

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DIAGNÓSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE  
PCR EN CORTES DE TEJIDO INCLUIDOS EN PARAFINA**

**POR**

**OTHÓN PARRA MERAZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAH.**

**MAYO DE 2004**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**DIAGNÓSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE PCR EN  
CORTES DE TEJIDO INCLUIDOS EN PARAFINA**

**POR**

**OTHÓN PARRA MERAZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**ASESOR PRINCIPAL:**

**DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
"ANTONIO NARRO"  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

**DIAGNÓSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE  
PCR EN CORTES DE TEJIDO INCLUIDOS EN PARAFINA**

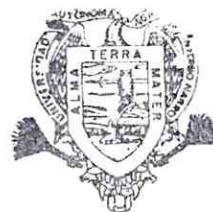
**TESIS  
PRESENTADA POR:**

**OTHÓN PARRA MERAZ**

**REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**APROBADA POR:**



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UL

**MVZ ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN  
REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

# DIAGNÓSTICO DE *MYCOBACTERIUM BOVIS* MEDIANTE PCR EN CORTES DE TEJIDO INCLUIDOS EN PARAFINA

TESIS  
PRESENTADA POR:

**OTHÓN PARRA MERAZ**

TESIS QUE SE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO  
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO  
DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**



---

**DR. MARCO A. HERNÁNDEZ VERA**  
PRESIDENTE DEL JURADO



---

**MVZ MANUEL HERNÁNDEZ VALENZUELA**  
VOCAL



---

**MC. PEDRO ESTRADA ADAME**  
VOCAL

---

**IZ. JOSE BORUNDA RAMOS**  
VOCAL SUPLENTE

**TESIS ELABORADA POR LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE  
ASESORES COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
GRADO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**COMITÉ ASESOR:**



---

**DR. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA  
ASESOR PRINCIPAL**



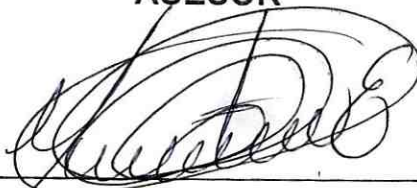
---

**DR. JORGE CASTRO GARZA  
ASESOR**



---

**MVZ NELIDA JIMÉNEZ GONZALEZ  
ASESOR**



---

**MVZ NÉDITH NEVAREZ RODRÍGUEZ  
ASESOR**

## DEDICATORIAS

A MIS PADRES: OTHÓN PARRA MARTÍNEZ Y M<sup>a</sup> ELENA MERAZ  
POR TODO SU AMOR, SACRIFICIO, CONFIANZA Y APOYO DURANTE  
TODA MI VIDA.

A MIS HERMANOS: VERÓNICA, SONIA ARACELI Y FRANCISCO  
POR CREER EN MI Y COMPARTIR LA VIDA JUNTOS.

A MI NOVIA: YURIDIA LIZETH RIVERA MINOR POR TODO SU  
AMOR, COMPRENSIÓN Y APOYO EN LOS MOMENTOS DIFÍCILES.

A MI GRAN AMIGO Y HERMANO: JUAN JESÚS ANDRADE  
CAMACHO POR COMPARTIR CONMIGO UN SIN FIN DE ALEGRÍAS E  
IDEALES.

## AGRADECIMIENTOS

A MIS TÍAS: RITA Y ELVIA PARRA MARTÍNEZ POR APOYARME DURANTE MI ESTANCIA EN ESTA CIUDAD.

A MIS PADRINOS: JOSÉ LUIS PARRA MTZ. Y ROSA MARIA ROMERO POR MOTIVARME A SEGUIR ADELANTE.

A MI PRIMA: LAURA RITA MUÑOZ PARRA POR SU AYUDA INCONDICIONAL.

A TODA MI FAMILIA LA CUAL CREE EN MI Y ME HA ALENTADO A SUPERARME.

A TODOS MIS AMIGOS CON LOS CUALES PASE MOMENTOS INOLVIDABLES QUE HICIERON MAS AGRADABLE EL TRANCURSO DE MI CARRERA.

A MI ASESOR: DR MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA POR TODO EL APOYO Y LA CONFIANZA BRINDADA.

AL PERSONAL DEL CENTRO DE ANÁLISIS E INVESTIGACIONES PECUARIAS DE LA LAGUNA (CAIPEL) POR SU AYUDA EN ESTE PROYECTO.

AL DR. JORGE CASTRO GARZA Y AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL NOROESTE (CIBIN) DEL IMSS POR SU COLABORACIÓN EN EL PROYECTO.

AL CONSEJO ESTATAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COECYT) POR EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

# Diagnóstico de *Mycobacterium bovis* mediante PCR en Cortes de Tejido Incluidos en Parafina

## ÍNDICE

Dedicatorias .....	I
Agradecimientos.....	II
Índice.....	III
Índice de cuadros.....	VI
Resumen.....	VIII
Introducción.....	1
- Definición .....	1
- Importancia.....	1
- Etiología.....	2
- Transmisión.....	3
- Epidemiología.....	3
- Patogenia.....	4
- Síntomas y lesiones.....	6
- Diagnostico.....	7
- Tratamiento y control.....	8
Justificación.....	10
Objetivo.....	12
Hipótesis.....	13



---

Capítulo I .- Antecedentes.....	14
1.1.-Métodos diagnósticos de Tuberculosis bovina.....	14
1.2.- Comparaciones Geonómicas entre Micobacterias.....	16
1.3- Proteínas de estrés.....	18
1.3.1.- Proteína 65 kd hsp.....	18
1.4.- Elementos de inserción de las Micobacterias.....	19
1.4.1.- Secuencia de Inserción <i>IS6110</i> .....	20
1.5 .- Gene <i>oxyR</i> de <i>Micobacterium bovis</i> .....	22
Capítulo II.- Material y Métodos.....	25
2.1.- Toma de muestras.....	25
2.2.- Preparación y acondicionamiento de la muestra.....	25
2.3.- Extracción de ADN a partir de tejidos fijados en formalina, incluidos en parafina.....	27
2.3.1.- Desparafinación de los tejidos.....	27
2.3.2.- Digestión de micobacterias.....	28
2.4.- Localización de iniciadores .....	28
2.4.1.- Localización de iniciadores de <i>IS6110</i> .....	29
2.4.1.1.- Localización de iniciadores internos en <i>IS6110</i> , .....	29
2.4.2.- Localización de iniciadores de <i>oxyR</i> .....	30
2.4.3.- Localización de iniciadores de 65 kd <i>hsp</i> .....	31

---

2.5.- Condiciones de amplificación.....	32
2.5.1.- Condiciones de amplificación de la secuencia IS6110.....	32
2.5.1.1- Condiciones de amplificación de la secuencia interna IS6110.....	33
2.5.2.- Condiciones de amplificación de la secuencia <i>oxyR</i> .....	34
2.5.3.- Condiciones de amplificación de la secuencia 65 kd <i>hsp</i> .....	34
2.6.- Visualización de la amplificación de PCR.....	35
2.7.- PCR de <i>Mycobacterium smegmetis</i> .....	35
Capitulo III.- Resultados y Discusión.....	36
3.1.- Toma y acondicionamiento de la muestra.....	36
3.2.- Amplificaciones por PCR de las secuencias de ADN de <i>M. bovis</i> .....	37
3.3.- Amplificones.....	38
Capitulo IV.- Conclusiones.....	41
Capitulo V.- Recomendaciones.....	42
Capitulo VI.- Revisión de literatura.....	43
Capitulo VII.- Anexos.....	47

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Tabla 1.1 .- Secuencias de inserción y ADN repetitivo en miembros del complejo <i>M. tuberculosis</i> .....	17
Figura 1.1. Múltiples ensayos de PCR usando iniciadores específicos de el <i>IS6110</i> y de 65 kd hsp .....	19
Figura 1.2 Electroforesis en gel de agarosa de la secuencia <i>IS6110</i> amplificada por PCR desde cultivos de <i>M. bovis</i> .....	22
FIG. 1.3. PCR alelo específico de <i>oxyR</i> .....	24
Cuadro 2.1.- Secuencia del elemento de inserción <i>IS6110</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	29
Cuadro 2.2.-Localización de los iniciadores internos para <i>IS6110</i> .....	30
Cuadro 2.3.- Secuencia del gene <i>oxyR</i> de <i>Mycobacterium bovis</i> .....	31
Cuadro 2.4.- Secuencia 65 kd hsp de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	32
Tabla 3.1.- Datos de las muestras recolectadas.....	36
Tabla.3.2.- Amplificaciones por PCR de las secuencias de ADN de <i>M. bovis</i> para <i>IS6110</i> , <i>oxyR</i> y 65 kd <i>hsp</i> .....	37

Figura 3.1 Electroforesis en gel de agarosa de la secuencia  
 IS6110 amplificada por PCR de *M. bovis*.....38

Figura 3.2 Electroforesis en gel de agarosa de la secuencia  
 IS6110 amplificada por PCR anidado de *M. bovis*.....39

Tabla 3.3 . – Origen de las muestras positivas a PCR anidado.....40

## RESUMEN

*Micobacterium bovis* es un microorganismo de lento crecimiento y la confirmación del diagnóstico por medio del cultivo convencional es un proceso lento y poco sensible, requiriéndose de cuatro a seis semanas para lograr un diagnóstico apropiado. Los procedimientos moleculares han permitido acortar este período, obteniéndose resultados entre las 36 a 72 horas. Un método rápido para la extracción de ADN a partir de tejidos de bovinos incluidos en parafina mediante la técnica de PCR utilizando el elemento de inserción *IS6110*, y el gene *oxyR* es utilizado para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Los tejidos incluidos en parafina de 20 bovinos, de los cuales 10 positivos y 10 negativos al diagnóstico histopatológico de TB son usados para hacerle una PCR, utilizando iniciadores que amplifiquen un fragmento de 315-pb del elemento de inserción *IS6110*, una secuencia de 439-pb del gene que codifica la proteína de 65 kd hsp y una secuencia de 548-pb del gen *oxyR*. El PCR no detecto ninguna ampliación y por eso se diseñaron unos localizadores internos para el elemento de inserción *IS6110*, el cual amplifica una región de 155 pb. El PCR anidado detectó que el 40 % de las muestras analizadas amplifican al elemento de inserción *IS6110*.

## INTRODUCCIÓN

### **Definición**

La Tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad granulomatosa crónica causada por *Micobacterium bovis* (Vordermeier *et al.*, 1999), esta es una enfermedad lenta y progresiva en la que los signos no son aparentes hasta la etapa avanzada de la enfermedad (Costello *et al.*, 1999), la cual se caracteriza por apetito errático, fiebre irregular de bajo grado y a veces por signos localizados como por ejemplo, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, tos y diarrea (Biberstein, 1990).

### **Importancia**

La TB ha sido considerada una barrera para el comercio por poseer problemas significantes en la economía de muchos países (Skuce *et al.*, 2002), además representa un problema importante porque tiene fuertes implicaciones en la producción y salud debido a las fuertes pérdidas relacionadas a disminuciones en peso, producción de leche, y fertilidad en los animales de los hatos infectados. Los costos económicos adicionales incluyen aumentado del porcentaje de reemplazos por muerte prematura en vacas, pruebas de diagnóstico y medidas de control (Coetsier *et al.*, 2000).

## Etiología

Los bacilos tuberculosos tienen forma bacilar con una anchura aproximada de 0.5  $\mu\text{m}$  de longitud. No producen esporas, carecen de flagelos, cápsula y son aeróbicas por oxidación. Si bien, citoquímicamente las bacterias son grampositivas, no se suelen teñir con tinción de Gram; su propiedad tintorial más notable es su acidoresistencia (Biberstein, 1990) debido a la pared celular gruesa rica en ácidos micólicos y otros lípidos complejos que la hacen hidrofóbica e impermeable a las tinciones acuosas sin calor; su concentración elevada de lípidos (de un 20 a 40 %), se cree que es el origen de la resistencia a los mecanismos de defensa humoral y a los desinfectantes ácidos y álcalis; los desinfectantes más eficaces para destruirla son los fenólicos. (Carter *et al.*, 1985),

Los bacilos tuberculosos resisten a la exposición durante 30 minutos a las soluciones de 1N de NaOH o HCL, circunstancia que se usa para eliminar los gérmenes contaminantes de las muestras usadas para su diagnóstico. Las micobacterias son resistentes a varios agentes antimicrobianos y colorantes bacteriostáticos (Biberstein, 1990).

Los bacilos tuberculosos conservan su viabilidad en cadáveres putrefactos y en suelos húmedos hasta por periodos de 1 a 4 años, pueden sobrevivir por lo menos 150 días en heces de bovino deshidratadas; la temperatura de congelación no parece tener efecto alguno (Carter *et al.*, 1985) son destruidos por la luz solar, por las radiaciones ultravioleta y la desecación (Biberstein, 1990).

## Transmisión

Hay varias rutas por la cual el ganado puede ser infectado por *M. bovis*, pero la excreción y la inhalación respiratoria son consideradas la ruta de transmisión primaria de la tuberculosis bovina (Menzies *et al.*, 2000). Los bacilos tuberculosos son transmitidos a las vías respiratorias y digestiva por los núcleos contaminados de las gotitas transportadas por el aire, por las heces, por la leche procedente de las glándulas mamarias infectadas, o por los piensos y por el agua de bebida contaminados (Biberstein, 1990; Carter *et al.*, 1985). Las infecciones percutáneas, transplacentarias y durante el coito son raras (Biberstein, 1990; Menzies *et al.*, 2000).

## Epidemiología

*Micobacterium bovis* causa tuberculosis en una amplia variedad de animales domésticos y salvajes (Cousins *et al.*, 1999). Los bovinos son los huéspedes naturales de *Mycobacterium bovis*; los porcinos son grave y fácilmente infectados. Los casos en perros, caballos y borregos son raros; los gatos son susceptibles y pueden perpetuar la enfermedad en bovinos, en el hombre hay infecciones principalmente por el consumo de leche y carne contaminados, los pollos son resistentes y los conejos y los cobayos son muy susceptibles (Carter *et al.*, 1985). En los bovinos los animales jóvenes suelen presentar lesiones mas graves que los adultos. La sensibilidad varia de acuerdo con la raza; los cebús (*Bos indicus*) son mas resistentes que las razas bovinas europeas (*Bos taurus*)(Biberstein, 1990),



esto es debido a factores genéticos sobre susceptibilidad y resistencia tanto natural como adquirida; esta última como consecuencia de exposiciones previas (Carter *et al.*, 1985). La mayor incidencia de la enfermedad en los bovinos de aptitud lechera con respecto a los de aptitud carnica puede ser reflejo de un confinamiento más apretado, un ciclo vital más largo, y de un mayor estrés de producción en las vacas lecheras. La carencia de preñez y lactación puede explicar la menor incidencia de la enfermedad de los toros con respecto a las vacas (Biberstein, 1990). La susceptibilidad a la infección por *M. bovis* puede ser intensificada en el ganado persistentemente infectado con virus inmunosupresivos tales como virus de la diarrea viral bovina (DVB) o virus de la inmunodeficiencia bovina, pero tales consecuencias en la disfunción inmunológica en el ganado bovino nunca ha sido evaluado (Menzies *et al.*, 2000).

## Patogenia

En la patogenia están implicados los componentes lipídicos de la pared celular del bacilo. Parece ser que tanto los micósidos como los fosfolípidos y los sulfolípidos protegen a los bacilos tuberculosos frente a la destrucción por fagocitos. Los demás lípidos son capaces de producir granulomas y junto con las tuberculoproteínas, favorecen las respuestas alérgicas mediadas por células (Biberstein, 1990). Las manifestaciones locales dependen de la ruta de invasión, cuando se produce por inhalación, se afectan pulmones y nódulos linfáticos traqueobronquiales; y cuando la invasión es por ingestión se afecta por lo general los nódulos mesentéricos y la pared intestinal. Los bacilos presentes en

linfonódulos pueden alcanzar el conducto torácico, propiciando la diseminación general (Carter *et al.*, 1985). La enfermedad suele ser progresiva a través de los intersticios y conductos aéreos. Se disemina por vía hematógica y afecta al hígado y los riñones. El útero puede actuar como vestíbulo de la infección del feto. Los terneros que sobreviven a la infección suelen presentar lesiones en el hígado y bazo. La infección de la ubre es rara ( $\pm 2\%$ ), pero tiene claras repercusiones en salud pública (Biberstein, 1990).

Al llegar los bacilos al pulmón son fagocitados por los macrófagos alveolares y, si no son destruidos, entonces destruyen al macrófago y proliferan. Al iniciarse la respuesta de tipo celular, los linfocitos T sensibilizados secretan linfocinas que atraen más macrófagos. Al llegar éstos, se transforman en células epiteloideas, llamadas así por su semejanza con las células epiteliales, estas células contienen múltiples bacilos en su citoplasma. Simultáneamente se fusionan algunos macrófagos, para construir células gigantes. Por tanto, el centro del granuloma inicial queda constituido por células epiteloideas y células gigantes; mientras que en la periferia se organizan linfocitos y células plasmáticas. Con el paso del tiempo se produce necrosis central del tubérculo, así como fibrosis periférica. La necrosis caseosa que se observa es resultado de hipersensibilidad mediada por células (tipo IV), debida en parte a las linfoquinas liberadas por linfocitos T y a las enzimas lisosómicas liberadas por los macrófagos (Trigo, 1998).

## Signos y lesiones

Los signos específicos de tuberculosis son difíciles de detectar en animal vivo. En casos avanzados el pelo se torna áspero y seco, el animal tiene una apariencia general deteriorada; sin embargo, tales signos pueden ser causados por una gran variedad de enfermedades y no pueden tomarse como conclusivos (Neumann, 1997).

Debido a que las vías de infección son la respiratoria y la oral; se afectan los linfonodos cervicales superiores, los mediastínicos y los bronquiales (Trigo, 1998). En aproximadamente 90% de los bovinos tuberculosos, las lesiones principalmente se encuentran en los nódulos linfáticos del sistema respiratorio (Menzies *et al.*, 2000). La inhalación de micobacterias origina la infección pulmonar primaria, la cual puede afectar cualquier lóbulo, pero sobre todo los diafragmáticos en la parte distal (Trigo, 1998; Menzies *et al.*, 2000). En 60% de los casos en bovinos adultos tienen complejos primarios en los pulmones (Menzies *et al.*, 2000). El proceso tuberculoso pulmonar se inicia en la unión bronquioalveolar, y se extiende después a los alvéolos. Las lesiones pulmonares varían de acuerdo a la cronicidad de la infección. Al inicio se aprecian lesiones amarillentas discretas, de calcificación. Con el tiempo, las lesiones caseosas son encapsuladas y acumulan prominentes depósitos de calcio. Las lesiones iniciales pueden coalescer para formar extensas de bronconeumonía caseosa. La infección inicial se difunde en el pulmón por vía linfática. En casos crónicos pueden desarrollarse úlceras en la traquea y bronquios, los cuales se originan como granulomas tuberculosos. Además se puede producir una pleuritis tuberculosa, como extensión de las

lesiones pulmonares, ya sea por vía linfática, hemática o por extensión directa . Las zonas afectadas de la pleura muestran nódulos caseosos multifocales, además de tejido de granulación y abundante calcificación . La imagen histológica típica de la TB es una linfadenitis granulomatosa (Trigo, 1998).

## Diagnóstico

El diagnóstico de infección bovina por *M. bovis* se basa en la norma oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 (Campaña Nacional Contra la Tuberculosis bovina), el cual se lleva a cabo por medio de tuberculinización y análisis bacteriológico e histopatológico. Las pruebas de tuberculinización autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA) son la prueba en el pliegue caudal, prueba cervical comparativa y prueba cervical simple, donde las tuberculinas autorizadas para efectos de Campaña son el derivado proteínico purificado (PPD) bovino, elaborado con *Micobacterium bovis* cepa AN5, que se utiliza en la prueba caudal, cervical comparativa y cervical simple; y el PPD aviar, elaborado con *Micobacterium avium* cepa D4, que se utiliza en la prueba cervical comparativa.

La Prueba Caudal es la prueba básica operativa de rutina, cuando se desconoce la situación zoonosanitaria del hato en materia de tuberculosis. La Prueba Cervical Comparativa es la única prueba autorizada para confirmar o descartar animales reactivos a la prueba de pliegue caudal. Se puede efectuar por única vez dentro de los 10 días siguientes a la lectura de la prueba caudal; o bien después de transcurridos 60 días, se aplica en hatos o regiones con presencia de

*Micobacterium paratuberculosis* y/o *Micobacterium avium*. La Prueba cervical simple se emplea para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis*; o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis*.

En el laboratorio las muestras son sometidas a las pruebas de diagnóstico bacteriológico o histopatológico. Se aprueba el examen directo, mediante la tinción de Ziehl Neelsen o de Nueva Fucsina para microorganismos ácido alcohol resistentes en frotis realizados con el material sospechoso. En el cultivo, el aislamiento e identificación del *Mycobacterium*, se realiza a través de la siembra de material sospechoso en medios especiales como Herrolds con y sin huevo, Middle Brook y Stonebrink, Petraghani, ATS y Lowenstein Jensen. En el diagnóstico histopatológico se debe utilizar la tinción de Hematoxilina-Eosina, esta técnica permite identificar cualquier cambio morfológico de los tejidos, así como la presencia de los granulomas. Además pueden utilizarse las tinciones de Ziehl Neelsen y Nueva Fucsina en cortes o improntas realizados con el material sospechoso.

### **Tratamiento y control**

En el tratamiento de la tuberculosis los agentes de primera línea son la estreptomina, la estreptomina, la isoniazida, el etambutol y la rifampina. Los agentes de segunda línea son la pirazinamida, el ácido paraaminosalicílico, la kanamicina, cicloserina, la capreomicina y la etionamida. Como quiera que la

resistencia suele aparecer en los tratamientos en los que se administra un solo agente, habitualmente se suele utilizar una asociación de dos o mas de ellos . Debido al peligro a la salud publica inherente a la conservación de los animales tuberculosos la quimioterapia antituberculosa de los animales no es aconsejable (Biberstein, 1990).

La tuberculosis bovina se controla mediante la identificación y eliminación de los animales infectados y . en algunos países este procedimiento ha dado como resultado la erradicación casi total de la infección. Con el fin de que aparezca de nuevo la enfermedad se necesita una vigilancia continua (Biberstein, 1990).

## JUSTIFICACIÓN

La Tuberculosis bovina (TB) representa un problema importante en los animales por tener graves implicaciones en la producción y salud animal. Las fuertes pérdidas económicas se relacionan a disminuciones en peso, producción de leche, y fertilidad en animales de hatos infectados (Coetsier *et al.*, 2000). La TB es causada por *Micobacterium bovis*, el cual puede afectar a un amplio rango de especies animales y en los humanos contribuye con el 0.1 al 30.0% de la tuberculosis pulmonar lo que puede causar la muerte (Espinosa *et al.*, 1998). El diagnóstico de TB se basa en la Norma Mexicana: NOM-031-ZOO-1996; en la cual las pruebas oficiales a nivel de campo son: Prueba en el pliegue ano-caudal, la cervical comparativa y la cervical simple así como análisis microbiológicos y análisis histopatológicos; sin embargo, el programa de erradicación y control de la TB el cual es la aplicación de tuberculina y la eliminación de los animales reactivos positivos no ha tenido éxito esperado en el control de la enfermedad. En cuanto a las pruebas histopatológicas es muy difícil detectar bacilos contenidos en una lesión cuando son escasos, raramente pueden ser vistos en el examen microscópico de una muestra, y no siempre pueden ser aislados por cultivo (Espinosa *et al.*, 1998); el cultivo toma de 6 a 8 semanas debido a un crecimiento lento del organismo; posteriormente la identificación de la especie extiende el tiempo en el que se pueda dar un diagnóstico confiable (Coetsier *et al.*, 2000), por

lo que, es necesario implementar una rutina especial para la identificación de *M. bovis*.

Los Métodos Moleculares, donde la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de nódulos linfáticos con lesiones típicas de tuberculosis, mejora la sensibilidad entre el 35 al 39 % con respecto a los análisis histopatológicos. Para el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante PCR, los resultados se obtienen entre 78 y 42 horas, por lo cual este método sería de una utilidad para un mejor diagnóstico (Coetsier *et al.*, 2000).



## OBJETIVO

Detectar *Micobacterium bovis* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tejidos incluidos en parafina utilizando la secuencia del elemento móvil IS6110, y el gen *oxyR* , y así como las secuencias de ADN específicas de *M. bovis* que ayuden a su diferenciación.

## HIPÓTESIS

Utilizando secuencias específicas del genoma de *M. bovis*, así como son, el elemento de inserción IS6110, el gen *oxyR*, y la secuencia de la proteína de 65KD mediante la utilización de PCR, el diagnóstico de *M. bovis* en muestras de tejido incluidas en parafina se obtendrán resultados entre 36 a 72 horas.

## ANTECEDENTES

### 1.1.-Métodos diagnósticos de Tuberculosis bovina

La prueba intradérmica de tuberculina donde se usa el derivado proteínico purificado (PPD) como antígeno, es la prueba oficial usada en la campaña de erradicación para la detección de animales infectados de tuberculosis a nivel de campo. Sin embargo, existen datos que muestran que la sensibilidad de la prueba intradérmica es moderada con un promedio de 72%, aunque la especificidad de la prueba intradérmica es alta (98%); esta tiene otras desventajas, principalmente las reacciones falso-positivo causadas por antígenos de reacción cruzada provocadas por otras micobacterias como *M. avium*, *M. paratuberculosis* o micobacterias atípicas (Liébana *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 2003). Otro problema de la prueba intradérmica reside en que no detecta animales sin hipersensibilidad tardía (HT) hacia *M. bovis*, denominados anérgicos, ya sea con una infección diseminada o con una infección reciente, debido a que en estos casos la inmunidad celular se encuentra deprimida o en proceso de desarrollo (Díaz *et al.*, 2003).

La prueba de gamma interferón (IFN- $\gamma$ ) ha sido desarrollada recientemente para detectar bovinos tuberculosos, esta prueba evalúa la inmunidad celular mediante la detección del IFN- $\gamma$  en respuesta a un antígeno específico, bajo un sistema de cultivo con sangre completa (Díaz *et al.*, 2003). En pruebas de campo la sensibilidad y especificidad de esta prueba muestra ser de 93.6 y 96.2% respectivamente. La principal desventaja de esta prueba son los problemas logísticos de interpretación, el tiempo exacto requerido (las muestras de sangre

necesitan ser incubadas con tuberculina dentro de 8 horas de colección), los problemas con antígenos de reactividad cruzada, y el costo (Liébana et al., 1995). El ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada (ELISA) ha demostrado ser una de las pruebas más específicas para el diagnóstico de TB, utilizando preparados a partir de *M. bovis* y *M. avium*. La principal ventaja del ELISA es que identifica animales infectados no reactivos a la tuberculina e IFN- $\gamma$ . Sin embargo, debido a la baja sensibilidad ( $60\% \pm 10$ ) no identifica a todos los animales, por lo cual no se recomienda su empleo como prueba única para el diagnóstico de la TB (Díaz et al., 2003).

Un diagnóstico presuntivo de infección micobacteriana bovina en animales muertos es hecho en base a la histopatología de nódulos linfáticos o muestras de tejido mostrando lesiones sospechosas a tuberculosis o bacilos ácido alcohol resistentes. El diagnóstico definitivo requiere la identificación de la especie de micobacteria. El cultivo es considerado el "estándar de oro" pero este procedimiento es muy lento y laborioso. Además el cultivo puede llegar a ser positivo solo varias semanas después de la inoculación, especialmente para muestras que contienen poco número de micobacterias (Coetsier et al., 2000). Los métodos clásicos para identificar las especies de micobacterias en los cultivos se basan en el análisis de características fenotípicas tal como morfología de colonia, tasa de crecimiento, y de las propiedades bioquímicas (Gutiérrez et al., 1999). A pesar de continuas mejoras metodológicas, el cultivo es frecuentemente negativo, la optimización de técnicas radiométricas han reducido el tiempo para la detección de la

micobacteria pero no resuelve la emisión crucial de la sensibilidad (Coetsier *et al.*, 2000).

En total, la carencia de una prueba diagnostica rápida, simple, especifica y sensitiva para detectar micobacterias es necesaria para los programas de erradicación y control de la Infección por *M. bovis* (Coetsier *et al.*, 2000).

Existen otros métodos como los Métodos Moleculares, donde la amplificación de marcadores específicos de ADN mediante la utilización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de nódulos linfáticos con lesiones típicas de tuberculosis, mejora la sensibilidad entre el 35 al 39 % con respecto a los análisis histopatológicos. Además en el diagnostico de la tuberculosis bovina mediante PCR, los resultados se obtienen entre 78 y 42 horas, por lo cual este método seria de gran utilidad para un mejor diagnostico de TB en animales (Coetsier *et al.*, 2000).

## **1.2.- Comparaciones Geonómicas entre Micobacterias**

*M. tuberculosis* es causa de la tuberculosis en humanos y raramente en otros animales, mientras que *M. bovis* puede causar tuberculosis en una gran variedad de huéspedes animales, incluyendo al humano (Costello *et al.*, 1999). Estos dos microorganismos pertenecen al complejo *M. tuberculosis* (Sechi *et al.*, 1999; Costello *et al.*, 1999 ), por lo tanto es esencial para investigaciones de casos epidemiológicos identificar animales que pueden ser un riesgo sanitario. En años recientes el ADN de los aislamientos de *M bovis* ha demostrado ser una

herramienta útil en investigaciones epidemiológicas de brotes en venados, coyotes, tejones en Estados Unidos , en venados en Suecia y en bovinos en los países bajos (Costello *et al.*,1999). Existen elementos repetitivos de DNA que han sido utilizados para diferenciar especies del complejo *M. tuberculosis*. Uno de ellos es la secuencia repetida rica en G-C (Polymorphic G+C rich séquense, PGRS), otro son la secuencias repetidas directa (Direct repeats, DR), que son secuencias de DNA que se repiten varias veces y se distribuyen el genoma por transposición, las secuencias repetidas polimorficas mayores (Major polymorphic tandem repeats, MPTR), las unidades repetidas microbacteriales dispersas (Mycobacterial interspersed repetitive unit, MIRU) y la IS1081 (CUADRO 1.1). Su distribución en el genoma puede ser útil determinar el relación epidemiológica de cepas y para trazar las fuentes de la infección. Sin embargo, todos estos marcadores están presentes en todas las Micobacterias y no pueden ser utilizados para diferenciar entre los miembros del complejo (Gutiérrez *et al.*, 1999).

**Cuadro 1.1 .- Secuencias de inserción y ADN repetitivo en miembros del complejo *M. tuberculosis* (Bloom, 1994)**

ELEMENTO	TAMAÑO (BP)	NO COPIAS
IS6110	1355	0-25
IS1081	11324	5-7
DR	36	10-50
MPTR	10	>100
PGRS	30	>100

### 1.3.- Proteínas de estrés

Entre las primeras proteínas identificadas por el uso de anticuerpos monoclonales, esta un grupo de proteínas que muestran ser significativamente homologas a la amplia familia de proteínas conservadas llamadas proteínas de shock o de estrés calórico. Esta familia de proteínas ha sido encontrada en células eucarióticas, regularmente en plantas y en células procarióticas. Esta familia de proteínas de estrés aparentemente sirven para múltiples funciones. Un papel importante es que ayudan al microorganismo en adaptación a cambios de medio ambiente.

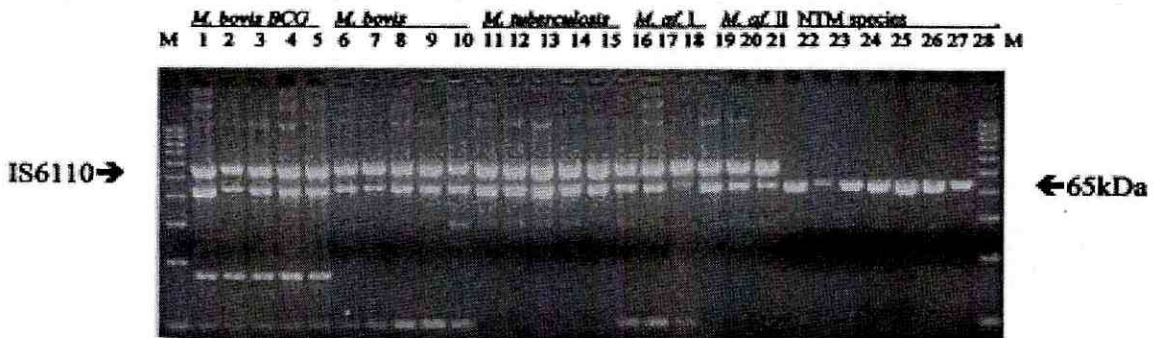
Las proteínas de estrés son sintetizadas en considerables cantidades en las células pero los niveles de transcripción y transposición incrementan marcadamente cuando la célula es expuesta a elevadas temperaturas u otros factores de estrés. Los miembros de la familia actuan como “chaperones moleculares “ por proteínas mediadores plegables y ensambladoras y tal vez membranas de translocación (Bloom, 1994)

#### 1.3.1.- Proteina 65 kd *hsp*

Una proteína de 65 kd de *M tuberculosis* parece ser homologa de GrosEI de *E. coli*. El gene es aislado de *M. tuberculosis* en varios laboratorios y la secuencia de nucleótidos es establecida de *M. tuberculosis*, *BCG* y *M. leprae* (fig. 1.1). La secuencia de aminoácidos de GrosEI análogo de *M. tuberculosis*, *BCG* y *M. leprae* exhiben mas del 95% de homología (Bloom, 1994).

La proteína 65 kd ha sido involucrada en la respuesta inmune al reconocimiento de linfocitos como un antígeno de las células T y B (Kong, *et al* 1993).

**Figura 1.1.** Múltiples ensayos de PCR usando iniciadores específicos de el *IS6110* y de 65 kd hsp de *M. bovis*, BCG, *M tuberculosis*, *M. leprae* y mycobacterias no tuberculosas (Doroth, Y-H; *et al* 2001).



#### 1.4- Elementos de inserción de las Micobacterias

Los elementos genéticos de inserción denominados genéricamente *IS* representan secuencias de ADN dispersas en los genomas bacterianos con actividad de transposición. Gracias a esta actividad, el número de copias de elementos *IS* y su localización en los genomas varía entre distintos organismos de la misma especie. Estas diferencias pueden ser aprovechadas para el diagnóstico y seguimiento



epidemiológico (Cortinas *et al.*, 2002); usándolo como marcador para el estudio genético y filogenético de las poblaciones bacterianas, especialmente para las especies con genomas conservados y cepas bajo el nivel de subespecies (Fang *et al.*, 2001). La movilidad junto a otros procesos como el de mutación genera más variación, diferencias que se traducen en la identificación de distintos linajes. A pesar de su capacidad de movimiento, algunos IS son suficientemente estables como para poder identificar organismos que provienen de un mismo ancestro, permitiendo, de esta manera, inferir la relación entre distintas cepas (Cortinas *et al.*, 2002 ).

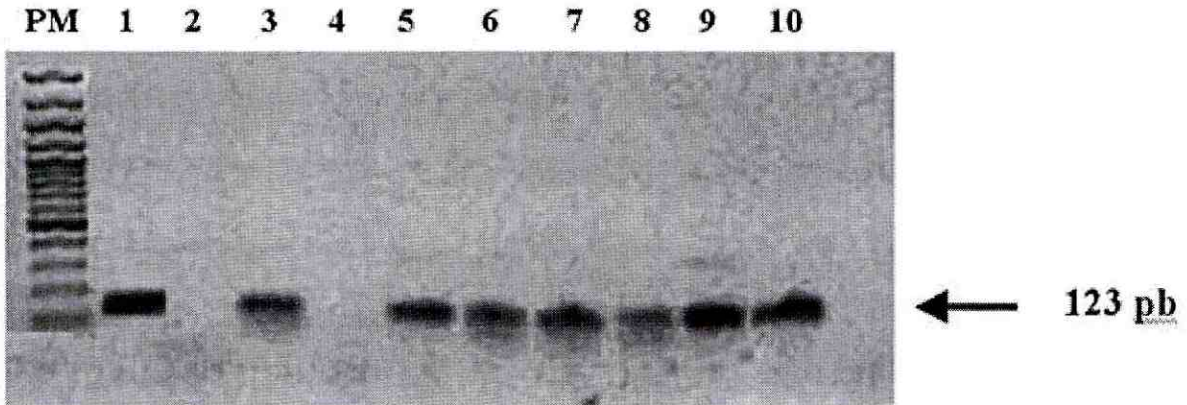
#### **1.4.1.- Secuencia de Inserción IS6110**

Varios locus polimorficos y multicopias de elementos de inserción han sido descubiertas en el cual el locus repetido directo (DR), el mayor tandem polimorfico repetido, es la secuencia IS6110 (Fang *et al.*, 1998). El elemento de inserción IS6110 corresponde a familia del elemento movil IS3 (Vera-Cabrera *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 1998) y es uno de los numerosos elementos genéticos móviles presentes en el género *Mycobacterium*. La secuencia de inserción IS6110 sólo es detectable en las especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*), mantiene la estabilidad necesaria para ser utilizado como herramienta diagnóstica de los miembros de este complejo [fig.1.2] (Cortinas *et al.*, 2002) debido a que las cepas de *M. tuberculosis* transportan múltiples copias del

elemento , aunque una minoria de cepas de una sola copia han sido identificadas. En contraste cepas de *M. bovis* usualmente tiene de una a cinco copias de este elemento (Sechi *et al.*, 1999), y cepas de *M. bovis* BCG tienen una o dos copias (Kent *et al.*, 1995); el IS6110 esta presente en múltiples copias en el genoma y junto con otras características es el primero en usarse como un poderoso marcador genético para la diferenciación de cepas (Fang *et al.*, 2001).

La diferenciación de cepas de *M. bovis* con IS6110 depende de su origen. La mayoría de los aislamientos de bovinos albergan solo una copia de este elemento localizado en un locus cromosomal previamente identificado. Cepas aisladas de *M. bovis* de animales diferentes a bovinos han encontrado que contienen varias copias de IS6110. Esto sugiere que varios reservorios pueden contener diferentes tipos de *M. bovis*. En un estudio reciente, se encontró que un porcentaje significativo (51 %) de aislamientos de *M. bovis* de ganado español que hospedan múltiples copias de IS6110 (Aranaz *et al.*, 1998).

**Figura 1.2** Electroforesis en gel de agarosa de la secuencia IS6110 amplificada por PCR desde cultivos de *M. bovis* (Retamal, *et al* 2003)



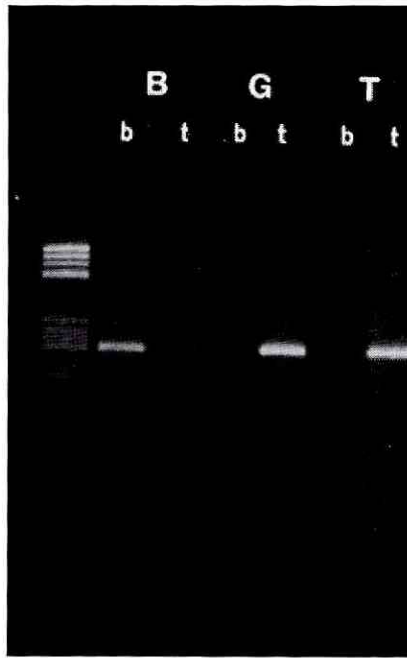
PM, marcador de peso molecular de 100 pb. Línea 1 representa a *M. tuberculosis*. Líneas 2 a 10 representan a los aislados de *M. bovis*.

### 1.5.- Gene *oxyR* de *Micobacterium bovis*

Un nucleótido polimorfo específico de *M. bovis* es el gene *oxyR*. Todas las cepas de *M. bovis* tienen un residuo de adenina en el nucleótido 285, mientras todas las cepas de *M. tuberculosis* tiene guanina en esta posición (Espinosa, *et al.*, 1998). En *Escherichia coli* y *Salmonella tyfymurium*, el gene *oxyR* funciona como un sensor y regulador transcripcional de proteínas envueltas en la respuesta oxidativa. La homología del gene *oxyR* en organismos del complejo *M.*

*tuberculosis* contiene numerosas supresiones y mutaciones. Debido a que *oxyR* en aislamientos de *M. tuberculosis* probablemente no codifica a una proteína funcional, este es llamado como un pseudogene. Considerando que los pseudogenes acumulan mutaciones en un porcentaje mayor comparado con genes funcionales, es posible que *oxyR* pueda contener nucleótidos polimorficos usados para diferenciar entre los miembros relacionados en el complejo de *M. tuberculosis*. En el análisis del nucleótido polimórfico 285 del gene *oxyR* de 360 organismos del complejo *M. tuberculosis* de extensas fuentes geográficas y diferentes especies de huéspedes es 100% sensitiva y especifica para distinguir cepas de *M. bovis* de otros miembros del complejo. Los datos indican que el uso de cualquier análisis de secuencia directa o de una estrategia PCR-RFLP para identificar el polimorfismo en el nucleotido 285 en *oxyR* diferencia fiablemente *M.bovis* de otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*. Pero el análisis de la variación del nucleótido 285 de *oxyR* no diferencia cepas *M. bovis* BCG de cepas de *M. bovis* no BCG (Sreevatsan, *et al*; 1996). Por lo tanto el polimorfismo en *oxyR* es buen candidato para desarrollar un método rápido para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*; por el cambio en las posición 285, con respecto a la secuencia de *M. tuberculosis* [ fig 1.3] (Espinosa, *et al*;1998).

FIG. 1.3. PCR alelo específico de *oxyR*. (Espinosa, *et al*;1998).



Las amplificaciones son realizadas con ADN de *Mycobacterium bovis* de bovino (B), *Mycobacterium bovis* de cabra (G) y cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (T). Líneas: b, reacción específica para secuencias de *oxyR* de *M. bovis*; t, reacción específica para secuencia *oxyR* de *M. tuberculosis*

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1.- Toma de muestras**

Se recolectaron 20 muestras de los rastros municipales de Jerez, Calera, Villanueva, Luis Moya, Miguel Auza y Jalpa de estado de Zacatecas; así como de los municipios de Durango, Canatlán, Gómez Palacio, Villa Hidalgo, Tlahualilo, Lerdo, y Nuevo Ideal de estado de Durango, también de Francisco I Madero y Torreón en Coahuila durante los meses de mayo a agosto del año del 2002, estas muestras fueron remitidas al Centro de Investigaciones Pecuarias de la Laguna (CAIPEL), localizado en las instalaciones de la Unión Ganadera del Norte de Durango. El tipo de tejido son nódulos linfáticos y órganos internos como bazo, hígado y pulmón que son extraídos lo mas asépticamente posible del animal sacrificado. El tejido de donde se tomó la lesión sospechosa a tuberculosis se dividió por la mitad, una mitad se sumergió en una solución de borato de sodio al 6 % para estudios de bacteriología y la otra mitad en una solución de formalina al 10% para estudios de histopatología utilizando los paquetes elaboradas para este fin por la CANATB (Campaña Nacional para la Erradicación de Brucella y Tuberculosis).

### **2.2.- Preparación y acondicionamiento de la muestra**

Las muestras que se utilizaron son las fijadas en formalina al 10%, posteriormente se lavaron en agua corriente, se cortaron a 0.5 cm de grosor y se incluyeron en cápsulas para su procesamiento en histoquinette con una duración de 24 horas (Anexo 1).

Posteriormente se elaboraron bloques de parafina y las muestras fueron cortadas a 4  $\mu$  m de espesor empleando un microtomo, un portacuchillas y cuchillas desechables. Las muestras fueron recogidas con portaobjetos impregnados de albúmina glicerina de Mayer, para teñirlas con la tinción de rutina de Hematoxilina y Eosina (Anexo 2) y tinción de Ziehl-Neelsen (Anexo 3). Al observar al microscopio la interpretación en la tinción de H y E fue la siguiente:

- Núcleo           – Azul con alguna metacromasia
- Citoplasma      -- Varios tonos de rosa.

En la tinción de Ziehl-Neelsen la Interpretación es la siguiente:

- Bacilos alcohol ácido resistentes           - Rojo brillante
- Eritrocitos                                       - Anaranjados
- Otros tejidos                                     - Azul pálido

Criterios para la interpretación de resultados. La lesión característica de la tuberculosis es el granuloma o tubérculo, usualmente entre 1.0 mm a 2.0 cm de diámetro aunque puede variar considerablemente debido a crecimientos adyacentes con coalescencia de una o más lesiones simples. La relación estructural de los tejidos se transforma según la forma y el tamaño de la lesión, ya que puede ser de mayor tamaño o se puede reducir a una pequeña masa de tejido conectivo fibroso.

La emisión de los resultados en caso positivo a la observación microscópica con la tinción H y E y positivo a la tinción de Z-N, es de la siguiente forma:

- Diagnostico morfológico: Linfadenitis granulomatosa
- Tinción Ziehl Neelsen: Positivo a bacilos alcohol ácido resistentes.
- Diagnostico final: Tuberculosis bovina.

La emisión de los resultados en caso positivo a la observación microscópica con la tinción de H y E y negativo a la tinción de Z-N es de la siguiente forma:

- Diagnostico morfológico: Linfadenitis granulomatosa
- Tinción Ziehl Neelsen: Negativo a bacilos alcohol ácido resistentes.
- Diagnostico final: Lesiones sugestivas a tuberculosis bovina.

### **2.3.- Extracción de ADN a partir de tejidos fijados en formalina, incluidos en parafina**

#### 2.3.1.- Desparafinación de los tejidos

Se cortaron aproximadamente 4 secciones de los tejido fijados en formalina incluidos en parafina de 5  $\mu\text{m}$  de espesor cada una, y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml.; para remover la parafina se le adicionó dos veces 1 ml de Xilol (SIGMA) y se dejo incubar por 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugo por 5 minutos 12000 xg, el sobrenadante fue removido cuidadosamente con una pipeta y eliminado. Para eliminar



completamente el Xilol se agrego etanol al 100 % (SIGMA), se agito y centrifugo a 12 000 durante 5 min, y por ultimo se dejo secar la pastilla al aire.

### 2.3.2.- Digestión de micobacterias

Se resuspendieron las muestras en 100 µl de buffer de digestión (Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, EDTA 0.5 mM y Tween 20 al 1% y Proteinasa K 300 µg/ml), se incubaron a 37° C bajo condiciones de oscilación durante 24 horas hasta que el tejido se desintegró. Posteriormente se incubaron las muestras a 95° C por 10 min. para desintegrar la proteinasa K.

Las muestras se almacenaron a -20° C por lo menos 1 hora y fueron centrifugadas a 12 000 x g por 20 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue secada al aire y fue resuspendida en 40 µl de agua destilada.

## **2.4.- Localización de iniciadores**

### 2.4.1.- Localización de iniciadores de IS6110

El elemento de inserción IS6110 que se encuentra presente en las micobacterias (Cortinas *et al.*, 2002) es seleccionado para el diagnostico de *Mycobacterium bovis* mediante PCR en cortes de tejido incluidos en parafina en el que los iniciadores utilizados son los siguientes: IS41' CCT-GCG-AGC-GTA-GGC-GTC-GG (sentido); y el IS43' TCA-GCC-GCG-TCC-ACG-CCG-CCA (antisentido), los cuales amplifican una región entre los nucleótidos 568 y 883 de la secuencia.

**Cuadro 2.1.-** Secuencia del elemento de inserción IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* (Thierry,D.,*et al*,1993)

1	cgatgaaccg	ccccggcatg	tccggagact	ccagttcttg	gaaaggatgg	ggtcatgtca
61	ggtggttcat	cgaggaggta	cccgcgggag	ctgcgtgagc	ggcggtgcg	gatggtcgca
121	gagatccgcg	gtcagcacga	ttcggagtgg	gcagc gatca	gtgaggtcgc	ccgtctactt
181	ggtgttggct	gcgcgagac	ggtgcgtaag	tgggtgcgcc	aggcgcaggt	cgatgccggc
241	gcacggcccg	ggaccacgac	cgaagaatcc	gctgagctga	agcgccttagc	ggcgggacaa
301	cgccgaattg	cgaagggcga	acgcgatttt	aaagaccgcg	tccgctttct	tccgcccga
361	gctcgaccgg	ccagcacgct	aattaacggt	tcatcgccga	tcatcagggc	caccgcgagg
421	gccccgatgg	tttgcggtgg	ggtgctgagt	cgatctgcac	acagctgacc	gagctgggtg
481	tgccgatcgc	cccatcgacc	tactacgacc	acatcaaccg	ggagcccagc	cgccgcgagc
541	tgcgcatg	cgaactcaag	gagcacatca	<u>gccgcgtcca</u>	<u>cgccgccaac</u>	tacggtgttt
601	acggtgcccg	caaagtgtgg	ctaaccctga	accgtgaggg	catcgagggtg	gccagatgca
661	ccgtcgaacg	gctgatgacc	aaactcggcc	tgtccgggac	caccgcgggc	aaagcccgca
721	ggaccacgat	cgctgatccg	gccacagccc	gtcccgcgca	tctcgtccag	cgccgcttcg
781	gaccaccagc	acctaaccgg	ctgtgggtag	cagacctcac	ctatgtgtcg	acctgggcag
841	ggttcgccta	cgtggccttt	<u>gtcaccgacg</u>	<u>cctacgtcgc</u>	<u>aggatcctgg</u>	<u>gctggcgggt</u>
901	cgcttccacg	atggccacct	ccatggctct	cgacgcgatc	gagcaagcca	tctggaccgg
961	ccaacaagaa	ggcgactcgc	acctgaaaga	cgttatccac	catacggata	ggggatctca
1021	gtacacatcg	atccggttca	gcgagcggct	cgccgaggca	ggcatccaac	cgtcggtcgg
1081	agcggtcgga	agctcctatg	acaatgcact	agccgagacg	atcaacggcc	tatacaagac
1141	cgagctgatc	aaaccggca	agccctggcg	gtccatcgag	gatgtcgagt	tggccaccgc
1201	gcgctgggtc	gactggttca	accatcgcgc	cctctaccag	tactgcggcg	acgtcccgcc
1261	ggtcgaactc	gaggctgcct	actacgctca	acgccagaga	ccagcccgcg	gctgaggtct
1321	cagatcagag	agtctccgga	ctcaccgggg	cggttcacga		

\* Las secuencias subrayadas corresponden a los iniciadores utilizados y su localización

#### 2.4.1.1.- Localización de iniciadores internos de IS6110

Con la amplificación de los iniciadores IS41 y IS43, la cual es una secuencia de 276 pb se diseñaron los iniciadores internos IS1' AAC-GGC-TGA-TGA-CCA-AAC-TC (sentido) y el IS2' GGT-GAG-GTC-TGC-TAC-CCA-CA (antisentido), que se encuentran localizados entre los nucleótidos 79 y 233.

**Tabla 2.2.\*\* Localización de los iniciadores internos para IS6110**

1	actacggtggttacggtgccccgcaaagtgtggctaaccctgaaccgtgagggcatcgagg
61	tggccagatgcaccgtcgaacggctgatgaccaaactcggcctgtccgggaccacccgcg
121	gcaaagcccgcaggaccacgatcgctgatccggccacagcccgtcccgcgatctcgctcc
181	agcgccgcttcggaccaccagcacctaaccggctgtgggtagcagacctcacctatgtgt
241	cgacctgggcagggttcgctacgtggcctttgtca

\* Las secuencias subrayadas corresponden a los iniciadores utilizados y su localización

\*\* [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)

#### 2.4.2.- Localización de iniciadores de oxyR

El análisis del nucleótido polimórfico 285 del gene *oxyR* es 100% sensitiva y especifica para distinguir cepas de *M. bovis* de otros miembros del complejo, debido a que cepas de *M. bovis* tienen un residuo de adenina en el nucleótido 285, mientras todas las cepas de *M. tuberculosis* tiene guanina en esta posición (Espinosa, *et al.*, 1998), debido a este se seleccionaron los iniciadores *oxyR*-1 GGTGATATATCACACCATA (sentido) y *oxyR*-2 CTATGCGGATCAGGCGTACTTG (antisentido) que amplifican un fragmento de 548 bp.

**Cuadro 2.3.-** Secuencia del gene *oxyR* de *Mycobacterium bovis* (Cole, et al, 2001)

1	atgagtgata	agagttatca	gcccaccatc	gctgggcttc	gcgcccttgt	cgcagtgggt
61	gagaagggtc	acttcagcgc	cgcggaagc	tttctcggcg	tgaggcagtc	gacgttgctg
121	caggcgttag	cggcgctgga	gtccggactt	ggtgtgcagc	tgatcgaacg	ttctaccgga
181	cggttttctg	tgacgacgca	gggtaggcac	ctactaccac	gcgcccaggc	tgcgatcgag
241	gcgatggacg	cgttcaccgc	agcagctgcc	ggcgaatcgg	atcc <u>act</u> gcg	aggtggcatg
301	cgctttggac	tgattcccac	cgtggcgccg	tatgtgctgc	cgacgatggt	gactggactc
361	accatcggc	tgccgacggt	aaccttgcca	gtggtcgagg	accagacaga	gcacctgctg
421	accgcgttgc	gtgagggggc	attagatgct	gcaatgatcg	ccttaccggt	tgaaactgcc
481	gggattgccg	agataccaat	ctatgatgag	gattttgtcc	tcgcgctacc	cccagggcat
541	ccgctttccg	gcaagcgccg	ggtgccgaca	acggcactgg	cgcaattgcc	gctgttggtg
601	ttggatgagg	gtcattgctt	gcgagaccag	accctcgata	tctgccggaa	atcgggagtg
661	caggccgagc	tggttaaacac	ccgcgcagcg	tcgttggcga	ccgctgtgca	atgcgtgacc
721	ggcgggttgg	gggtgacgct	gctcccgcag	agtgctgcgc	ctgtcgagtc	ggtgcgtage
781	aaacttggac	ttgcccagtt	cgetgcccc	tgccccggga	gacggattgg	tctggcttcc
841	cgctccgcta	gcggtcgcag	tgettctat	cggcagattg	ccaagatcat	tggtgagttg
901	attagtagac	agcatcatgt	gcggctggtc	gcatag		

\* Las secuencias subrayadas corresponden a los iniciadores utilizados y su localización.

#### 2.4.3.- Localización de iniciadores de 65kD HSP

La secuencia del gene que codifica la proteína 65 kD es un buen marcador para diferenciar *Micobacterias* , y se utilizaron los iniciadores TB11-ACCAACGATGGTGTGTCCAT y TB12 -CTTGTCGAACCGCATAACCCT, los cuales amplifican una región entre los nucleótidos 286 y 726.

**Cuadro 2.4.-** Secuencia 65 kd *hsp* de *Mycobacterium tuberculosis* (Garnier et al, 2003)

1	gtgccaggtc	gggacgggtga	gaccagcca	gcaagctgtg	gtcgtccgtc	gccccactg
61	caccggcca	gcgtaagtaa	tgggggtgt	cggcaccg	tgaccctagc	ttcattccta
121	atccggagga	atcacttcgc	aatggccaag	acaattgctg	acgacgaaga	ggcccgtcgc
181	ggcctcgagc	ggggctttaa	cagcctcgcc	gacgcggtaa	aggtgacgtt	gggtccgaag
241	ggcgcgaacg	tcgttctaga	gaagaagtgg	ggtgctcca	cgatcaccaa	<u>cgatggtgtg</u>
301	<u>tccatcgcca</u>	aggagatcga	gctggaggac	ccgtacgaga	agattggcgc	tgagttggtc
361	aaggaagtgc	ccaagaagac	agatgacgtc	gccggtgatg	gcaccacgac	ggccaccgtg
421	ctggcccagg	cattggtcaa	agagggccta	cgcaacgtcg	cggccggcgc	caaccgccta
481	ggtctcaagc	gtggcatcga	gaaagctgtc	gataaggtaa	ctgagactct	gctcaaggac
541	gctaaggagg	tcgaaaccaa	ggaacaaatt	gctgccactg	cagcgatttc	ggcgggtgac
601	cagtcgatcg	gtgatctgat	cgccgaggcg	atggacaagg	ttggcaacga	gggtgttatc
661	accgtcgagg	aatccaacac	cttcggtctg	cagctcgagc	tcaccgaggg	<u>tatgcggttc</u>
721	<u>gacaagggtc</u>	acatttcggg	ctacttcgtc	accgacccg	agcgtcagga	agctgtccta
781	gaggagccct	acatccttct	ggtcagctcc	aaagtgtcta	ccgtcaagga	cctgctgccg
841	ctgctagaga	aggtcatcca	ggccggcaag	tcgctgctga	tcattgctga	ggatgtcgag
901	ggtgaggcgt	tgtctaccct	ggtcgtcaac	aagatccgtg	gcactttcaa	gtcgggtggcg
961	gtcaaagctc	ctggctttgg	tgaccgcgc	aaggcaatgt	tgcaagacat	ggccattctc
1021	accggagccc	aggtcatcag	cgaggaggtc	ggtctcacat	tggagaacac	cgatctgtca
1081	ttgctgggca	aggcccgcaa	ggtggttatg	accaaggacg	aaaccacat	cgtcgagggt
1141	gccggtgaca	ccgacgceat	cgccgggcca	gtggctcaga	tccgtaccga	gatcgagaac
1201	agtgactctg	actatgaccg	cgagaaactg	caggaacgcc	tggctaagtt	ggccgggtgt
1261	ggtgagggtg	tcaaggccgg	tgctgccact	gaggtggagc	tcaaggagcg	caagcaccgc
1321	atcgaggacg	cagtcgcaa	cgccaaggcc	gcggtggagg	aggggatcgt	cgccggcggc
1381	ggtgtgactc	tgctacaggc	tgctccggct	ctggacaagc	tgaagctgac	cggtgacgag
1441	gcgaccggtg	ccaatattgt	caaggtggcg	ttggaagctc	cgctcaagca	gatcgcttct
1501	aattccggga	tggagcccgg	cgtggtggcc	gaaaagggtg	gtaaccttct	agtgggtcac
1561	ggcctgaacg	ccgccaccgg	tgagtacgag	gacctgctca	aggccggcgt	tgccgaccgg
1621	gtgaaggtta	cacgttctgc	gctgcagaac	gcagcgtcca	tcgcccggct	gttccttact
1681	acggaggccg	tcgtcgccga	caagccggag	aagacggcag	ctccggcgag	cgacccgacc
1741	ggtggcatgg	gtggtatgga	cttctga			

\* Las secuencias subrayadas corresponden a los iniciadores utilizados y su localización

## 2.5.- Condiciones de amplificación

### 2.5.1. - Condiciones de amplificación de la secuencia IS6110

Las reacción de amplificación contienen 1.0 µl de la digestión del tejido que previamente se describió (párrafo 2.3.2) y 24 µl de solución que consiste en lo siguiente: 4.0 µl de oligonucleotidos (dNTPs 1.25 mM c/u), 0.6 µl de cada

iniciador (IS41' y IS43') 0.2 µl de DNA polimerasa, 1.25 µl de Mg<sub>2</sub>Cl 20x, 2.5 µl amortiguador PCR 10 x y 14.85 µl de agua para hacer un volumen de reacción de 25 µl.

Los parámetros de amplificación fueron los siguientes:

Desnaturalización inicial 96°C por 6 min, seguidos por 35 ciclos que incluyen desnaturalización a 94°C por 30 seg., templado a 60°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 30 seg. y un ciclo de extensión final de 72° C por 10 min.

#### 2.5.1.1. - Condiciones de amplificación de la secuencia IS6110 (PCR anidado)

Las reacción de amplificación contienen 1.0 µl de la reacción de PCR del parrafo 2.5.1 y 24 µl de solución que consiste en lo siguiente: 4.0 µl de deoxynucleoside triphosphate (dNTPs 1.25 mM c/u), 0.6 µl de cada iniciador (IS1 y IS2) 0.2 µl de DNA polimerasa, 1.25 µl de Mg<sub>2</sub>Cl 20x, 2.5 µl amortiguador PCR 10 x y 14.85 µl de agua para hacer un volumen de reacción de 25 µl.

Los parámetros de amplificación fueron los siguientes:

Desnaturalización inicial 96°C por 6 min, seguidos por 35 ciclos que incluyen desnaturalización a 94°C por 30 seg., templado a 60°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 30 seg. y un ciclo de extensión final de 72° C por 10 min.

#### 2.5.3. - Condiciones de amplificación de la secuencia de oxyR

Las reacción de amplificación contienen 5.0 µl de la digestión del tejido que previamente se describió (párrafo 2.3.2) y 20 µl de solución que consiste en lo

siguiente: 4.0  $\mu$ l de deoxynucleoside triphosphate (dNTPs 1.25 mM c/u), 0.6  $\mu$ l de cada iniciador (oxyR-1 y oxyR-2) 0.2  $\mu$ l de DNA polimerasa, 2.5  $\mu$ l de Mg<sub>2</sub>Cl 20x, 2.5  $\mu$ l amortiguador PCR 10 x y 10.85  $\mu$ l de agua para hacer un volumen de reacción de 25  $\mu$ l.

Los parámetros de amplificación fueron los siguientes:

Desnaturalización inicial 96°C por 6 min, seguidos por 35 ciclos que incluyen desnaturalización a 96°C por 30 seg., templado a 61°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 30 seg. y un ciclo de extensión final de 72° C por 10 min.

### 2.5.3. - Condiciones de amplificación de la secuencia de 65 kd *hsp*

Las reacción de amplificación contienen 5.0  $\mu$ l de la digestión del tejido que previamente se describió (párrafo 2.3.2) y 20  $\mu$ l de solución que consiste en lo siguiente: 4.0  $\mu$ l de deoxynucleoside triphosphate (dNTPs 1.25 mM c/u), 0.6  $\mu$ l de cada iniciador (TB11 y TB12) 0.2  $\mu$ l de DNA polimerasa, 2.5  $\mu$ l de Mg<sub>2</sub>Cl 20x, 2.5  $\mu$ l amortiguador PCR 10 x y 10.85  $\mu$ l de agua para hacer un volumen de reacción de 25  $\mu$ l.

Los parámetros de ciclado fueron los siguientes:

Desnaturalización inicial 96°C por 6 min, seguidos por 35 ciclos que incluyen desnaturalización a 96°C por 30 seg., templado a 61°C por 30 seg. y extensión a 72°C por 30 seg. y un ciclo de extensión final de 72° C por 10 min.

En cada corrida de PCR se incluyó un control negativo (el mismo PCR pero sin ADN) para asegurar que no hubiera errores en las reacciones

## 2.6.- Visualización de los amplificados de PCR

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel agarosa a 1% en solución amortiguadora TAE 5x conteniendo .25  $\mu$ l de bromuro de etidio para este análisis se utilizaron 5  $\mu$ l de las soluciones de cada amplificado.

El corrimiento de las muestras se realizó a 80 vltts por 30 minutos.

Los geles se observaron bajo iluminación ultravioleta en un transiluminador y se fotografiaron con una cámara digital Samsung.

## 2.7.- PCR de *Mycobacterium smegmetis*

Este PCR se realizó para comprobar que el ADN de las micobacterias de los tejidos fijados en formalina incluidos en parafina no le afectara el procedimiento de desparafinación y digestión de tejidos para así poder comprobar que estuviera en buenas condiciones para lograr una amplificación.

Se hicieron 6 diluciones con aislamientos de *Mycobacterium smegmetis* en Tween salino para lograr concentraciones de  $1 \times 10^7$  micobacterias por mililitro hasta  $1 \times 10^2$  bacterias por ml. Posteriormente se le hizo el mismo procedimiento descrito en los párrafos 2.3 y 2.5.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 .- Toma y acondicionamiento de muestras

Se recolectaron 20 muestras de tejido fijado en formalina incluido en parafina, de los cuales en base al diagnóstico histopatológico basado en las tinciones de H-E y Z-N se seleccionaron 10 muestras positivas y 10 negativas a tuberculosis bovina (Tabla 3.1). Estas muestras se desparafinaron con xilol y digirieron con proteinasa K para hacer las PCR con el sobre nadante.

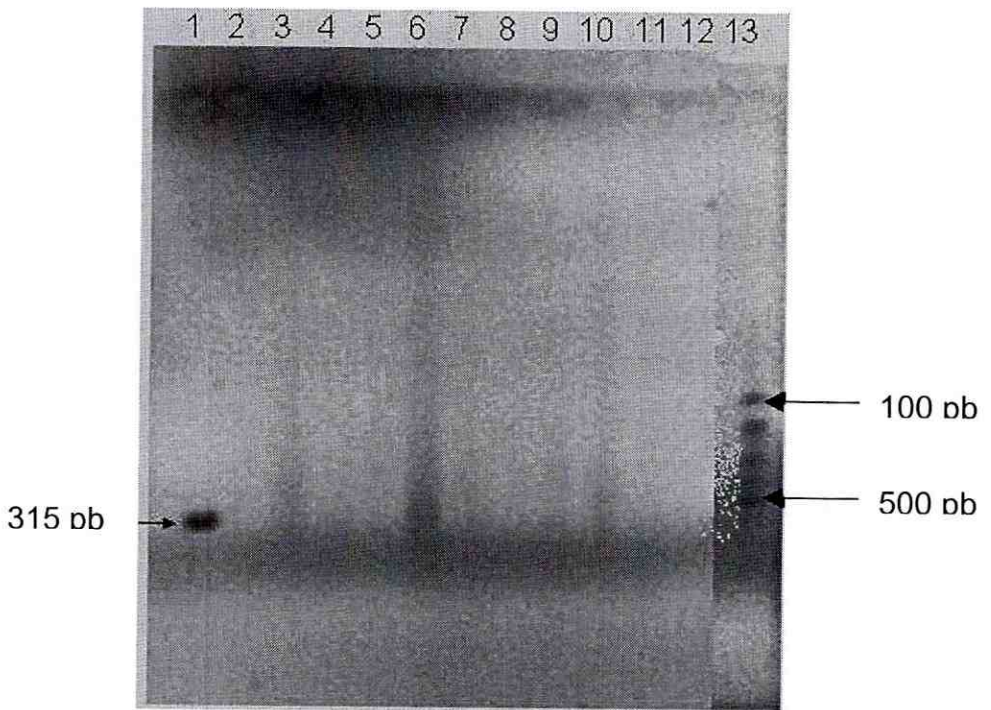
**Tabla 3.1.-** Datos de las muestras recolectadas

DATOS	POSITIVO	NEGATIVO
<b>RAZA</b>		
Holstein	8	5
Charoláis	1	2
Cebú	-	1
Suizo	-	1
Angus	1	-
Criollo	-	1
<b>SEXO</b>		
Hembra	8	9
Macho	2	1
<b>EDAD</b>		
6-12 meses	1	
12-36 meses	5	2
36 en adelante	4	8
<b>ESTADO</b>		
Coahuila	2	-
Durango Norte	2	3
Durango Sur	2	5
Zacatecas	4	2
<b>CULTIVO POSITIVO</b>	2	-



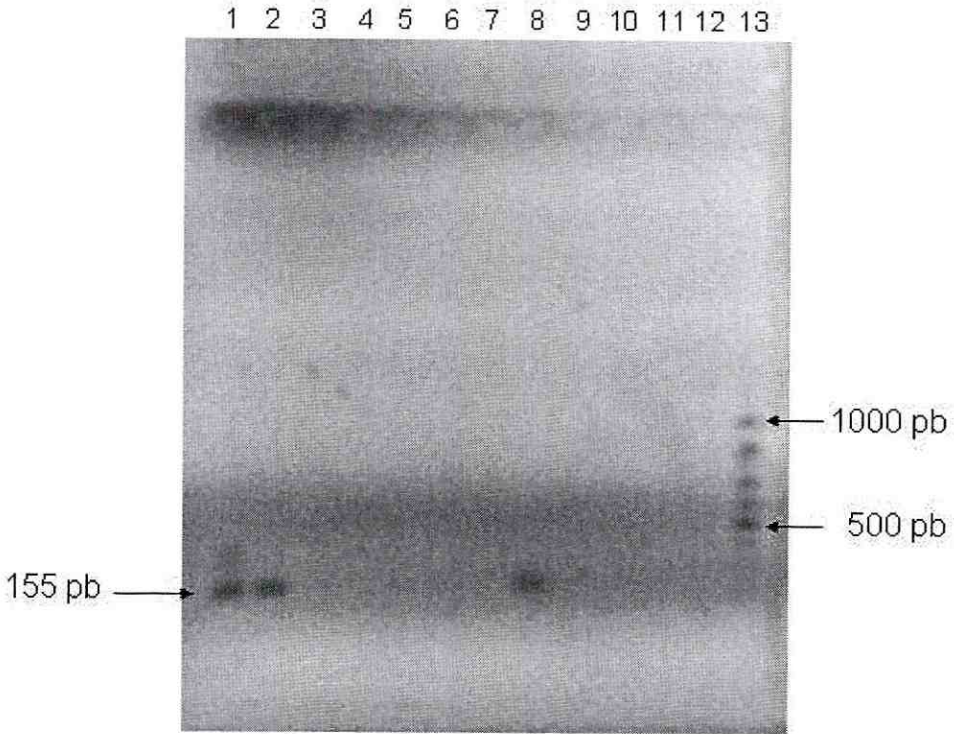
### 3.3.- Amplificones

**Figura 3.1** Electroforesis en gel de agarosa de la secuencia IS6110 amplificada por PCR de *M. bovis*.



Línea 1 representa a *M. tuberculosis* como control positivo. Líneas 2 a 8 representan a *M. bovis* de las muestras (positivos a tinción BAAR), Líneas 9-11 representan muestras negativas, Línea 12 control negativo. Línea 13 marcador de peso molecular de 100 pb.

**Figura 3.2** Electroforesis en gel de agarosa de la secuencia IS6110 amplificada por PCR anidado de *M. bovis*



Línea 1 representa a *M. tuberculosis* como control positivo. Líneas 2 a 8 representan a *M. bovis* de las muestras (positivos a tinción BAAR), Líneas 9-11 representan muestras negativas, Línea 12 control negativo. Línea 13 marcador de peso molecular de 100 pb.

**Tabla 3.3 . – Origen de las muestras positivas a PCR anidado**

ESTADO	Positivas a histopatología	Positivas a PCR
Coahuila	2	-
Durango Norte	2	-
Durango Sur	2	-
Zacatecas	4	4

La cepa del estado de Zacatecas puede tener un origen diferente al de las cepas de Durango y Coahuila.

## CONCLUSIONES

- El 40 % de las muestras positivas a *Mycobacterium bovis* por histopatología que fueron analizadas para la secuencia IS6110 por medio de PCR anidado mostraron amplificación del elemento esperado.
- Las cepas que no amplificaron la secuencia de IS6110 anidado que fueron positivas a histopatología, puede ser debido a que el número de copias del elemento de inserción IS6110 sea mucho menor al de las muestras que si tuvieron amplificación. Sin embargo esto no fue comprobado en el presente trabajo, ya que las que presentan amplificación provienen del estado de Zacatecas.
- La cantidad de micobacterias en las muestras suficientes para que se visualizara amplificación de las secuencias por el análisis de PCR requiere un mínimo de  $1 \times 10^5$  micobacterias por mililitro para su observación.
- Se requieren mas ensayos para determinar la especificidad y sensibilidad de la secuencia IS6110 de *M. bovis* como un marcador genético para diferenciación de cepas por medio de la técnica de PCR anidado.

## **RECOMENDACIONES**

Es importante validar el método de PCR anidado que se desarrollo con muestras positivas a histopatología que tengan su confirmación en cultivo para con ellas correr los mismos análisis tanto en cultivos y en tejidos incluidos en parafina para obtener la especificidad y sensibilidad del método.

## LITERATURA CONSULTADA

1. Aranaz, A., E. Liébana, A. Mateos, L. Domínguez, and D. Cousins. 1998. Restriction fragment length polymorphism and spacer oligonucleotide typing: a comparative análisis of finderpriting strategies for *Mycobacterium bovis*. *Vet. Microbiol.* 61:3111-324
2. Bloom, Barry R., 1994. Tuberculosis: Patogenesis, Proteccion and Control. Chapter 33. American Society for Microbiolgy. Washington. DC, pp. 569-572
3. Biberstein, E. L., Y. Chung Zee. 1990. Tratado de Microbiología Veterinaria. Cap. 28. Ed. Acribia, Zaragoza, España, pp229-239.
4. Carter, G.R. 1985. Bacteriología y Micología Veterinarias, Aspectos Esenciales. Ed. El Manual Moderno, México, DF., p.p. 239-246.
5. Coetsier, C. P., B. N. Vannuffel, J.F. Deneff, C. Cocito, J. L. Gala. 2000. Duplex PCR for Differential Identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in Formalin- Fixed Paraffin-Embedded Tissues from Cattle. *J Clin Microbiol* 38(8): 3048-3054.
6. Cole, S. T., K. Eiglmeier, J. Parkhill, K.D James, N. R. Thomson, P. R. Wheeler, N. Honore, T. Ganier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. M. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell, A. Fraser, N. Hamlin, S. Holroyd, T Hornsby, K. Jagels, C. Lacroix, J. Maclean, S. Moule, L. O. Murphy, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, S. Simon, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, S. Whitehead, J.R. Woodward, and B. G. Barrell. 2001, Gen Bank, accesion N. NC\_002677 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))
7. Cortinas, M. Noel, M. Fernández, M. I. Valeta, M. del R. Uriarte, M. C. Mogdasy. 2002. Caracterización genotípica de 80 cepas del género *Mycobacterium* en Uruguay. *Rev Med Uruguay* 18: 230-238.



8. Costello, Eamon. D. O'grady, O. Flynn, R. O'brien, M. Rogers, F. Quigley, J. Egan, and J. Griffin. 1999. Study of Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis and Spoligotyping for Epidemiological Investigation of *Mycobacterium bovis* Infection. *J Clin. Microb.* **37**(10):3217–3222.
9. Cousins, D.V., D. J. Dawson. 1999. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* **3**(8): 715 –721.
10. Espinosa de los Monteros, Luz E., J. C. Galán, M. Gutiérrez, S. Samper, J. F. G. Marín, L. Domínguez, L. Rafael, F. Baquero, E. Gomes-Mampaso, J. Blasquez. 1998. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* **36**: 239-242.
11. Díaz, F. O., V. B. Ruiz, L. J. Meza, C. Arriaga, D. González, C. Estrada. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. 2003. *Vet. Méx.* **34**(1):13-23
12. Dorothy, Yeboah-Manu, Malcolm D. Yates, Stuart Mark Wilson. 2001. Application of a Simple Multiplex PCR To Aid in Routine Work of the of the *Mycobacterium* Reference Laboratory. *J Clin Microbiol* **39**: 4166-4168.
13. Fang, Z., and K. J. Forbes. 1997. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Preferential Locus (*ipl*) for Insertion into the Genome. *J. Clin. Microbiol.* **35**(2):479–481.
14. Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doing, and K. J. Forbes. 1998. IS6110 Transposition and Evolutionary Scenario of the Direct Repeat Locus in a Group of Closely Related *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *J. Clin Microbiol.* **180** (8):2102-2109.
15. Garnier, T., K. Eiglmeier, J. C. Camus, N. Medina, H. Mansoor, M. Pryor, S. Duthoy, S. Grondin, L. Lacroix, C. Monsempe, S. Simon, B. Harris, R. Atkin, J. Doggett, R. Mayes, L. Keating, P.R. Wheeler, J. Parkhill, B. G. Barrell, S. T. Cole, S. V. Gordon, and G. Hewinson. 2003. Gen Bank, accesion N. NC\_002945. ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

16. Gutierrez, M., B. Samper, M. S. Jiménez, J. D. A. Van Embden, J. F. G. Maria, and C. Martín. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *J. Clin Microbiol.* 35: 3328-3330.
17. [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
18. Kong, T. H, ARM. Coates; P. D. Butcher, C. J. Hickman, T.M. Shinnick. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* expresses two chaperonin-60 homologs *Proc. Nat. Acad. Sci* 90:2608-2612
19. Liébana, E., A. Aranaz, A. Mateos, M. Vilafranca, E. Gomez-Mampaso, J. C. Tercero, J. Alemany, G. Suarez, M. Domingo, and L. Domínguez. 1995. Simple and Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Organism in Bovine Tissue Samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (1):33-36
20. Menzies, F., D. and S. Neill. 2000. Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis (a Review). *The Veterinary Journal* 160: 92-106.
21. Neumann, A.L., 1977, *Beef Cattle*, 7<sup>th</sup> edition, Ed. John Wiley & Sons, NewYork, E.U. p.p.
22. Retamal M P., M. A. Martínez T., y P. Abalos P. 2003. Secuencias de inserción IS6110 e IS1081 en cepas de *Mycobacterium bovis* provenientes de bovinos beneficiados en la Región Metropolitana. *Rev Chil Infect* 2003; 20 (3): 166-170
23. Sechi, Leonardo A., G. Leordi, S. A. Lollai, I. Dupre, P. Molicotti, G. Fadda, and S. Zanetti, 1999, Different Strategies for Molecular Differentiation of *Mycobacterium bovis* Strains Isolated in Sardinia, Italy, *Applied and Environmental Microbiology* 65 (4): 1781-1785.
24. Sechi, Leonardo, A., I. Dupre, G. Leordi, G. Fadda, S. Zanetti, 2001. Distribution of a Specific 500 base-pair Fragment in *Mycobacterium bovis* Isolates in Sardinia Italy” *Journal of Clinical Microbiology* 38(10): 3837-3839.

25. Secretaria de agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1996, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*), México (DF ).SAGAR,1996.
26. Sreevatsan, Srinand, P. Escalante, Xi Pan, D. A. Gillies li, S. Siddiqui, C. N. Khalaf, B. N. Kreiswirth, P. Bifani, L. G. Adams, T. Ficht, V. S. Perumaalla, M. D. Cave, Jan D. A. Van Embden, and James M. Musser,1996, "Identification of a Polymorphic Nucleotide in *oxyR* Specific for *Mycobacterium bovis*. Journal of Clinical Microbiology **34**(8):2007–2010.
27. Skuce, Robin A. T. P. McCorry, J. F. McCarroll, S. M. M. Roring, A. N. Scott, D. Brittain, S. L. Hughes, R. Glyn Hewinson, and S. D. Nelly. 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. Microbiology 148:519-528.
28. Thierry, D., M. D. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, J. L. Guesdon, M. Chandler, and O. Fayet. 1993, Gen Bank, accesion N. : X17348 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))
29. Trigo, Tavera Francisco J. 1998. Patología Sistémica Veterinaria 3<sup>ra</sup> Edición, Ed. McGraw-Hill Interamericana. Mexico D.F. pp 72-73.
30. Vera-Cabrera, L., M. A. Hernández-Vera, O. Welsh, W. M. Johnson, J. Castro-Garza. 2001. Phospholipase Region of *Mycobacterium tuberculosis* Is a Preferential Locus for IS6110 Transposition. Journal of Clinical Microbiology **39**(10): 3499-3504.
31. Vordermeier, H. M., P. C. Cockle, A. Whelan, S. Whelan, S. Rodees, N. Palmer, D. Bakker, and R. G. Hewinson. Development of Diagnostic Reagents To Differentiate Between *Mycobacterium Bovis* BCG Vaccination and *M. Bovis* Infection in Cattle. 1999. Clin. Diagn. Lab. Inmunol **6**:675-682.

## ANEXOS

## Anexo 1.-Técnica de Inclusión en parafina (proc. en el histoquinette)

No	PROCESO	DURACIÓN
1	Deshidratación del tejido en alcohol al 50%	2 horas
2	Deshidratación del tejido en alcohol al 70%	2 horas
3	Deshidratación del tejido en alcohol al 80%	2 horas
4	Deshidratación del tejido en alcohol al 96%	2 horas
5	Deshidratación del tejido en alcohol al 96%	2 horas
6	Deshidratación del tejido en alcohol absoluto	2 horas
7	Deshidratación del tejido en alcohol absoluto	2 horas
8	Clarificación del tejido en alcohol absoluto-xilol (50-50)	2 horas
9	Clarificación del tejido en xilol	2 horas
10	Clarificación del tejido en xilol	2 horas
11	Impregnación en parafina	2 horas
12	Impregnación en parafina	2 horas

## Anexo 2.- Procedimiento de la tinción H y E

No	PROCESO	TIEMPO
1	Desparafinar en platina caliente	2 segundos
2	Sumergir en Xilol, Alcohol absoluto, alcohol de 96%, y agua.	10 min c/u
3	Sumergir en Hematoxilina de Harris	15 min
4	Lavar en agua corriente	3 a 10 pases
5	Diferenciar en alcohol ácido	3 a 10 pases
6	Lavar en agua corriente	3 a 10 pases
7	Sumergir en agua amoniacal o agua de carbonato de litio	3 a 5 pases
8	Lavar en agua corriente	10 a 20 min
9	Teñir con eosina	2 a 5 segundos
10	Deshidratar en alcohol 96%	2 minutos
11	Deshidratar en alcohol 96%	2 minutos
12	Deshidratar en alcohol absoluto	3 minutos
13	Deshidratar en alcohol absoluto	3 minutos
14	Aclarar con Xileno	3 minutos
15	Aclarar con Xileno	3 minutos
16	Montar en portaobjetos con resina sintética y cubrir con cubrobjetos	

**Anexo 3.- Procedimiento de la tinción de Z-N**

<b>No</b>	<b>PROCESO</b>	<b>TIEMPO</b>
1	Desparafinar en platina caliente	3 segundos
2	Sumergir en Xilol, Alcohol absoluto, alcohol de 96%, y agua.	10 min c/u
3	Sumergir en Carbol Fuchina	30 min
4	Lavar en agua corriente	3 a 10 pases
5	Decolorar en alcohol ácido hasta que se torne rosa palido	opcional
6	Lavar en agua corriente	3 a 10 pases
7	Contrateñir laminilla por laminilla con solución de trabajo de azul de metileno (azul pálido)	2 a 5 minutos
8	Lavar en agua caliente	10 a 20 min.
9	Teñir con eosina	2 a 5 segundos
10	Deshidratar en alcohol 96%	2 minutos
11	Deshidratar en alcohol 96%	2 minutos
12	Deshidratar en alcohol absoluto	3 minutos
13	Deshidratar en alcohol absoluto	3 minutos
14	Aclarar con Xileno	3 minutos
15	Aclarar con Xileno	3 minutos
16	Montar en portaobjetos con resina sintética y cubrir con cubreobjetos	