preparación de la PCR**

Los 12 iniciadores se reconstituyeron para tener una solución de almacenaje a una concentración final de 200 µM en agua grado PCR y se hicieron alícuotas que se almacenaron a -20°C protegidas de la luz. La alícuota que se descongeló para uso fue guardada a 4°C.

La reacción de PCR fue realizada en un termociclador (Bio-Rad C1000 Thermal Cycler) a un volumen final de 10 µl, cada tubo de reacción contenía 1.25 U de Taq polimerasa; 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1x de amortiguador (Applied Biosystems. Cat. 4311818); 1µl de DMSO (Sigma Aldrich Cat. 472301); 4 mM de dNTP's (Invitrogen, Cat. 10297-117); 1 µM de iniciador sentido y 1 µM de iniciador antisentido (Invitrogen Custom Primers); 2.0 µl de ADN y ajustado al volumen final con agua libre nucleasas (Apéndice 2) bajo las siguientes condiciones de

amplificación: desnaturalización inicial de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos con desnaturalización de 95°C por 1 minuto, alineación a 55°C por 1 minuto y extensión a 72° por 1:30 minutos; y finalizando con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

#### **4.3 Evaluación de los amplicones de los VNTR´s en gel**

Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa (Bio Rad, Cat. 161-3112) al 2% teñido con bromuro de Etidio (Bio Rad, Cat. 161-0433) para determinar el tamaño de los fragmentos, para establecer el patrón MIRU-VNTR. A los fragmentos amplificados se les determinó el peso molecular, el cual fue relacionado con su número de copias (Apéndice 3), se generó un código numérico de 12 dígitos que representa las veces que se encuentra expresado un *locus* en particular en cada uno de los aislados y así se determinó el perfil correspondiente.

#### **4.4 Evaluación de la información epidemiológica y molecular**

Una vez obtenidos los patrones, se analizaron mediante el software MIRU-VNTR plus, disponible en la página ([www.miru-vntrplus.org](http://www.miru-vntrplus.org)). *El software* en mención correlaciona el patrón de VNTR con el respectivo espigotipo del aislado, permitiendo tener un índice de discriminación (D) mayor que si evaluáramos por separado cada una de estas dos técnicas. Donde la D indica la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar tengan la misma secuencia genética. Para realizar el análisis didáctico e integral de los aislados incluidos en el estudio, se realizó el análisis filogenético para establecer la relación genética, así como la distribución geoespacial de los genotipos obtenidos.

Una vez establecidos los patrones VNTR´s se utilizó una herramienta de bioinformática para calcular el poder de discriminación genética como el “Discriminatory power calculator” disponible en [http://insilico.ehu.es/mini\\_tools/discriminatory\\_power/](http://insilico.ehu.es/mini_tools/discriminatory_power/) el cual se basa en el índice de diversidad de la fórmula de Simpson:

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

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

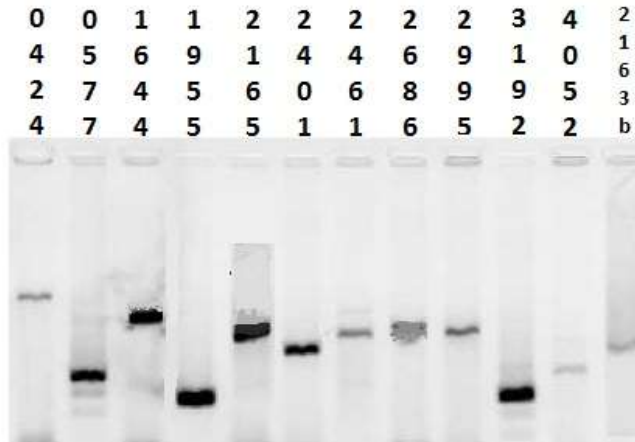
### 5.1 Aislados de *M. bovis*

Fueron analizados un total de 467 aislados de *Mycobacterium bovis* provenientes de diversos estados de país, mediante los marcadores MIRU-VNTR y espoligotipo (Cuadro 3).

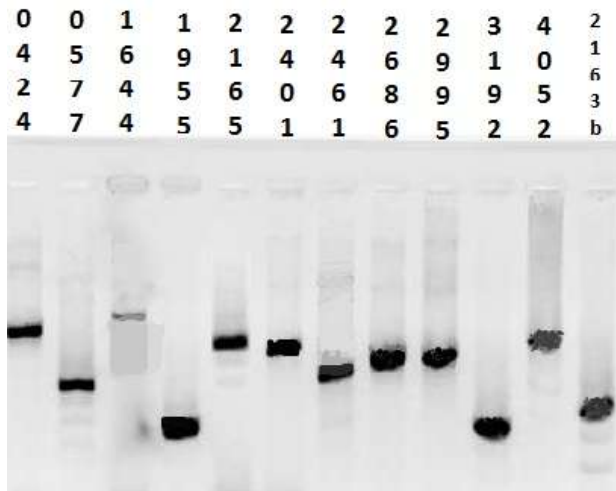
**Cuadro 3.** Numero de aislados analizados por estado.

<b>ESTADO</b>	<b>AISLADOS</b>
Hidalgo	94
Estado de México	75
Querétaro	56
Jalisco	51
Guanajuato	43
Coahuila	41
Aguascalientes	29
Baja California	27
Michoacán	14
San Luis Potosí	14
Zacatecas	10
Nayarit	7
Chiapas	2
Durango	2
Colima	1
Nuevo León	1
<b>Total</b>	<b>467</b>

Cada experimento se proceso a la par con las cepas de referencia H37Rv y AN5, la primera corresponde a una cepa humana de *M. tuberculosis* y la segunda a una cepa bovina de *M. bovis* (Figura 7 y 8).



**Figura 7.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TBE de la amplificación de los 12 *loci* utilizando ADN genómico de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa humana), utilizada como control positivo.



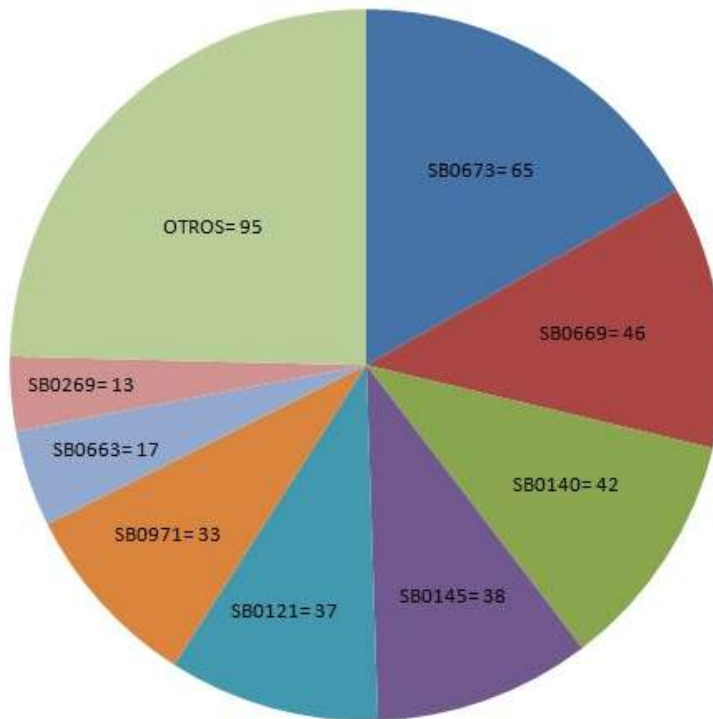
**Figura 8.** Electroforesis en gel de agarosa al 2% en solución amortiguadora TBE de la amplificación de los 12 *loci* utilizando ADN genómico de la cepa de referencia de *M. bovis* AN5 (cepa bovina), utilizada como control positivo.

## 5.2 Genotipificación de los aislados de *M. bovis*

En un estudio previo realizado por Milián *et al.*, 2012 obtuvieron resultados del análisis de espoligotipificación en el cual encontró un total de 47 espoligotipos, donde se agruparon a los 467 aislados; de los cuales el SB0673 es el de mayor número con 65 aislados, seguido de SB0669, SB0140, SB0145, SB0121 y SB0971 con 46, 42, 38, 37 y 33 aislados respectivamente; el resto de los espoligotipos se encontraron con menos de 10 cada uno (figura 9).

En el 2005 Cobos-Marín *et al.*, reporta a los espoligotipos SB0121 y SB0140 como los de mayor frecuencia en el norte de México, mientras que Rodwell *et al.*, en el 2010, en un estudio con aislados de *M. bovis* obtenidos de humanos donde de 106 pacientes estudiados 66 eran nacidos en México y el resto nacidos en Estados Unidos, y 104 de los 106 eran hispanos, encontró a los espoligotipos SB0145 y SB0140 como los más frecuentes; así también reportó que en ganado nacido en México el SB0673 fue el más frecuente con 118 aislados de 498 que representa el 23.8% y seguido de SB0121 con el 9.7% de los aislados.

Lo que puede ser indicativo del movimiento de ganado infectado sin un control sanitario adecuado en el norte del país, o bien que estos espoligotipos sean exclusivos de esa región, sin embargo son estudios realizados con aislados de una región en particular, en cambio nuestro trabajo se realizó con muestras provenientes de distintos estados del país lo que permite conclusiones más sólidas sobre la regionalización de algunos espoligotipos como el SB0140 y SB0121 que lo podemos encontrar en aislados del norte, bajo y centro sur (Estado de México, Hidalgo y Michoacán). Es probable que la poca frecuencia de algunos espoligotipos sea más bien consecuencia de la poca cantidad de aislados proporcionados en algunos estados como son Zacatecas, Nayarit, Chiapas, Durango, Colima y Nuevo León, que puede sugerir una prevalencia baja de la enfermedad en estos estados.



**Figura 9.** Frecuencia de los espigotipos de *M. bovis* analizados de distintas partes de la república.

Para los MIRU-VNTR se encontraron 421 patrones únicos, de los cuales varios de ellos son muy parecidos, la diferencia en el número de repeticiones en muchos de los casos son en uno o dos *loci*, lo que sugiere que pueden ser el resultado de nuevas líneas genéticas derivadas de mutaciones. Cada patrón obtenido fue analizado en la base de datos MIRU-VNTR PLUS que permite compara los aislados. Cuando se realizó el análisis de los patrones MIRU-VNTR utilizando los 12 *loci* ya mencionados y el espigotipo, se generaron arboles filogenéticos, así como también un dendrograma.

### 5.3 Evaluación de la información molecular

Al realizar el árbol filogenético con los patrones obtenidos solo con VNTR's se observan grupos conformados únicamente con estados de la misma región como son los grupos 2, 3 y 6; o bien un grupo como el 9, el cual incluye aislados de un mismo estado. Sin embargo, también podemos distinguir grupos como el 4 y el 10 en los cuales tenemos estados de diferentes regiones, por lo que no



podemos descartar el movimiento de ganado infectado entre esos estados. Por otra parte tenemos grupos (1, 8, 11, 12 y 13) que muestran patrones de distintos estados del país (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Estados que constituyen los 13 grupos generados por los patrones VNTR.

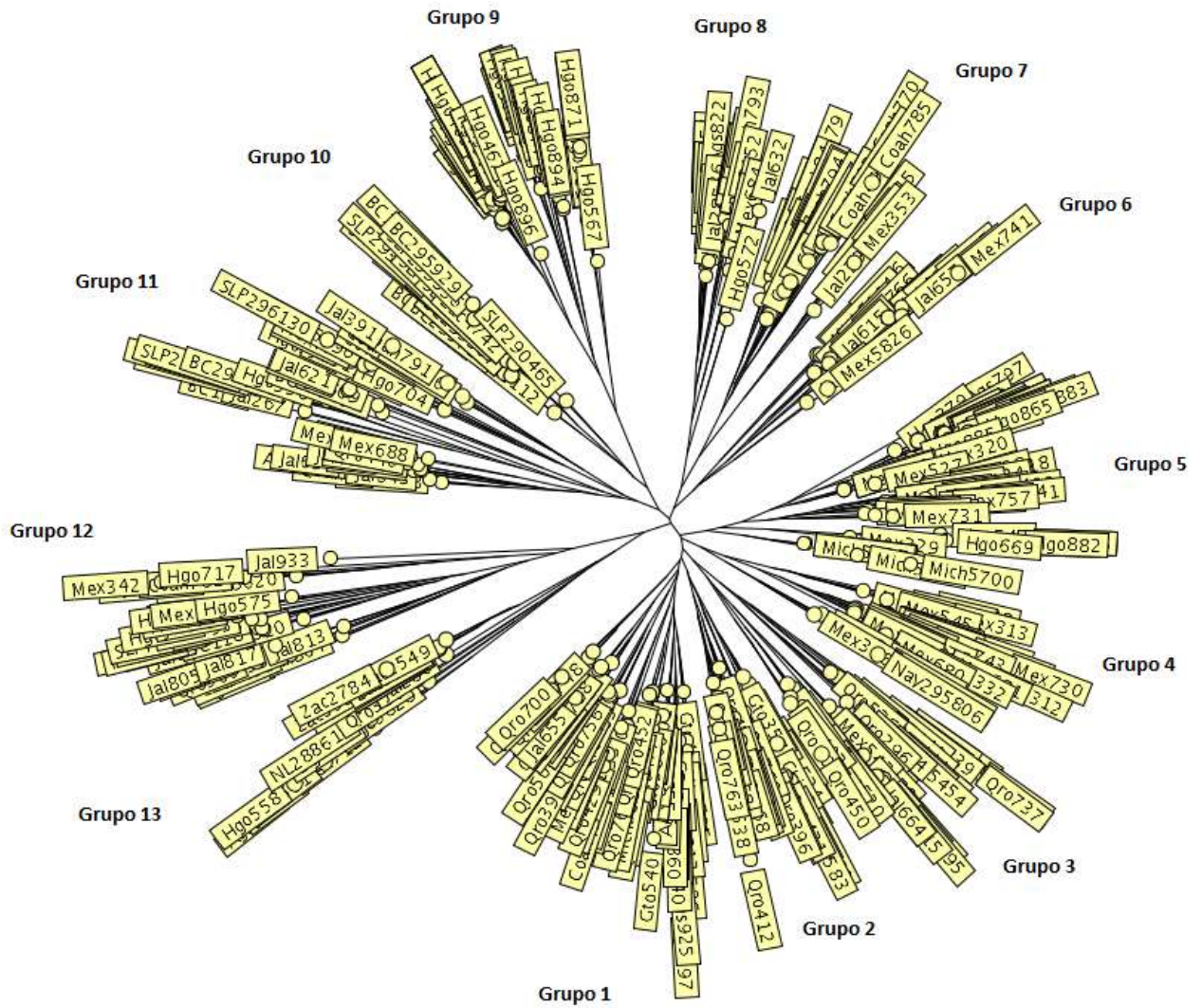
ESTADO	GRUPOS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Querétaro	+	+	+								+	+	+
Jalisco	+		+			+	+	+			+	+	
Guanajuato	+	+											
Aguascalientes	+				+			+			+		
Hidalgo					+			+	+		+	+	+
Baja California										+	+		
Estado de México	+		+	+	+	+	+				+	+	
Michoacán	+				+								
San Luis Potosí										+	+	+	
Zacatecas													+
Nayarit				+									
Coahuila	+						+	+					
Chiapas	+												
Durango													+
Colima	+												
Nuevo León													+

Los patrones genéticos obtenidos de nuestros aislados a partir de MIRU-VNTR y la espiligotipificación pueden ser comparados con patrones de otros estados o bien de otros países, como por ejemplo los Estados Unidos de Norteamérica, con quien México tiene una amplia historia de comercio de ganado. Esto puede ayudar a realizar investigaciones epidemiológicas para identificar relaciones genéticas entre los aislados y poder inferir sobre la distribución de la infección por *M. bovis*, según lo propuesto por Martínez *et al.*, 2008. La distribución de patrones genéticamente relacionados en distintas regiones puede ser un indicativo de la movilización de ganado, lo que puede indicar el porqué de la presencia de estados como Jalisco y Querétaro en diversos grupos.

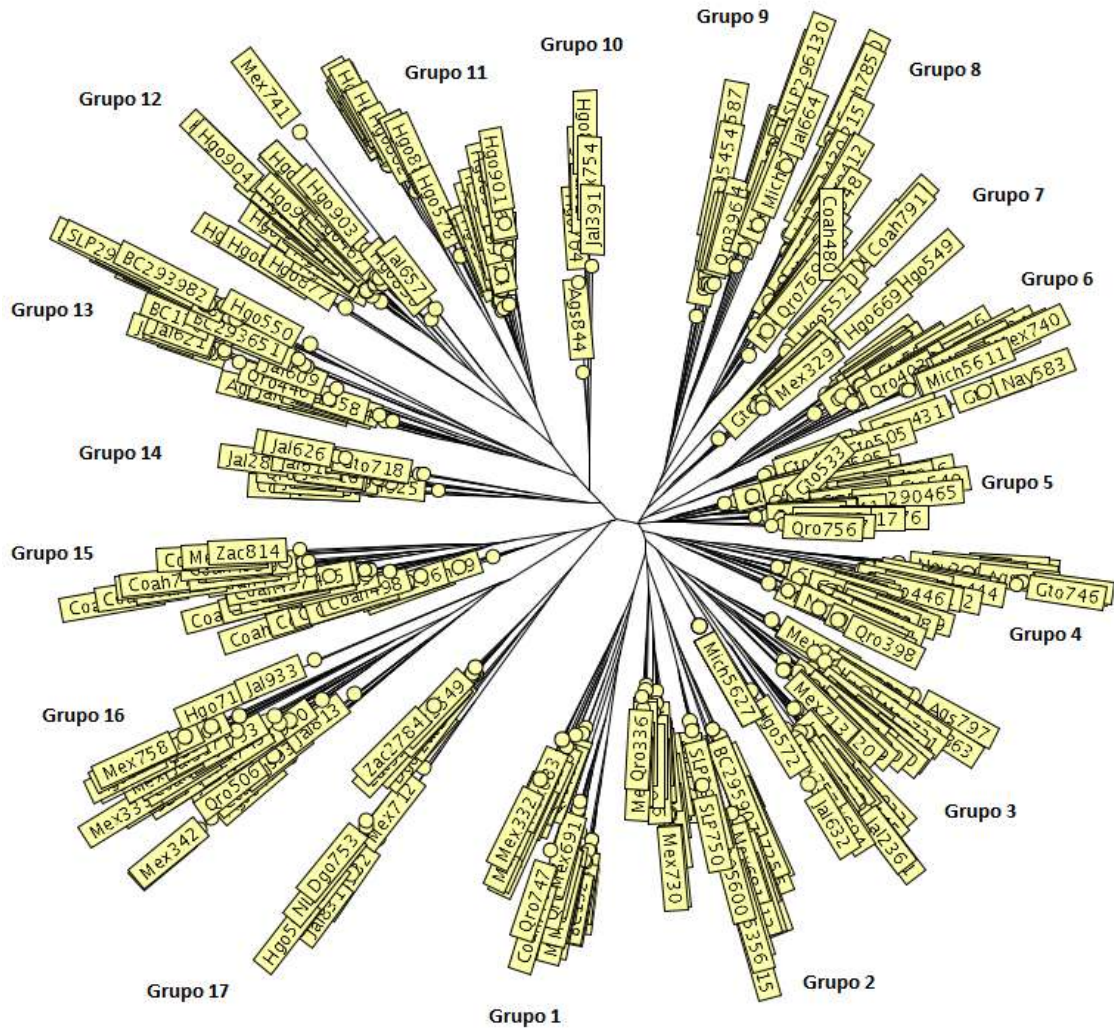
En un reporte en el 2010 se demostró que pueden encontrarse genotipos exclusivos de una región en aislados de ganado doméstico y de vida silvestre (Duarte *et al.*, 2010), datos que ajustan con los resultados encontrados en este

trabajo, donde se obtuvieron patrones únicos como lo son los del estado de Hidalgo. No obstante, en un trabajo realizado en tejones en el 2012 por Furphy *et al.*, no encontraron evidencia de agrupación de los VNTR's dominantes ya que se encontraron en una amplia zona geográfica. Lo que sugiere que puede variar la utilidad de cada locus de VNTR de un país en función de cómo evolucionen las cepas del CMTB en cada región geográfica y en su situación epidemiológica.

En la figura 10 se observa el árbol filogenético tomando en cuenta únicamente los patrones MIRU-VNTR. Aquí se identifican 13 grupos que se encuentran genéticamente relacionados, que al juntarlos y analizarlos conjuntamente con el espoligotipo, se identifican 17 grupos con relación genética (Figura 11), lo que indica que al manejar estos dos marcadores genéticos se obtiene un poder discriminatorio superior que al utilizarlos por separado.



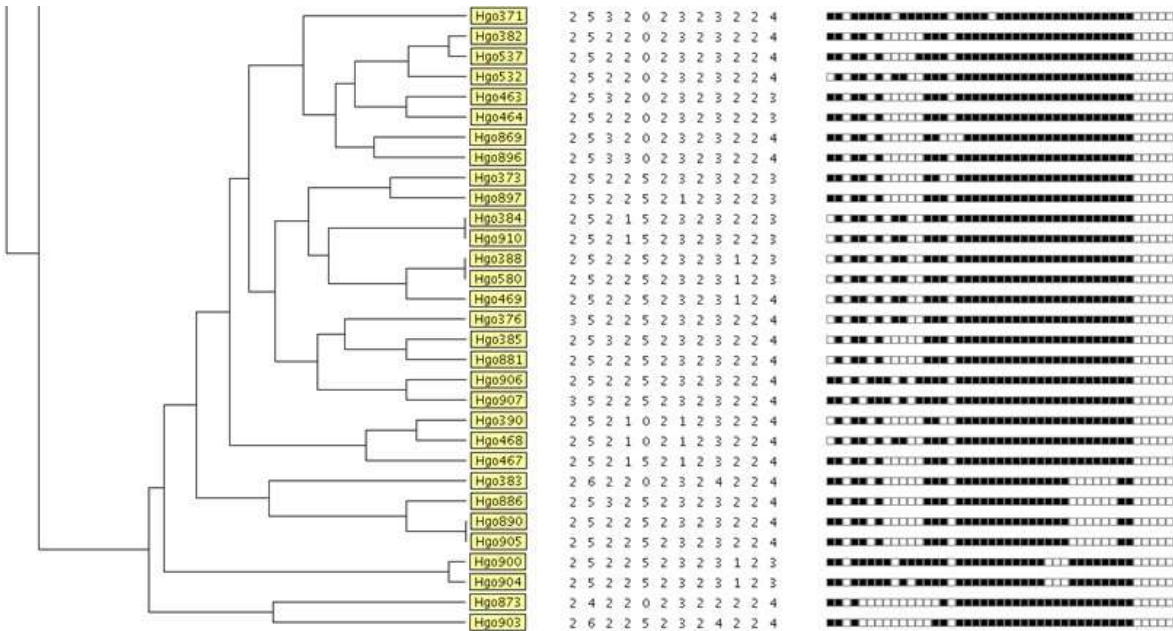
**Figura 10.** Análisis filogenético de los patrones obtenidos por VNTR's. Los perfiles se asocian en 13 grupos genéticamente relacionados (software MIRU-VNTR PLUS).



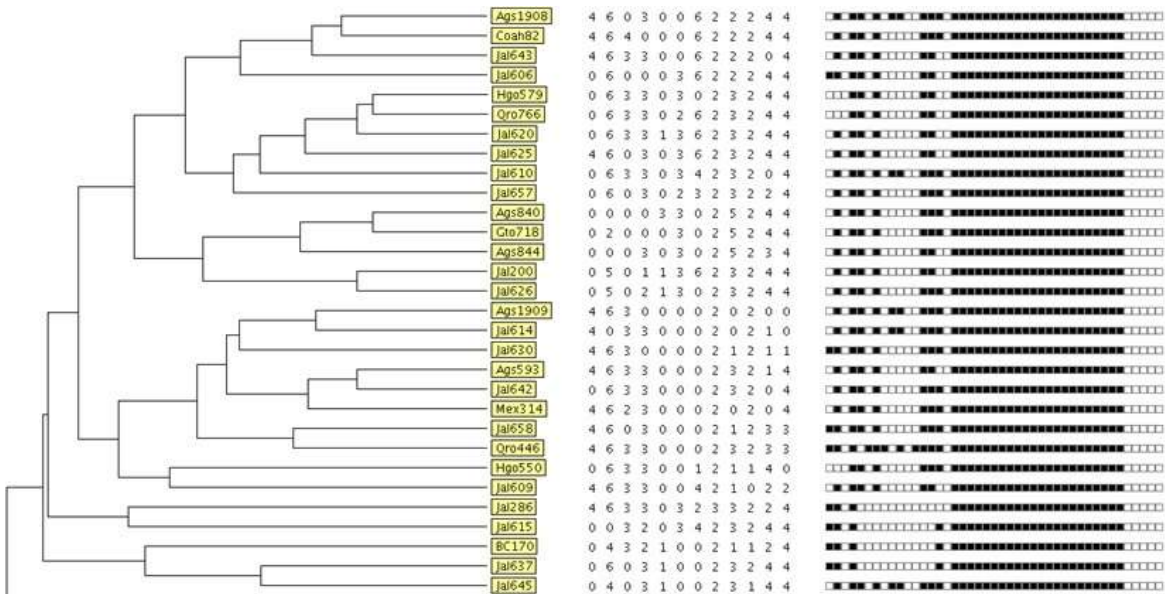
**Figura 11.** Análisis filogenético de los patrones VNTR's y espilogotipificación en conjunto, donde se observan 17 grupos con relación genética. (software MIRU-VNTR PLUS).

La teoría de tipificación molecular establece los aislamientos relacionados epidemiológicamente se derivan de la expansión clonal de un solo precursor y como resultado tienen características comunes que difieren de los que no están relacionados epidemiológicamente (Maslow y Mulligan, 1993). El uso de una característica particular para la tipificación como el espilogotipo y el VNTR está relacionada con su estabilidad dentro de una cepa y su diversidad dentro de las especies, por lo tanto se espera que los aislados de una misma región estén más relacionados que entre cepas de diferentes regiones, de acuerdo con esto, en el dendrograma creado con los patrones VNTR's y espilogotipos (Apéndice 4), se

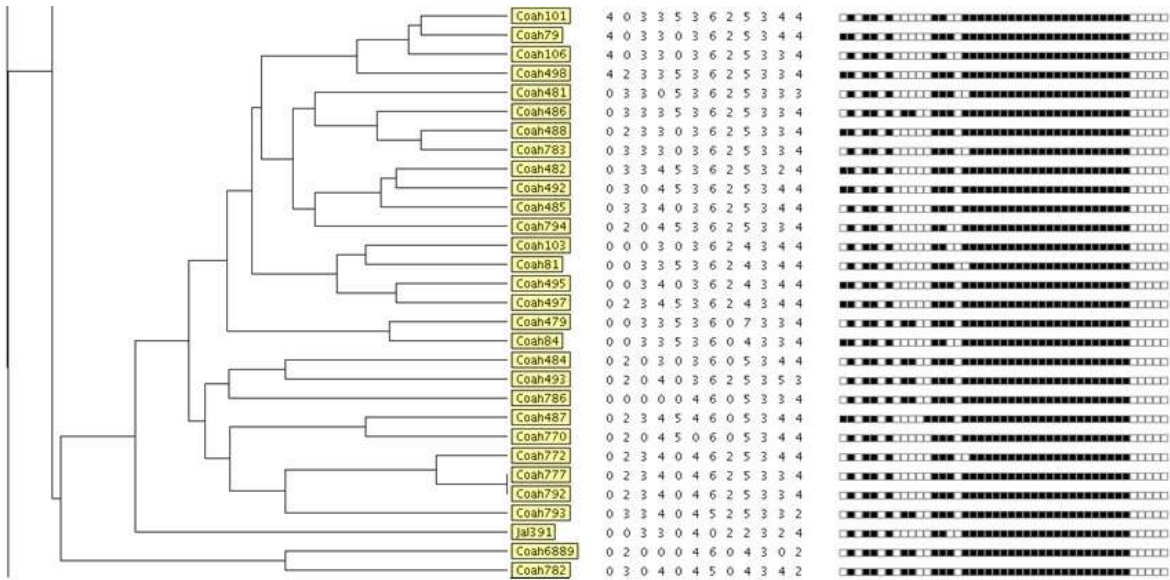
identifican grupos compuestos por aislados de un mismo estado (Figura 12), sin embargo también fueron identificados grupos donde se observa que pueden estar integrados por aislados de diversos estados (figura 13); o bien donde predominan aislados de un estado, pero incluyendo también de otra región (Figura 14).



**Figura 12.** Dendrograma de los patrones VNTR's y Spoligotipo donde se muestra un grupo que está integrado por aislados únicos de Hidalgo (software MIRU-VNTR PLUS).



**Figura 13.** Dendrograma de los patrones por VNTR's y spoligotipo donde se muestra un grupo que está integrado por aislados de diversos estados (software MIRU-VNTR PLUS).



**Figura 14.** Dendrograma de los patrones VNTR´s y espoligotipo donde se muestra un grupo que está integrado por aislados de Coahuila y uno solo de Jalisco. (software MIRU-VNTR PLUS).

Recientemente se ha informado de que la expansión clonal después de un cerco sanitario en la población bovina es un determinante importante en la reducción de la diversidad de cepas de *M. bovis* (Smith *et al.*, 2006). La erradicación incompleta de brotes durante la campaña con la "prueba- sacrificio" puede haber permitido la supervivencia de las cepas. Además, no puede descartarse que los animales de vida silvestre infectados puedan infectar al ganado doméstico.

Aunque la espoligotipificación logra una agrupación razonable de los aislados, el poder de discriminación se incrementa al incluir MIRU-VNTR. Lo cual no es extraño dado que MIRU-VNTR analiza una mayor cantidad de genoma del *Mycobacterium*. Por lo cual, se recomienda que siempre que sea posible se utilicen ambos métodos para dar una mejor imagen de la diversidad genética. Un aspecto importante también del análisis de los grupos en el dendrograma; es además identificar los genotipos idénticos para poder relacionarlos o separarlos en distintas regiones geográficas.

Nuestros resultados coinciden con lo encontrado por Assam *et al.*, en el 2013, quienes encontraron que al combinar los espoligotipos con los MIRU-VNTR se obtiene un poder discriminatorio mayor que los clúster formados sólo por el espoligotipo. La tipificación por MIRU-VNTR reduce significativamente el número de vínculos epidemiológicos entre los aislamientos, mientras que la espoligotipificación sobreestima estos enlaces debido a que varios aislados pueden presentar el mismo espoligotipo pero diferente patrón VNTR (Ereqat *et al.*, 2012).

Con los patrones obtenidos del análisis de los 12 MIRU-VNTR se realizó un árbol filogenético y uno en combinación con el espoligotipo, así como un dendrograma. En todos se observa una gran diversidad de los aislados en las diferentes regiones del país. Al comparar la capacidad discriminatoria de las dos técnicas, la espoligotipificación diferencia los aislados en 47 patrones, mientras que la tipificación por VNTR los clasifica en 421 patrones, lo que confirma su utilidad para la diferenciación de aislados y los estudios evolutivos de las micobacterias (Frothingham y Meeker-O'Connell, 1998; Lamine *et al.*, 2014). En cualquier caso, la aplicación combinada de ambas técnicas logra la discriminación máxima de *M. bovis*, lo que permite la mejora de las herramientas moleculares para la investigación epidemiológica y la vigilancia de la etiología de TBb (Allix *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2008 y Lamine *et al.*, 2014).

#### **5.4 Discriminación genética de los aislados de *M. bovis***

En este estudio se utilizaron 12 *loci* con lo cual se logró un índice discriminatorio de 0.990, por lo que son particularmente útiles para diferenciarlos dentro de los grupos de espoligotipos más comunes. En el 2010 Duarte *et al.*, mencionan que al utilizar una tipificación con 8 *loci* obtienen un poder discriminatorio de 0.99. Por otra parte, en el trabajo realizado por Rodríguez-Campos *et al.*, en el 2013 reportan una discriminación de 0.9689, 0.9826 y 0.9856 cuando utilizaron un total de 4, 6 y 9 *loci* respectivamente.

En el 2010 McLernon *et al.*, utilizando solo la técnica de VNTR's se tiene un índice de discriminación de 0.918. Cuando solo se utilizó la espoligotipificación, la discriminación fue de 0.700; al combinar el espoligotipo con 4, 5 y 6 VNTR's incrementó a 0.930, 0.930 y 0.933 respectivamente, lo que concuerda con nuestros resultados, nuestro índice de discriminación fue de  $D= 0.990$ .

En el Cuadro 5 se muestra el número de ocurrencias para cada perfil alélico y el poder discriminatorio para cada *loci*. La diversidad obtenida para cada uno de los *loci* fue desde 0.239 hasta 0.857; como se observa, el 2461 tiene una D de 0.857, el más alto entre el set de VNTR's utilizado en el estudio. En segundo lugar, el VNTR 0577 con una D de 0.804, mientras que el 2686 fue el más bajo, con una D de 0.239. Lari *et al.*, en el 2011 en un trabajo realizado con aislados de *M. bovis* obtenidos a partir de humanos identificó a los VNTR's 1644, 1955 y 2995 con poco poder de discriminación (0.10) y 0424, 2165, 3192, 4052 y 2163b con poder de discriminación satisfactorio (0.22 - 0.55). En el 2012 Hlokwe *et al.*, de un panel de 29 *loci* analizados, identificaron a los VNTR 0577, 1644,1955, 2461, 2995, 3192, 4052 y 2163b con una diversidad alélica en el rango de 0.42 a 0.63, con poder de discriminación elevado, mientras al 2165 con un rango entre 0.16 a 0.33 como moderadamente discriminatorio. Nuestros resultados concuerdan con estos reportes, ya que hemos identificado al 2165 dentro de los *loci* con alto poder de discriminación y a 2686 con una diversidad alélica de 0.239 (Roring *et al.*, 2004; Allix *et al.*, 2006; Michel *et al.*, 2008; Boniotti *et al.*, 2009 y Lamine *et al.*, 2014).



**Cuadro 4.** Determinación de la heterogenicidad de cada *loci* MIRU-VNTR en los aislados de *M. bovis*.

VNTR	Numero de ocurrencias para cada perfil alélico por VNTR									*D
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>3192</b>	19	43	307	98						0.514
<b>2686</b>	16	2	406	18	25					0.239
<b>1955</b>	66	21	59	262	59					0.655
<b>1644</b>	117	4	163	177	5	1				0.6719
<b>4052</b>	49	9	99	133	166	11				0.737
<b>0577</b>	121	*	43	77	65	123	36	2		0.804
<b>2163b</b>	43	13	89	84	223	14	1	*	*	0.694
<b>2165</b>	193	10	11	53	34	118	48	*	*	0.737
<b>0424</b>	109	*	70	15	267	6	*	*	*	0.596
<b>2401</b>	55	7	84	269	45	*	3	4	*	0.613
<b>2995</b>	7	22	24	66	124	201	21	2	*	0.718
<b>2461</b>	55	47	7	69	82	88	73	33	13	0.857

\*D= Poder Discriminatorio

De acuerdo a los resultados obtenidos, utilizando los *loci* 0577, 2461, 4052, 2165 y 2995 para la tipificación de los aislados de *M. bovis*, se puede obtener un poder discriminatorio apropiado debido a su elevada discriminación, para diferenciar aislados provenientes de distintas regiones del mundo y, además, los patrones que se obtengan y que sean obtenidos posteriormente, pueden ser comparados con los provenientes de cualquier parte del mundo (Weniger *et al.*, 2010), por lo que esta técnica MIRU-VNTR con estos *loci* puede ser utilizada para genotipificar *M. bovis* en muchos países con los que México tiene intereses comerciales y flujo de productos pecuarios, sin embargo, otros trabajos muestran resultados donde la D difiere en cada VNTR como en el realizado por Martínez *et al.*, 2011, en el cual encontró una D= 0.22 para el 2165 mientras que Duarte *et al.*, 2010 lo reporta con D= 0.615.

En el 2013 Assam *et al.*, y Duarte *et al.*, 2010 reportan que los *loci* 2461, 4052 y 2163b (D= 0.6-0.74) presentan un alto poder discriminatorio y el 3192 (D< 0.2) con baja diversidad alélica; mientras que Malama *et al.*, en el 2014 obtiene que el 2461 y el 2163b no son discriminatorios, al 2165 con discriminación aceptable y al 2995, 3192 y 4052 con buena discriminación. En un trabajo realizado en el 2011 por Price-Carter (2011) hace una comparación de 45 locus de VNTR's reportados por diferentes autores, reporta la variabilidad de la

discriminación de cada *loci*; por lo tanto para las comparaciones internacionales, es conveniente que los países empleen muchos de los mismos VNTR para la tipificación, lo que indica que para estudios epidemiológicos dentro de un país el sistema de tipificación con los VNTR más discriminatorios serán diferentes entre países, encontrando explicación del porqué pueden variar los resultados obtenidos en diferentes trabajos.

Una ventaja del presente estudio en relación a trabajos previos es el alto número de aislados y regiones geográficas que incluye, otros estudios contienen pocos aislados o bien sólo corresponden a alguna región en particular; contrario a esto, la deficiencia de este tipo de estudios es la carencia de información epidemiológica disponible para cada aislado, lo que limita la validez de las conclusiones sobre la regionalización de los patrones obtenidos y que se pueda explicar mejor el comportamiento del *Mycobacterium* en estas regiones geográficas (Milián *et al.*, 2012).

## VI. CONCLUSIÓN

Nuestra investigación presenta una visión de *M. bovis* del ganado bovino en México utilizando dos métodos diferentes de tipificación molecular: espigotipificación y MIRU-VNTR. Se demostró que la combinación de estos dos métodos incrementa el poder discriminatorio para la caracterización de los aislados.

Sin embargo, una desventaja de utilizar ambas técnicas es que ofrecen un poder discriminatorio muy alto a comparación que si estas se realizaran por separado, por lo que al identificar cambios pequeños en el ADN de *M. bovis*, no permite agrupar los aislados debido a esta pequeña diferencia, por lo que en términos de agrupación genética no es del todo bueno aplicar un elevado poder de discriminación.

Se demostró que la tipificación con 12 *loci* es una buena opción para la genotipificación de cepas de *M. bovis* en México. Los VNTR's más discriminatorios fueron el 2461, 2995, 2165 y el 4052. Se comprobó que en México existe una alta diversidad genética de *M. bovis* al igual que lo reportado en otros países. La determinación del genotipo obtenido en este estudio representa un primer intento de establecer una base de datos de genotipos de *M. bovis* en nuestra región, lo que esperamos, a la pronta identificación de focos de diseminación y las cadenas de transmisión entre regiones, para establecer estrategias de control y, eventualmente, la erradicación de la tuberculosis bovina.

## VII. LITERATURA CITADA

Abalos, P. y Retamal, P. 2004. Tuberculosis: a re-emerging zoonosis? Rev. Sci. Tech. 23: 583-594.

Acosta-Salinas, R., Estrada-Chávez, C., Milián-Suazo, F. 2009. Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Revisión Genotyping methods for *Mycobacterium bovis*. Review Tec Pecu Méx. 47(4):389-412.

Aldwell, F.E., Wedlock, D.N., Slobbe, L.J., Griffin, J.F.T., Buddle, B.M., Buchan, G.S. 2001. In vitro control of *Mycobacterium bovis* infection. Revista Técnico Científica de la Oficina Internacional de Epizootias. 20:304324.

Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. Journal of Clinical Microbiology. 44, 1951–1962.

Amadio A., M. Romano., F. Bigli., I. Etchechoury., T. Kubica ., S. Niemann., A. Cataldi., K and K. Caimi. 2005. Identification and characterization of genomic variations between *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* H37Rv. J Clin Microbiol. (435):2481-2484.

Anti-Tuberculosis Drug Resistance in the World. Report No.3. OMS/HTM/TB/2004.343.

Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A., Domínguez, L. 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. J. Clin. Microbiol. 42: 2602-2608.

Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galán, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez, L. 1999. *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.* 49: 1263-1273.

Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Cousins, D. 1998. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative analysis of fingerprinting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 61: 311-324.

Assam, J.P.A., Penlap, V.B., Cho-Ngwa, F., Toukam, M., Nghoh, A.A.I., Kitavi, M., Nzuki, I., Nyonka, J.N., Tata, E., Tedom, J.C., Skilton, R.A., Pelle, R. and Titanji, V.P.K. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of tuberculosis in the southern ecological zones of Cameroon, as shown by genetic analysis. *BMC Infectious Diseases.* 13:431.

Baena, A., Porcelli, S.A. 2009. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. *Tissue Antigens* 74: 189-204.

Barnes, P. F. & Cave, M. D. 2003, "Molecular epidemiology of tuberculosis", *N.Engl.J.Med.*, vol. 349, no. 12, pp. 1149-1156.

Barry, C., Lee, R., Mdluli, K., Sampson, A., Schroeder, B., Slayden, R., Yuan, Y. 1998. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid. Res.* 37,143-179.

Bengis, R.G., Kriek, N.P., Keet, D.F., Raath, J.P., de Vos, V., Huchzermeyer, H.F. 1996. An outbreak of bovine tuberculosis in a free-living African buffalo (*Syncerus caffer--sparrman*) population in the Kruger National Park: a preliminary report. *Onderstepoort J Vet Res.* 63(1):15-8.

*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2005. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Staley, and G.M. Garrity (eds.), springer, New York.

Biet, F., Boschioli, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. 2005. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium aviumintracellulare* complex MAC. Vet Res. 363:411-436.

Böddinghaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blöcker, H., Böttger, E.C. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J. Clin. Microbiol. 28: 1751-1759.

Boniotti, M.B., Goria, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zanoni, M., Zoppi, S., Dondo, A., Tagliabue, S., Bonora, S., Zanardi, G., Pacciarini, M.L., 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. Journal of Clinical Microbiology. 47, 636–644.

Brennan, P. and Kikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. Annu. Rev. Biochem. 64, 29-63.

Briones, V., de Juan, L., Sánchez, C., Vela, A.I., Galca, M., Montero, N., Goyache, J., Aranaz, A., Domínguez, L. 2000. Bovine tuberculosis and the endangered Iberian lynx. Emerg. Infect. Dis. 6: 189-191.

Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutiérrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., Cole, S.T. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 99: 3684-3689.

Bryson, D.B., Hanna, J., Neill, S.D., Pollock, J.M. 1994. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40; 41-52.

Buddle, B.M., Aldwell, F.F., Pfeffer, A., de lisle G.W., Corner, L.A. 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection of cattle- effect of dose of

*Mycobacterium bovis* and pregnancy on immune responses and distributions of lesions. N.Z. Vet. J. 42:167-172.

Cobos-Marín, L., Montes-Vargas, J., Zumarraga, M., Cataldi, A., Romano, M.I., Estrada-Garcia, I., Gonzalez-y-Merchand, J.A. 2005. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern México. *Canadian Journal of Microbiology*. 51(11): 996-1000.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.

Ciammaruconi, A., Grassi, S., De Santis, R., Faggioni, G., Pittiglio, V., D'Amelio, R., Carattoli, A., Cassone, A., Vergnaud, G., Lista, F. 2008. Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-*loci* Multi Locus VNTR Analysis. *BMC Microbiology*. 8:2.

Clancey, J.K. 1977. The incidence of tuberculosis in Lechwe (marsh antelope). *Tubercle*. 58:151-156.

Cleaveland, S., Shaw, D.J., Mfinanga, S.G., Shirima, G., Kazwala, R.R., Eblate, E., Sharp, M. 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis*. 87:30–43.

Collins, D.M. 2001. Virulence factors of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis*. (Edinb.) 81: 97-102.

Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H.F., de Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 59-70.

Costello, E., Egan, J.W., Quigley, F.C., O'Reilly, P.F. 1997. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet. Rec.* 141, 222-224.

Crick, D., Mahapatra, S., Brennan, P. 2001. Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of *Mycobacterium tuberculosis*. *Glycobiol.* 11, 107-118.

Daffé, M. and Draper, P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol.* 39:131-203.

Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 443-449.

de Garine-Wichatitsky, M., Caron, A., Gomo, C., Foggin, C., Dutlow, K., Pfukenyi, D., Lane, E., Le Bel, S., Hofmeyr, M., Hlokwé, T. and Michel, A. 2010. Bovine Tuberculosis in Buffaloes, Southern Africa. *Emerging Infectious Diseases.* 16:884-885.

de Kantor, I.N., Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol.* 112:4:111-118.

Dorrnsoro, I., Torroba, L. 2007. Microbiología de la tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* 30 (Sup. 2): 67-84.

Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Cunha, M.V. and Botelho, A. 2010. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium*



*bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*. 143; 299–306.

Ereqat, S., Nasereddin, A., Azmi, K., Abdeen, Z., Greenblatt, C.L., Spigelman, M., Rastogi, N., Bar-Gal, G.K. 2012. Genetic Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* in the West Bank, Palestinian Territories. *BMC Research Notes*. 5:270.

Falkinham, J.O. 2003. Mycobacterial aerosols and respiratory disease. *Emerg. Infect. Dis.* 9(7): 763-767.

Francis, J., Seiler, R.J., Wilkie, I.W., O'Boyle, D., Lumsden, M.J., Frost, A.J. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculins. *Vet. Rec.* 103, 420-425.

Fritsche, A., Engel, R., Buhl, D., Zellweger, J.P. 2004. *Mycobacterium bovis tuberculosis*: from animal to man and back. *Int J Tuberc Lung Dis.* 8(7):903-4.

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

Furphy, C., Costello, E., Murphy, D., Corner, L.A.L. and Gormley, E. 2012. DNA Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates from Badgers (*Meles meles*) Culled from Areas in Ireland with Different Levels of Tuberculosis Prevalence. *Veterinary Medicine International*. 12: 1-6.

García-Jiménez, L., Salguero, F.J., Fernández-Llario, P., Martínez, R., Risco, D., Gough, J., Ortiz-Peláez, A., Hermoso-de-Mendoza, J., Gómez, L. 2013. Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 156: 54– 63.

Gibson, A.L., Hewinson, G., Goodchild, T., Watt, B., Story, A., Inwald, J., Drobniewski, F.A. 2004. Molecular epidemiology of disease due to

*Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. J Clin Microbiol. (42):431-434.

Gillespie, J.H., Timoney, J.M. 1983. Enfermedades infecciosas de los animales domesticos. Ed. Prensa Médica Mexicana S.A. 4<sup>ta</sup> Edición México D.F. Pp. 228-240.

Goodchild, A.V., Clifton-Hadley, R.S. 2001. Cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis*. Tuberculosis (Edinb.) 81: 23-41.

Good, M. y Duignan, A. 2011. Perspectives on the History of Bovine and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. Vet. Med. Int. 410-470.

Gorocica, P., Jiménez-Martínez, M.C., Garfias, Y., Sada, I. y Lascurain R. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 18: 142-153.

Groenen, P.M., Bunschoten, A.E., van Soolingen, D., van Embden, J.D. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol. Microbiol. 10: 1057-1065.

Gutiérrez MC, Brisse S, Brosch R. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 1(1): e5.

Hawkey, P., Smith, E., Evans, J., Monk, P., Bryan, G., Mohamed, H., Bardhan, M., Pugh, N. 2003. Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Compared to IS6110-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Investigation of Apparently Clustered Cases of Tuberculosis. J Clin Microbiol. 41:3514-3520.

Harris, N.B., Payeur, J., Bravo, D., Osorio, R., Stuber, T., Farrell, D., Paulson, D., Treviso, S., Mikolon, A., Rodriguez-Lainz, A., Cernek-Hoskins, S., Rast, R.,

Ginsberg, M., Kinde, H.. 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from Soft Fresh Cheese Originating in Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*. 73-3:1025–1028.

Hermans, P.W., van Soolingen, D., Bik, E.M., de Haas, P.E., Dale, J.W., van Embden, J.D. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 59: 2695-2705.

Hermoso de Mendoza S.M. 1992. Tuberculosis bovina, tratado de veterinaria. Madrid, España. 47: 35-42.

Herzog, B.H. 1998. History of tuberculosis. *Respiration*. 65: 5-15.

Hilty, M., Käser, M., Zinsstag, J., Stinear, T., Pluschke, G. 2007. Analysis of the *Mycobacterium ulcerans* genome sequence reveals new *loci* for variable number tandem repeats (VNTR) typing. *Microbiology*. 153:1483-7.

Himsworth, C.G., Elkin, B.T., Nishi, J.S., Neimanis, A.S., Wobeser, G.A., Turcotte, C., Leighton, F.A. 2010. An outbreak of bovine tuberculosis in an intensively managed conservation herd of wild bison in the Northwest Territories. *Can Vet J.* 51:593–597.

Hlokwe, T.M., van Helden, P. and Michel, A. 2012. Evaluation of the Discriminatory Power of Variable Number of Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium bovis* Isolates from Southern Africa. *Transboundary and Emerging Diseases*. 60: 111–120.

Johnson, L., Dean, G., Rhodes, S., Hewinson, G., Vordermeier, M., Wangoo, A. 2007. Low-dose *Mycobacterium bovis* infection in cattle results in pathology indistinguishable from that of high-dose infection. *Tuberculosis (Edinb.)* 87: 71-76.

Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J. Clin. Microbiol. 35: 907-914.

Kaneene, B.J., Miller, R.A., de Kantor, I.N., Thoen, C.O. 2010. Tuberculosis in wild animals. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 14 (12), 1508-1512.

Karlson, A.G., Lessel, E.F. 1970. *Mycobacterium bovis* nom.nov. Int J. Syst. Bacteriol. 20: 273-282.

Kaufmann, S.H. y Schaible, U.E. 2005. 100<sup>th</sup> anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. Trends Microbiol. 13: 469-75.

Koch, R. 1882. Die aetiologie der tuberculose. Berliner klinische Wochenschrift 19: 221-230.

Koch, R. 1891. Weitere Mittheilungen über das Tuberkulin. Dt. Med. Wochenschr. 17: 1189-92.

Koeck, J.L., Njanpop-Lafourcade, B.M., Cade, S., Varon, E., Sangare, L., Valjevac, S., Vergnaud, G., Pourcel, C. 2005. Evaluation and selection of tandem repeat *loci* for *Streptococcus pneumoniae* MLVA strain typing. BMC Microbiology. (5):66.

Koller-Jones, M.A. 2010. National Bovine Tuberculosis (TB) Eradication Program. Canadian Food Inspection Agency, pp. 1-16.

Kremer, K., van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakrus, M.A., Musser, J.M., van Embden, J.D. 1999. 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. 37: 2607-2618.

Kwara, A., Schiro, R., Cowan, L., Hyslop, N., Wiser, M., Harrison, S., Kissinger, P., Diem, L., Crawford, J. 2003. Evaluation of the epidemiologic utility of secondary typing methods for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 41:2683-2685.

Lake, R., Hudson, A, Cressey, P. 2002. Risk profile: *Mycobacterium bovis* in milk. Christchurch: Institute of Environmental, Science and Research Ltd.

Lamine-Khemiri, H., Martínez, R., García-Jiménez, W.L., Benítez-Medina J.M., Cortés, M., Hurtado, I., Abassi, M.S., Khazri, I., Benzarti, M., Hermoso-de-Mendoza, J. 2014. Genotypic characterization by spoligotyping and VNTR typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* isolates from cattle of Tunisia. Trop Anim Health Prod. 46:305–311.

Lari, N., Rindi, L., Bonanni, D., Tortoli, E., Garzelli, C. 2006. Molecular analysis of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* recovered from humans in Italy. J Clin Microbiol. (4411):4218-4221.

Lari, N., Bimbi, N., Rindi, L., Tortoli, E., Garzelli, C. 2011. Genetic diversity of human isolates of *Mycobacterium bovis* assessed by spoligotyping and Variable Number Tandem Repeat genotyping. Infection, Genetics and Evolution. 11: 175–180.

Lévy-Frébault, V.V. and Portaels, F. 1992. Proposed Minimal Standards for the Genus *Mycobacterium* and for Description of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. INT.J. SYST. BACTERIAL. 42:315-323.

Littin, K.E., Mellor, D.J. 2005. Strategic animal welfare issues: ethical and animal welfare issues arising from the killing of wildlife for disease control and environmental reasons. Rev. Sci. Tech. 24 767-782.

López, L., Diaz, F., Vallecillo, A., Esquivel, H., Gutiérrez, J. 2006. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48(2), 173-178.

Malama, S., Bjordal, T.J., Bwalya, J.M., Munyeme, M., Mbulo, G., Muwonge, A., Djønne, B. and Godfroid, J. 2014. Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. *Veterinary Medicine International*. 14: 1-7.

Martínez, L.R., Harris, B., Black IV, W.C., Meyer, R.M., Brennan, P.J., Vissa, V.D., Jones, R.L. 2008. Genotyping North American animal *Mycobacterium bovis* isolates using multilocus variable number tandem repeat analysis. *J Vet Diagn Invest*. 20:707–715.

Martínez, V.C., Hori, O.S., De la Mora, V.A., Bermúdez, R.M., Rentería, E.T.B., López, V.G., Medina, B.G.E. 2010. Genotyping by VNTR of *Mycobacterium bovis* isolates of cattle sacrificed in slaughters from Mexicali and Tijuana, Baja California, México. *Memorias VI Simposio fronteras del conocimiento en Tuberculosis y otras Micobacteriosis*.

Martínez-Vidal, C., Hori-Oshima, S., De la Mora-Valle, A., Bermúdez-Hurtado, R.M., Rentería-Evangelista, T.M., López-Valencia, G., Galván-Lara, L.J., Medina-Basulto, G.E. 2011. Genotipificación por VNTR de aislados de *Mycobacterium bovis* de ganado sacrificado en Baja California, México. *Rev Mex Cienc Pecu*. 2(4):393-401.

Martín-Hernando, M.P., Hofle, U., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., Vidal, D., Barral, M., Garrido, J.M., de la Fuente, J., Gortázar, C. 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis (Edinb.)* 87: 360-367.

Maslow, J. and Mulligan, M. 1993. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clinical Infectious Disease*. 17, 153-164.

McCallum, H., Hocking, B.A., 2005. Reflecting on ethical and legal issues in wildlife disease. *Bioethics*. 19: 336-347.

McLernon, J., Costello, E., Flynn, O., Madigan, G., Ryan, F. 2010. Evaluation of Mycobacterial Interspersed Repetitive-Unit-Variable- Number Tandem-Repeat Analysis and Spoligotyping for Genotyping of *Mycobacterium bovis* Isolates and a Comparison with Restriction Fragment Length Polymorphism Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(12):4541–4545.

Menzies, F.D., Neill, S.D., 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet. J*. 160: 92-106.

Michel, A.L., Hlokwé, T.M., Coetzee, M.L., Mare, L., Connaway, L., Rutten, V.P., Kremer, K., 2008. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. *Veterinary Microbiology*. 126, 151–159.

Milián-Suazo, F., Harris, B., Arriaga, D.C., Romero, T.C., Stuber, T., Alvarez, O.G., Morales, L.A., Perez, S.M., Payeur, J.B. 2008. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: Usefulness in international trade. *Preventive Veterinary Medicine*. 87:261–271.

Milián, S.F., García, C.L., Romero, T.C., Cantó, A.G.J., Gutiérrez, R.J.A., Gallegos, S.S., Mercado, P.M., Mejía, E.F., Peña, C.A.L., Estrada, C.C., Pizano, M.O. 2012. Diversidad genética y distribución regional de cepas de *Mycobacterium bovis* del ganado en México. *Rev Mex Cienc Pecu*. 3(4):459-471.

Milián, S.F., Harris, B., Arriaga, D., Thomsen, B., Stuber, T., González, S., Álvarez, O., Santillán, F., Morales, L., Estrada, C. 2010. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de

diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 1(4), 403-415.

Moon, H., Sung-II, k., Jong-Wan, K., Ji-Yeon, K., In-Yeong, H., Suk-Chan, J., Sang, H.P., Mi Y.P., Hansang, Y. 2010. A genetic comparison of *Brucella abortus* Isolates from Animals and humans by using the MLVA Assay. J. Microbiol. Biotechnol. (12):1750–1755.

Morris, R.S., Pfeiffer, D.U. 1995. Directions and issues in bovine tuberculosis epidemiology and control in New Zealand. N. Z. Vet. J. 43: 256-265.

Neill, S.D., Bryson, D.G., Pollock J.M. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. Tuberculosis, 81:79-86.

Neill, S.D., Cassidy, J., Hanna, J., Mackie, D.P., Pollock, J.M., Clements, A., Walton, E., Bryson, D.G. 1994a. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. Vet Rec. 135, 134-135.

Neill, S.D., Hanna, J., Mackie, D.P., Bryson, T.G. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tracts of skin test-negative cattle. Vet Rec. 131, 45-47.

Neill, S.D., O'Brien, J.J., Hanna, J. 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. Vet. Microbiol. 28: 103-109.

Neill, S.D., Pollock, J.M., Bryson, D.B., Hanna, J. 1994b. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. Vet. Microbiol. 40: 41-52.

Niederweis, M., Danilchanka, O., Huff, J., Hoffmann, C., Engelhardt, H. 2010. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. Trends Microbiol. 18 (3), 109-16.



Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-95. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). *Diario Oficial de la Federación*. DX 1996. 6: 35.

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

Ospina, S. 2001. La tuberculosis, una perspectiva histórico-epidemiológica. *Infectio*. 5(4): 241-250.

Otal, I., Gómez, A.B., Kremer, K., de Haas, P., García, M.J., Martín, C., van Soolingen, D., 2008. Mapping of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium bovis* isolates in relation to adaptation from the animal to human host. *Vet. Microbiol*. 129: 333-341.

Palmer, M.V. 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 315: 195-215.

Palmer, M.V., Waters, W.R. and Thacker, T.C. 2007. Lesion Development and Immunohistochemical Changes in Granulomas from Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol* 44:863–874.

Palomino, J.C., Cardoso L.S. and Ritacco V. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. *Tuberculosis Textbook*. Com. First edition.

Park, S. H. & Bendelac, A. 2000, "CD1-restricted T-cell responses and microbial infection", *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 788-792.

Parra A., J. Larrasa., A. García., J., M. Alonso and J., H. de-Mendoza. 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: a first approach to risk factor analysis. *Vet Microbiol*. (110): 293-300.

Pérez-Guerrero, L., Milián-Suazo, F., Arriaga-Díaz, C., Romero-Torres, C., Escartín-Chávez, M. 2008. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina

y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública de México*. 50:286-291.

Pérez, J., Calzada, J., León-Vizcaino, L., Cubero, M.J., Velarde, J., Mozos, E. 2001. Tuberculosis in an Iberian lynx (*Lynx pardina*). *Vet. Rec.* 148: 414-415.

Pollock, M. and Neill, D. 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J.* (2):115-27.

Pourcel C., Hormigos, K., Onteniente, L., Sakwinska, O., Deurenberg, R.H., Vergnaud, G. 2009. Improved Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Assay for *Staphylococcus aureus* Genotyping, Providing a Highly Informative Technique Together with Strong Phylogenetic Value. *Journal of Clinical Microbiology*. pp. 3121–312.

Prat, A.C., Domínguez, J., Ausina, A.C. 2003. *Mycobacterium bovis*. Control Calidad SEIMC. Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona.

Price-Carter, M., Rooker, S., Collins, D.M. 2011. Comparison of 45 variable number tandem repeat (VNTR) and two direct repeat (DR) assays to restriction endonuclease analysis for typing isolates of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology*. 150: 107–114.

Ramírez-Villaescusa, A.M., Medley, G.F., Mason, S., Green, L.E. 2010. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the south west of England. *Prev. Vet. Med.* 95(3-4):224-30.

Randunz, B. 2006. Surveillance and risk management during the latter stages of eradication: experiences from Australia. *Vet Microbiol.* 112:283-290.

Rastogi, N., Legrand, E., Sola, C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech.* 20: 21-54.

Rebhon, C. W., Guard, C., Richards, M. C. 1999. Enfermedades del Ganado Vacuno Lechero. Ed. Acribia Zaragoza España. P. 113-116.

Reviriego Gordejo, F.J., Vermeersch, J.P. 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Vet. Microbiol.* 112: 101-109.

Rodríguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Domínguez, L., García-de-Viedma, D. and Aranaz, A. 2013. Splitting of a Prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype by Variable-Number Tandem-Repeat Typing Reveals High Heterogeneity in an Evolving Clonal Group. *Journal of Clinical Microbiology.* 51 (11): 3658–3665.

Rodríguez, E.L., Rodríguez, C.D., Díaz, M.L. y González, L.C. 2000. Tuberculosis en poblaciones prehispánicas de “El Morro de Tulcán” y “El Tambo– Alto del Rey” en el departamento del Cauca, Colombia. *Infectio. II encuentro nacional de investigaciones en enfermedades infecciosas. Resumen A-1.* 4:17

Rodwell, T.C., Kapasi, A.J., Moore, M., Milián-Suazo, F., Harris, B., Guerrero, L.P., Moser, K., Strathdee, S.A., Garfein, R.S. 2010. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping. *International Journal of Infectious Diseases.* 14S:e129–e135.

Romero, B., Aranaz, A., de Juan, L., Alvarez, J., Bezos, J., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Domínguez, L. 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same profile as isolates from animals. *J Clin Microbiol.* (449): 3405-3408.

Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Sánchez, C., Galka, M., Fernández, P., Mateos, A., Domínguez, L. 2008. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from

cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation. *Vet. Microbiol.* 132: 87-95.

Romero, M.B. 2012. Tuberculosis bovina: epidemiología molecular y su implantación en sanidad animal y salud pública. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España.

Roring, S., Scott, A.N., Glyn Hewinson, R., Neill, S.D., Skuce, R.A., 2004. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) *loci* in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Veterinary Microbiology.* 101, 65–73.

Sahraoui, N., Müller, B., Guetarni, D., Boulahbal, F., Yala, D., Ouzrout, R., Berg, S., Smith, N.H., Zinsstag, J. 2009. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* strains isolated from cattle slaughtered at two abattoirs in Algeria. *BMC Veterinary Research.* 5:4.

Sarrel M. A history of tuberculosis. (Artículo en Internet) <http://www.state.nj.us/health/cd/tbhistory.htm> (Fecha de consulta: 18 mayo 2014).

Sledzik, P.S. and Bellantoni, N. 1994. Brief communication: bioarcheological and biocultural evidence for the New England vampire folk belief.. *Am J Phys Anthropol.* 94(2):269-74.

Small, P.M. 1999. Tuberculosis in the 21<sup>st</sup> century: DOTS and SPOTS. *Int J Tuberc Lung Dis.* 3: 949-955.

Smith, T. 1898. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. *J.Exp.Med.* 3:451-511.

Smith, N.H., Gordon, S.V., de la Rúa-Romenech, R., Clifton-Hadley, R.S., Hewinson, R.G., 2006. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 670–681.

Sotomayor, H., Burgos, J., Arango, M. 2004. Demostración de tuberculosis en una momia prehispánica Colombiana por la ripo tipificación de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomédica.* 24(Supl.) 18-26

Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittam, T.S., Musser, J.M. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94: 9869-9874.

Sun, A., Lee, A., Ta Ng, S., Ravindran, S., Kremer, K., Bellamy, R., Wong, S., Van Soolingen, D., Supply, P., Paton, N. 2004. Characterization of ancestral *Mycobacterium tuberculosis* by multiple genetics markers and proposal of genotyping strategy. *J Clin Microbiol.* 42:5058-5064.

Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., Locht, C. 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Mol. Microbiol.* 26: 991-1003.

Supply, P., Mazars, E., Lesjean, S., Vincent, V., Gicquel, B., Locht, C. 2000. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol. Microbiol.* 36: 762-771.

Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M.J., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T. 1993. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 341: 647-650.

Thoen, O.C., LoBue, P.A., Enarson, D., Kaneene, J.B., de Kantor, I.N. 2009. Tuberculosis: a reemerging disease in animals and humans. *Vet Ital.* 45, 135-181.

Timoney, J.M., Gillespie, J.H., Scott, F.W., Barlough, F.J. 1988. El género *Mycobacterium*. Publisher: Hagan y Brumer de Microbiología y Enfermedades infecciosas de los animals domesticos. 8<sup>va</sup> ed. Comstock Publishing Associates, ITAC. P270.

United States Department of Agriculture. 2009. A New Approach for Managing Bovine Tuberculosis: Veterinary Services' Proposed Action Plan. pp. 1-12.

Vadillo, S., Píriz, S., Mateos, E.. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria. McGraw – Hill. Interamericana de España. Madrid, España.

van Cuyck, H., Farbos-Granger, A., Leroy, P., Yith, V., Guillard, B., Sarthou, J.L., Koeck, J.L., Kruey, S.L. 2011. MLVA polymorphism of *Salmonella entericasubspecies* isolated from humans, animals, and food in Cambodia. BMC Research Notes. (4):306.

van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J., Schouls, L.M., van Embden, J.D. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J. Syst. Bacteriol. 47: 1236-1245.

van Soolingen, D., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Groenen, P.M., van Embden, J.D. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 31: 1987-1995.

van Soolingen, D., van der Zanden, A.G., de Haas, P.E., Noordhoek, G.T., Kiers, A., Foudraine, N.A., Portaels, F., Kolk, A.H., Kremer, K., van Embden, J.D. 1998. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. J. Clin. Microbiol. 36:1840-1845.

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

Whipple, D.L., Bolin, C.A., Miller, J.M. 1996. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. J Vet Diagn Invest. 8, 351-354.

Wilesmith, J.W. and Williams, D.R. 1987. Observations on the incidence of herds with non-visible lesion tuberculin test reactors in south-west England, Epidemiol Infect. 99,173-178.

Wilson, G., Broughan, J., Chambers, M., Clifton-Hadley, R., Crawshaw, T., de la Fuente, J., Delahay, R.J., Gavier-Widen, D., Gortázar, C., Hewinson, G., Jackson, V., Martín-Hernando, M.P., Paz, M., Aleksija, N., Salguero, F.J., Vicente, J., Alastair, W., McDonald, R. 2009. Scientific review on Tuberculosis in wildlife in the EU. 1-117.

Wobeser, G. 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. Can. Vet. J. 50:1169-1176.

Wolfe, L., Mahaffey, S., Kruh, N., Dobos, K. 2010. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. J Proteome Res. 9(11), 5816-26.

World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2008. Geneva, Switzerland, ISBN 92 4 156264 1.

Zhang, L., Budiawan, T., Matsuoka, M. 2005. Diversity of Potential Short Tandem Repeats in *Mycobacterium leprae* and Application for Molecular Typing. Journal of Clinical Microbiology. 5221–5229.

Zhang, F., Wei, L., Xiao-Ming, W., Zhong-Tao, X., Qiu-Min, Z., Hong, Y., Wu-Chun Cao, C. 2008. Detection of *Francisella tularensis* in ticks and

identification of their genotypes using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. BMC Microbiology. (8):152.



## VIII. APÉNDICE

**Apéndice 1.** Secuencia de los iniciadores utilizados para la identificación de los VNTR.

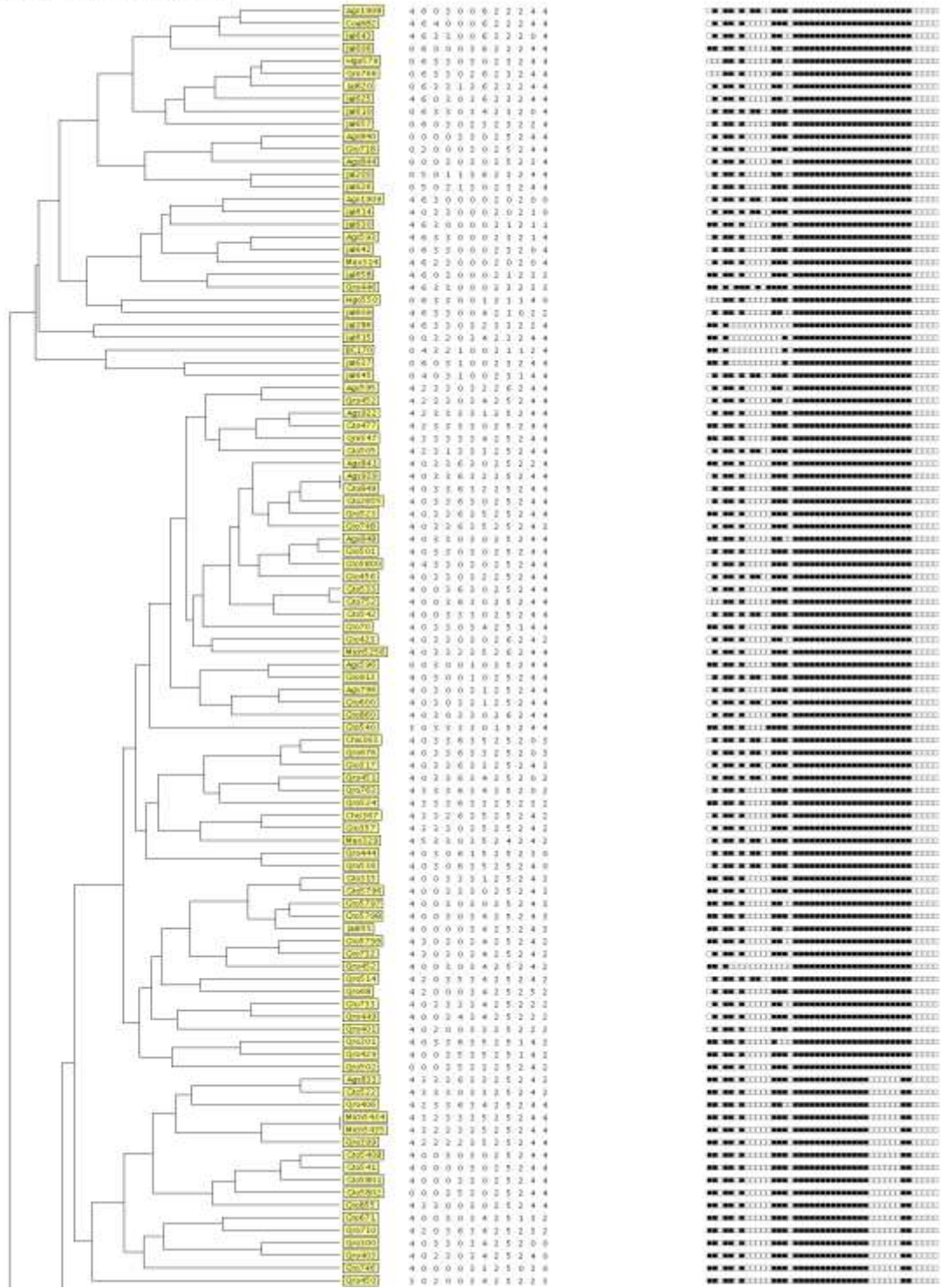
VNTR locus	VNTR	Sentido (5' – 3')	Antisentido (5' – 3')
0424	Mtub04	CTTGCCCGGCATCAAGCGCATTATT	GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC
0577	ETR-C	GTGAGTCGCTGCAGAACCTGCAG	GGCGTCTTGACCTCCACGAGTG
1644	MIRU 16	TCGGTGATCGGGTCCACTCCAAGTA	CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC
1955	Mtub 21	AGATCCCAGTTGTGTCGTCGTC	CAACATCGCCTGGTTCTGTA
2165	ETR-A	AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT	CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT
2401	Mtub 30	ACTTGAACCCCCACGCCATTA	AGCCCCGGTCTCATCTGTCACA
2461	ETR-B	GCGAACACCAGGACAGCATCATG	GGCATGCCGGTGATCGAGTGG
2686	MIRU24	CGACCAAGATGTGCAGGAATACAT	GGGCGAGTTGAGCTCACAGAA
2995	MIRU 26	TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC	CATAGGCGACCAGGCCGAATAG
3192	ETR-E	CTTCGGCGTCGAAGAGAGCCTC	CGGAACGCTGGTCAACCACCTAAG
4052	QUB 26	AACGCTCAGCTGTCGGAT	GGCCAGGTCTTCCCGAT
2163b	QUB 11b	CGTAAGGGGATGCGGGAAATAGG	CGAAGTGAATGGTGGCAT

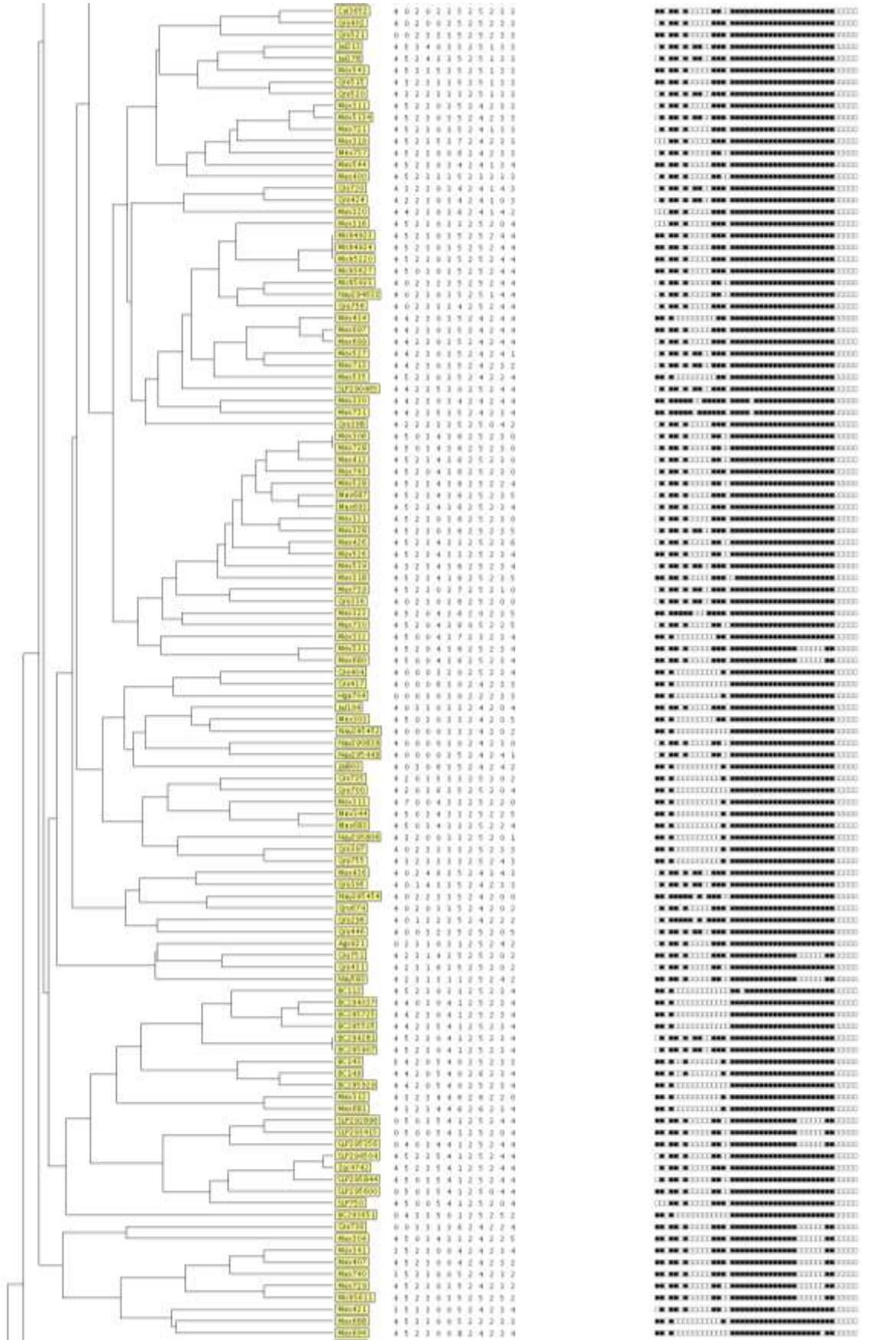
**Apéndice 2.** Volumen y concentración de los reactivos para la mezcla de PCR.

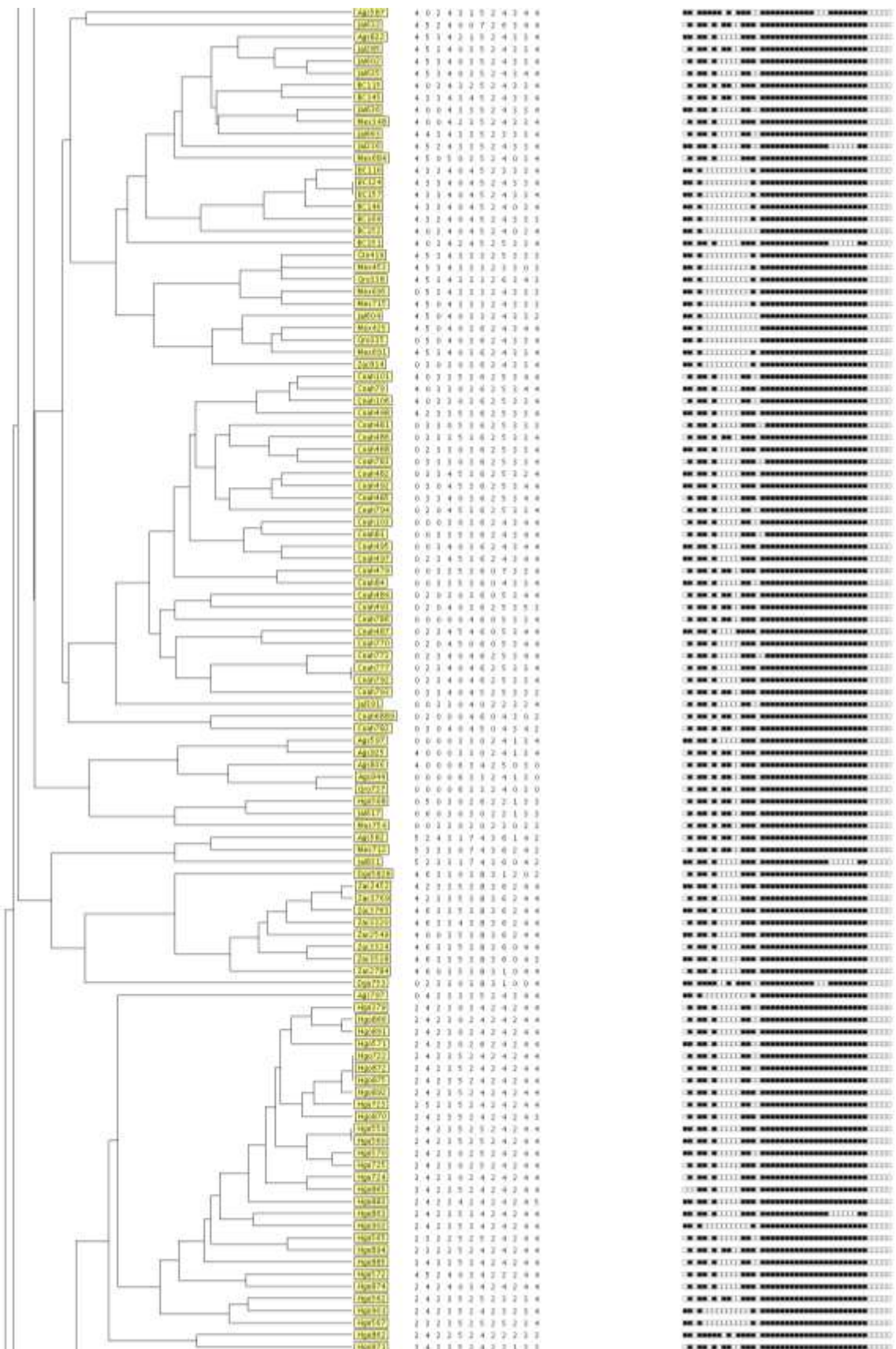
Reactivos	µl x reacción	Concentración
AmpliTaq Gold	0.25	1.25 U
dNTP's	1	4 mM
Iniciador sentido	1	1 µM
Iniciador antisentido	1	1 µM
Buffer	1	1 x
MgCl <sub>2</sub>	1	2.5 mM
ADN	2	--
H <sub>2</sub> O	1.75	--
DMSO	1	--
Total	10.0	--

**Apéndice 3. Número de copias por peso molecular.**

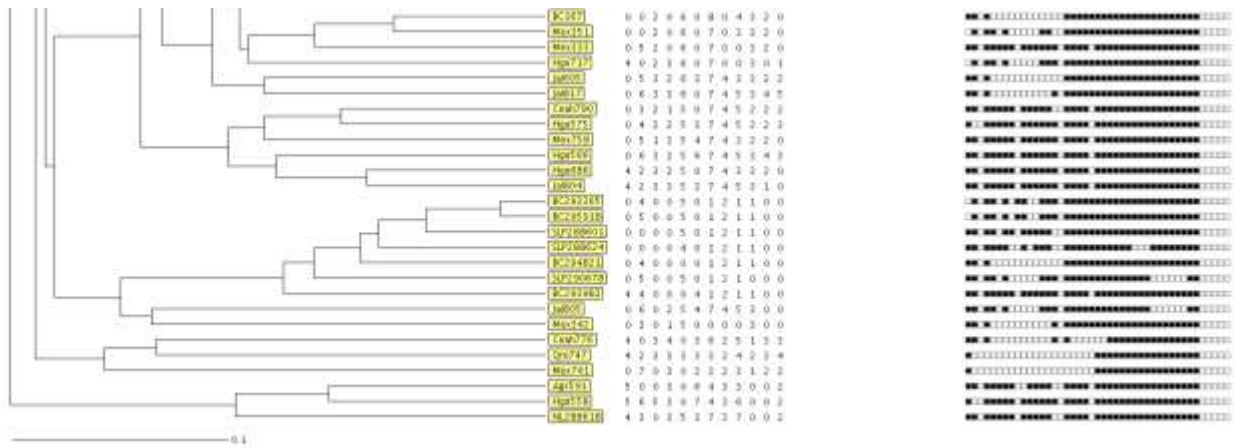
<b>No. Copias</b>	<b>0424</b>	<b>0577</b>	<b>1644</b>	<b>1955</b>	<b>2165</b>	<b>2401</b>	<b>2461</b>	<b>2686</b>	<b>2995</b>	<b>3192</b>	<b>4052</b>	<b>2163b</b>
<b>1</b>	528	94	609	145	267	351	167	430	331	166	258	132
<b>2</b>	571	148	661	200	342	402	222	480	380	219	367	200
<b>3</b>	624	203	713	255	417	461	274	532	428	272	477	269
<b>4</b>	673	257	763	311	492	519	326	586	477	325	586	338
<b>5</b>	720	312	816	363	567	574	381	640	525	378	695	406
<b>6</b>	764	364	869	418	643	632	434	694	573	431	806	474
<b>7</b>		415			720	690	486		624	484	917	
<b>8</b>					795		541		675		1028	
<b>9</b>					870				726		1139	
<b>10</b>					945							
<b>11</b>					1020							
<b>12</b>					1095							











**Apéndice 4.** Dendrograma de los patrones en conjunto por VNTR's y espoligotipo integrado por los 467 aislados de México. (software MIRU-VNTR PLUS).