

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria

Dpto. Patología Animal I (Sanidad Animal)

**NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL DIAGNÓSTICO Y LA
EPIDEMIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES POR
Mycobacterium bovis.**

Memoria presentada para optar al título de Doctor en Veterinaria.

ERNESTO LIÉBANA CRIADO

Madrid 1996.

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR

Reunido el Tribunal axaminador, constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis doctoral, que había escrito libremente sobre el siguiente tema:

ANÁLISIS DE LA CUESTIÓN DE LA RESPONSABILIDAD EN EL DERECHO PENAL

Ha sido dirigida por:

Terminada la lectura y contestadas por el tesando las objeciones formuladas por los Sres. Miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de: *10*

Madrid, *21* de *Junio* de *19**66*

EL PRESIDENTE

LOS VOCALES

EL SECRETARIO

[Handwritten signatures]

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

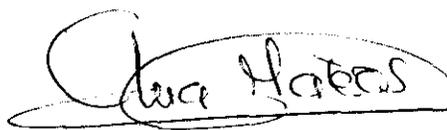
[Large handwritten signature]

D. LUCAS DOMINGUEZ RODRIGUEZ, CATEDRÁTICO, Dña. ANA MATEOS GARCÍA, PROFESORA TITULAR, DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL I (SANIDAD ANIMAL) DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID; Y D. MARIANO DOMINGO ÁLVAREZ, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y PRODUCCIONES ANIMALES DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "NUEVAS ESTRATEGIAS EN EL DIAGNÓSTICO Y LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIONES POR *Mycobacterium bovis*", de la que es autor D. ERNESTO LIÉBANA CRIADO, Se ha realizado bajo nuestra dirección, y estimamos que reúne todos los requisitos para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente en Madrid, a 16 de Abril de 1996.



Fdo. Ana Mateos García.



Fdo. Mariano Domingo Álvarez.

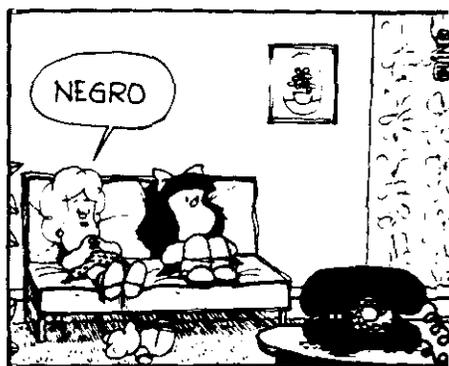
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPTO. DE PATOLOGÍA ANIMAL I
(SANIDAD ANIMAL)



Fdo. Lucas Dominguez Rodriguez

A mis padres

A Raquel



Ya casi al final de la escritura de esta "*mi obra*", y para corroborar que "*es de bien nacido el ser agradecido*", me detengo para hacer un poco de eso que llaman análisis de conciencia y escribir algo parecido a una lista de agradecimientos. No quisiera que el que lo leyera pensase que esto es sólo eso, "una lista"; con estos párrafos pretendo expresar, de todo corazón, mi gratitud a los que de una u otra manera me han ayudado a vadear las dificultades encontradas durante este trabajo (¡Que todo hay que decirlo, no han sido pocas!).

Muchísimas veces en estos años me he repetido a mi mismo: ¡ A quién se le ocurre empezar una tesis con micobacterias !, y la verdad es que si hubiera sabido lo que ello conlleva, quizás me lo hubiera pensado mejor. Sin embargo con el paso del tiempo he acabado hasta cogiéndolas cariño, y ellas a cambio me han permitido vivir algunos de los momentos más felices de mi vida. Por ello no me arrepiento, sino que me siento orgulloso y contento de lo "poquito" que he aprendido siguiendo este camino.

En primer lugar, mi gratitud va para las dos personas que concibieron la idea de empezar esta línea de investigación en nuestro Departamento. Me refiero a Lucas y Ana. Al primero le agradezco su constante lucha para conseguir lo que se propone (y por "simpatía", ¡ allí que nos arrastra a los demás !), su visión optimista de las cosas (contrapunto de mi realismo crónico) y su preocupación por aquellos que trabajan a su lado. A Ana, le agradezco su ejemplo en cómo ser una jefa organizada y cómo tener hasta el último de los papeles perfectamente localizados (a ver si otros toman también algo de ese ejemplo.....).

Por supuesto, mi gratitud para Alicia, compañera de fatigas, con quien a pesar de vientos y mareas, aún comparto laboratorio y cubículo. Y vamos a decirlo bajito ahora que no me oye: ¡ tampoco ha sido tan horrible ! (bueno pensándolo mejor, alguna que otra experiencia culinaria si que lo fue.....).

A Enrique Gómez-Mampaso, por su paciencia y amabilidad cuando nos ayudó, hace ya algunos años, a empezar a *alternar* con las micobacterias.

A Mar, Marituli y Ana, por compartir todos esos buenos momentos musicales (y no tan musicales) en el *Frente Coral Microbiológico*, aún luchando con las opiniones de alguno que otro. Por cierto que prometo retomar seriamente mis actividades corales en cuanto me "libere".

Al resto de mis compañeros de Departamento que han hecho que las horas de trabajo sean más llevaderas, entre ellos: Joaquín (gracias por tu paciencia con los novatos informáticos), Mercedes, Javier, Maite, Nacho, Susana, Alicia, Gustavo, Canarito, Esperanza, Garayzábal (nunca sabré si se escribe así o no), Miguel Angel, Toño, etc, etc, etc.....

A Inma, colega en esto de ser becario (bueno, ya no), con quien tantos ratos he pasado comentando lo "**bien**" que se vive así (¡ ánimo, que ya queda menos !).

Voy acercándome al ecuador del asunto y es cuando me pongo un poco melancólico. Ahora me toca el turno de agradecer a un montón de personas que, muy probablemente, jamás leerán estas páginas y a las que no volveré a ver hasta dentro de mucho tiempo, pero que ocupan un lugar de privilegio en mi corazón. Son mis amigos australianos, que tanto me han ayudado en el tiempo que pasé lejos de mi tierra. Entre ellos a Deb, por prestarme su ayuda siempre que la necesito y mostrarme que se puede ser una gran persona, un gran científico y un gran jefe todo al mismo tiempo. A Baz y Suz, por su infinita paciencia al soportar nuestras mil y una preguntas, y por hacerme sentir querido y arropado en todo momento, sólo espero que alguna vez pueda corresponderos de igual modo. A Julia, Rod, Chris, Judy, Ipek, Silvia, Trevor, Bob etc etc etc..... por hacerme sentir como un australiano mas, y hacer que el tiempo junto a ellos pasase muy muy deprisa. Todos ellos han logrado que todas y cada una de las tres veces en las que nos despedimos, dejase el aeropuerto con lágrimas en los ojos.

A mis padres, por sus constantes esfuerzos en llevarme donde me encuentro hoy, por su concepto de la educación, por apoyar en todo momento mis decisiones y por convencerme de que, al final, realmente existe una recompensa.

Por último y no por eso menos importante, gracias a ti Raquel, por tu paciencia al soportar mis baches, por hacerme recuperar, tantas veces, la confianza en que todo saldrá bien y por estar dispuesta a compartir conmigo todo lo bueno y lo malo que nos depare el futuro.

¿Veis?, ¡ Al final con todo este GRAN EQUIPO a mi lado, esto ha sido pan comido !

Indice

I.	<u>INTRODUCCIÓN</u>	
I.1	IMPORTANCIA HISTÓRICA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS	1
I.2	SISTEMÁTICA DEL GÉNERO <i>Mycobacterium</i>	15
I.3	CARACTERÍSTICAS DE LOS MIEMBROS DEL COMPLEJO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
I.3.1	Sistemática de las micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i> ..	16
I.3.2	Morfología y tinción	17
I.3.3	Características de cultivo	19
I.3.4	Identificación tradicional de micobacterias del complejo <i>M. tuberculosis</i>	21
I.3.5	Determinantes antigénicos	23
I.3.6	Características del genoma	32
I.4	NUEVOS CONCEPTOS SOBRE LA INFECCIÓN POR <i>M. bovis</i>	
I.4.1	Epidemiología	34
I.4.1.1	Espectro de hospedadores y transmisión de la infección ...	34
I.4.1.2	Supervivencia del microorganismo	40
I.4.2	Patogenia: importancia de los factores de virulencia y del sistema inmune	43
I.4.3	Control de la tuberculosis mediante vacunación	52
I.5	DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR MICROORGANISMOS DEL COMPLEJO <i>M. tuberculosis</i>	
I.5.1	Técnicas convencionales	58
I.5.1.1	Observación de lesiones e histopatología	58

Indice

I.5.1.2	Cultivo microbiológico	59
I.5.1.3	Observación directa por microscopía	62
I.5.2	Pruebas inmunológicas	63
I.5.2.1	Pruebas para la detección de la inmunidad humoral	63
I.5.2.2	Pruebas para la detección de la inmunidad celular	66
I.5.3	Técnicas moleculares en el diagnóstico de la enfermedad	73
I.5.3.1	Sondas de ADN	73
I.5.3.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	74
I.6	TIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>M. bovis</i> MEDIANTE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS	79
I.6.1	Análisis de polimorfismos genéticos por <i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	79
I.6.2	Reacción en cadena de la polimerasa mediante emparejamiento aleatorio (RAPD)	86
I.6.3	Polimorfismos en la región de repeticiones directas (DVR spooligotipificación)	87
I.6.4	Utilización práctica de la tipificación en la epidemiología de <i>M. bovis</i>	88
II.	<u>CAPITULO I. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TRATAMIENTOS DE DESCONTAMINACIÓN EN EL AISLAMIENTO PRIMARIO DE <i>M. bovis</i> A PARTIR DE MUESTRAS TISULARES</u>	
II.1	OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO	91
II.2	MATERIAL Y MÉTODOS	
II.2.1	Muestras sometidas al estudio	92
II.2.2	Bacteriología	92
II.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94

Indice

III. CAPITULO II. EVALUACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DENTRO DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*

III.1 OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO 99

III.2 MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1 Cepas bacterianas utilizadas en el estudio 101

III.2.1.1 Micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* .. 101

III.2.1.2 Micobacterias pertenecientes al complejo *M. avium intracellulare scrofulaceum* (MAIS) 103

III.2.1.3 Micobacterias atípicas 103

III.2.2 Cultivo de las cepas bacterianas 106

III.2.3 Preparación de las muestras para la PCR 110

III.2.3.1 Preparación de las suspensiones bacterianas inactivadas . 110

III.2.3.2 Extracción del ADN 110

III.2.3.3 Medida espectrofotométrica de la concentración del ADN 112

III.2.3.4 Cuantificación del ADN mediante la prueba comercial GIBCO BRL *Fastcheck* 112

III.2.4 Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR 115

III.2.5 Amplificación del ADN mediante PCR 117

III.2.6 Análisis de los productos de la amplificación 119

III.2.7 Prueba de la inmunoperoxidasa 120

III.3 RESULTADOS

III.3.1 Titulación y cálculo de la concentración óptima de los componentes de la PCR 122

III.3.1.1 Titulación de la concentración de $MgCl_2$ 122

III.3.1.2 Titulación de la *Thermus thermophilus* ADN polimerasa .. 123

Indice

III.3.1.3	Titulaciones de los oligonucleótidos cebadores de la reacción. Diseño y evaluación de una PCR múltiple para la identificación de <i>M. tuberculosis</i>	123
III.3.2	Estudio por PCR del espectro de hospedadores de las secuencias IS6110, IS1081, MPB70 y <i>mtp40</i> en las cepas de micobacterias	126
III.3.3	Resultados de la aplicación de la prueba de inmunoperoxidasa para detectar el antígeno MPB70	128
III.4	DISCUSIÓN	130
IV.	<u>CAPITULO III. TIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE <i>M. bovis</i> MEDIANTE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS</u>	
IV.1	OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO	143
IV.2	MATERIAL Y MÉTODOS	
IV.2.1	Cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> analizadas	144
IV.2.2	Descripción breve de las granjas incluidas en el estudio	147
IV.2.2.1	Granjas de la Comunidad Autónoma de Castilla y León ..	147
IV.2.2.2	Granjas de la Comunidad Autónoma de Cataluña	149
IV.2.2.3	Granjas de otras Comunidades Autónomas	152
IV.2.3	Extracción del ADN	153
IV.2.4	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i>	155
IV.2.4.1	Digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción <i>PvuII</i>	155
IV.2.4.2	Digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción <i>AluI</i>	157
IV.2.4.3	Marcadores de tamaño molecular	158
IV.2.4.4	Electroforesis de las muestras de ADN digerido	159

Indice

IV.2.4.5	<i>Southern blotting</i>	160
IV.2.4.6	Sondas oligonucleótidos utilizadas en este estudio	162
IV.2.4.6.1	Sonda para la rama izquierda de IS6110 (IS6110 LHS)	162
IV.2.4.6.2	Sonda para la secuencia DR (repetición directa) . . .	162
IV.2.4.6.3	Sonda para la secuencia PGRS (repetición polimórfica con alto contenido G+C)	163
IV.2.4.7	Sondas de ADN de doble cadena utilizadas en el estudio	165
IV.2.4.7.1	Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL)- <i>PvuII</i>	165
IV.2.4.7.2	PhiX174- <i>HaeIII</i> (GIBCO BRL)	165
IV.2.4.7.3	Sonda para la rama derecha de IS6110 (IS6110 RHS)	165
IV.2.4.7.4	Sonda para IS1081	166
IV.2.4.7.5	Sonda para <i>mtp40</i>	166
IV.2.4.8	Hibridación de las membranas	170
IV.2.4.9	Detección de la sonda hibridada	172
IV.2.4.10	Análisis de las imágenes	173
IV.3	RESULTADOS	
IV.3.1	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con IS6110 (RHS y LHS)	176
IV.3.2	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con la sonda para la secuencia DR	181
IV.3.3	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con la sonda para la secuencia PGRS	186
IV.3.4	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con el uso de las sondas para IS1081 y <i>mtp40</i>	191
IV.3.5	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con el uso conjunto de las sondas para las secuencias IS6110, DR y PGRS	192
IV.4	DISCUSIÓN	195

Indice

V.	<u>CONCLUSIONES DE ESTA TESIS</u>	219
VI.	<u>RESUMEN</u>	221
VII.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	225

ABREVIATURAS

ac: antes de Cristo

Ac: anticuerpo

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNr: ácido desoxirribonucleico ribosómico

Ag: antígeno

AP: fosfatasa alcalina

ARN: ácido ribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia

ATCC: *American type culture collection*

BCG: bacilo de Calmette y Guerin

BCIP: fosfato de 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil

BRENDA: *bacterial restriction enzyme DNA analysis*

BTB: *New Zealand blood test*

C: citosina

CAM: Comunidad Autónoma de Madrid

CC.AA.: Comunidades Autónomas

CE: Comunidad Europea

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CSPD: fenil fosfato de disodio 3-(4-metoxispiro {1,2-dioxietano-3,2'-(5'-cloro) triciclo [3.3.1.1^{3,7}] decano }-4-yl)

CTAB: bromuro de cetil trimetil amonio

CTU: unidades comunitarias de tuberculina

DIG: digoxigenina

dNTP: deoxinucleótido trifosfato

DO: densidad óptica

DR: *direct repeat*

DTE: ditioeritritol

DTH: hipersensibilidad retardada

DVR: *direct variable repeat*

EDTA: ácido etilen diamino triacético

EEUU: Estados Unidos de América

ELISA: *enzyme linked immunosorbent assay*
G: guanina
GIFN: interferón gamma
HCSM: *heat concentrated synthetic media*
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
HPC: cloruro de hexadecil cetil piridinio
IDTB: intradermotuberculinización
ICF: cofactor de inflamación
Ig: inmunoglobulina
IL: interleucina
IS: secuencia de inserción
ITS: espaciador interno transcrito
IU: unidades internacionales
LHS: *left hand side*
MAIS: *Mycobacterium avium intracellulare scrofulaceum*
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MM: mezcla para marcado
MPTR: *major polymorphic tandem repeat*
NBT: *nitroblue tetrazolium*
NCTC: *national collection of type cultures*
NK: *natural killer*
OADC: oleico, albumina, dextrosa, catalasa
OIE: oficina internacional de epizootias
OTU: unidad taxonómica operacional
PAHO: Pan American Health Organization
pb: pares de bases
PBS: tampón fosfato
PCR: *polymerase chain reaction*
PGRS: *polymorphic G+C rich repeat*
PPD: *protein purified derivative*
PZA: piracinamida
RAPD: *random amplification of polymorphic DNA*
REA: *restriction endonuclease analysis*

RFLP: *restriction fragment length polymorphism*

RHS: *right hand side*

SAC: sección agraria comarcal

SB 5x: tampón para muestra de ADN con ARNasa 5x

SDS: laurilsulfato sódico

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia humana

SIMA: Servicio de Investigación y Mejora Agraria

SMR: mezcla para puntos de referencia

SR 5x: tampón para muestra de ADN con ARNasa y con marcador interno de peso molecular 5x

TAE: Tris acetato EDTA

TB: tuberculosis

TBS: tampón Tris salino

TCH: hidracida del ácido 2-tiofeno carboxílico

TE: Tris EDTA

TMC: *Trudeau micobacterial collection*

TNF-a: factor de necrosis tumoral

Tth: *Thermus thermophilus*

TTBS: tampón tween Tris salino

ufc: unidad formadora de colonias

WA: *Western Australia*

WHO: *World Health Organization*

I. INTRODUCCIÓN

I.1 IMPORTANCIA HISTÓRICA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

Aunque los primeros indicios de la existencia de la tuberculosis datan de hace varios miles de años, las micobacterias no fueron descubiertas hasta 1874, año en que *Mycobacterium leprae* fue descrito por Hansen.

El bacilo tuberculoso fue descubierto por Koch en 1882, siendo en 1896 designado con el nombre de *Mycobacterium tuberculosis* por Lehmann y Neuman. En este mismo año, 1896, Smith aisló por primera vez el "bacilo bovino" (bacteria responsable de la tuberculosis bovina), introduciendo la nomenclatura de *M. tuberculosis* tipo humano y bovino. El tipo bovino fue denominado *M. tuberculosis typus bovinus* por Lehmann y Neumann en 1907, aunque no fue oficialmente reconocido y publicado hasta 1970 (Karlson y Lessel, 1970).

El origen de las micobacterias pertenecientes al complejo tuberculosis es incierto, aunque una de las teorías más difundidas es la de Grmeck (Báguena, 1994). Para este autor, el género *Mycobacterium* deriva de un antepasado común al que denomina *Mycobacterium archaicum*. Esta especie vivía en estado libre y de ella surgió una rama de la que provienen las actuales especies libres y quizás también alguna especie saprofita. De otra rama no conservadora o anagénica surgieron las especies que vivieron asociadas a organismos multicelulares, a menudo en forma de organismos patógenos. A esta rama pertenecen especies que en épocas muy lejanas se asociaron a animales marinos; sus descendientes se dividieron en 2 ramas, una conservadora, a la cual pertenecen los parásitos de peces, y otra anagénica, en la que se encuentran los parásitos de los demás vertebrados. Para este autor la asociación de las micobacterias con los animales debió producirse antes del paso de los vertebrados de la vida acuática a la vida terrestre, hace más de 300 millones de años. Según su hipótesis, *M. tuberculosis* procede de una forma bovina de *Mycobacterium* y su aparición data del Neolítico, estando ligada a la domesticación de los bóvidos.

Jubb y Kennedy en 1970 consideraron que algunas micobacterias eran parásitos estrictos de ciertas especies: humanos (*M. tuberculosis*), bóvidos (*M. bovis*), aves

(*M. avium*), móridos (*M. microti*), peces (*M. marinum*), tortugas (*M. chelonae*) y ranas (*M. fortuitum*); aunque hoy se sabe que estas micobacterias son también capaces de causar enfermedades en otros hospedadores. Desde entonces se han descrito numerosas especies de micobacterias, las cuales pueden encuadrarse en 3 diferentes grupos: muchas de ellas pueden considerarse saprofitas, otras son patógenas oportunistas y las terceras, patógenas estrictas del hombre, de los animales o de ambos (Youmans, 1979).

Durante muchos años, los patógenos más importantes fueron aquellos considerados como responsables de la tuberculosis en el hombre (*M. tuberculosis*), bóvidos (*M. bovis*) y aves (*M. avium*); pero en 1983 más de la mitad de las 40 especies conocidas de micobacterias, eran reconocidas como patógenas para el hombre y los animales (Lepper y Corner, 1983).

La paleontología ha permitido encontrar las huellas más antiguas de la tuberculosis a partir del estudio de restos humanos. Los primeros hallazgos al respecto datan del Neolítico, Paul Bartes en 1907 describió el primer caso de esta enfermedad a partir de varias vértebras dorsales encontradas en un cementerio de Heidelberg, pertenecientes a un adulto joven que vivió aproximadamente en el 5.000 a.C.

En la literatura asirio-babilónica, más concretamente en el código de Hammurabi, se encuentran algunas referencias a la tuberculosis, aludiendo a ella con el término de "fiebre".

En el antiguo Egipto la presencia de tuberculosis se confirma por dos fuentes: las representaciones artísticas y los restos humanos (momias). Entre las primeras aparecen figurillas mostrando deformidades que han sido atribuidas a esta enfermedad y que son presumiblemente predinásticas (anteriores al 3.000 a.C.). En 1881 cerca de Tebas fueron descubiertas 44 momias bien preservadas procedentes de la XXI Dinastía (1.000 a.C.), viéndose que en una de ellas, conocida como Nesperehan, aparecían huellas evidentes de tuberculosis ósea y muscular.

Durante el Romanticismo la imagen de la tuberculosis era la de una enfermedad de moda, siendo conocida como el "mal de vivir" o el "mal du siècle". En

esta época se pensaba que la tisis era un mal hereditario que afectaba especialmente a los ricos, los jóvenes y las mujeres. Para muchos artistas de la época la muerte es vista como una liberación, y el abandono total hasta contraer la tuberculosis y morir, constituía una meta admitida y deseada.

A mediados del siglo XIX se produce un cambio de actitud y la sociedad se atemoriza ante ella, tratando de ocultarla. El tísico pasa a ser un marginado social y todo lo que de él emana es considerado como contagioso. Con la aparición de estadísticas fiables se demuestra que la tuberculosis no es, como se creía, una enfermedad de ricos, sino que afecta especialmente a la clase obrera debido a sus rudimentarias e insalubres condiciones de vida. La enfermedad se convirtió en la principal causa de muerte en el hombre entre 1850 y 1900; además se comprobó que el ganado bovino, así como otros animales, podían padecer una enfermedad similar a la humana (McFadyean, 1888).

En el primer congreso sobre tuberculosis en París en 1888, se llegó a la conclusión de que el diagnóstico de la enfermedad debía basarse en exámenes clínicos y anatomopatológicos, así como en la demostración o aislamiento del bacilo tuberculoso de Koch. En este congreso Jean Antoine Villemin comunicó la posibilidad de transmisión de la enfermedad entre el hombre y los animales; pero su comunicación fue recibida con frialdad al enfrentarse con la opinión aún sustentada en la época, de la tuberculosis como diátesis y enfermedad hereditaria. Ya en aquel tiempo se reconoció el peligro para el hombre al consumir leche de vacas tuberculosas; y se recomendó, como medida de profilaxis, el tratamiento térmico de la leche y la retirada de las carcasas de animales tuberculosos.

Debido a la alarmante situación de la **tuberculosis humana** a principios de siglo, muchos de los países desarrollados instauraron programas de control para esta enfermedad, lo cual supuso un descenso significativo en la incidencia de la misma durante los últimos 50 años. La tuberculosis ha sido considerada como una enfermedad de la pobreza, y el hacinamiento y las carencias en la dieta han contribuido a la morbilidad y a la difusión de la enfermedad en los países del tercer

mundo, en los que nunca ha dejado de ser un importante problema sanitario.

Sin embargo hoy en día esta enfermedad, casi olvidada en los países industrializados, está recobrando de nuevo el centro de la atención mundial: las cifras oficiales demuestran que la incidencia de la tuberculosis está aumentando a la largo y ancho del globo. Se estima que 1.700 millones de personas (un tercio de la población mundial) están infectadas con el bacilo tuberculoso; de estos, 60 millones padecen tuberculosis de forma activa y cada año aparecen 10 millones de nuevos casos. El número de muertos por esta infección se cifra en 3 millones al año en todo el mundo (Dawson 1990; Bloom, 1992a y b). La tuberculosis es responsable de más del 6 % del total de muertes en todo el mundo y se trata de la enfermedad infecciosa que causa un mayor número de defunciones.

La tuberculosis es primariamente un problema de los países en vías de desarrollo, en los que se registran más del 95 % de los casos actuales. Sin embargo, en los últimos 5 años, la tendencia decreciente en las cifras de incidencia de los países desarrollados ha sufrido una inversión.

En los EEUU se ha encontrado un reciente aumento en el número de tuberculosos debido principalmente al crecimiento exponencial del SIDA (Sunderam et al., 1986; Bermejo et al., 1992). En Europa se ha observado un fenómeno similar y el número de casos activos ha aumentado en porcentajes cifrados entre el 4 % (Reino Unido) y el 33 % (Suiza) (Kaufmann y Van Embden, 1993). La endemia global de HIV/SIDA ha tenido un gran impacto en la situación actual de la tuberculosis y se estima que a nivel mundial 4,4 millones de personas están infectadas a la vez con *M. tuberculosis* y HIV. Además, y debido a los problemas que la quimioterapia conlleva en estos pacientes, han aparecido cepas multiresistentes de *M. tuberculosis* que han sido la causa de infecciones nosocomiales en hospitales e instituciones (Bloom, 1992a y b).

En los países industrializados, y especialmente en Europa, la emigración ha jugado también un importantísimo papel en la difusión de esta enfermedad.

Aunque la tuberculosis en el hombre está principalmente producida por

M. tuberculosis; otras especies, como *M. bovis* y *M. africanum*, pueden provocar procesos patológicos idénticos que constituyen un importante problema de salud pública.

En 1888, Walley expresó su teoría de que la tuberculosis bovina podía ser transmitida al hombre mediante leche, productos lácteos, carne o directamente por contacto con animales infectados; proponiendo, como medida de control, que la inspección de las canales se hiciese bajo supervisión veterinaria.

En los EEUU, Ravenel en 1902 y Park en 1913, presentaron en sendos trabajos pruebas irrefutables de la transmisión de *M. bovis* del ganado al hombre. Como respuesta a sus trabajos, en 1906 y después de constatar que en aquel año el 25 % de las muertes por tuberculosis en humanos se debieron a *M. bovis*, se creó un Comité Federal Veterinario encargado de la inspección de la carne. Posteriormente, en 1917, se comenzó con un programa de erradicación de la enfermedad en el ganado, lo cual no se hizo en Europa hasta 1935, debido en gran parte a las erróneas ideas difundidas por Koch de que el bacilo bovino no era tan patógeno y transmisible como el bacilo humano.

A principios de siglo empezaron a ser frecuentes las descripciones de casos clínicos de **tuberculosis humana originados por *M. bovis***; así McFadyean, en 1902, denunció que la leche procedente de vacas tuberculosas era la causa de tuberculosis intestinal en niños escoceses. En este mismo año, Ravenel fue el primero en aislar e identificar una cepa de *M. bovis* de un niño muerto por meningitis tuberculosa; y Griffith, en 1914, describió el primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar por *M. bovis*. Rápidamente se estableció que *M. bovis* era capaz de producir todos los cuadros clínicos de tuberculosis en el hombre.

En 1929 el 5 % de los casos de tuberculosis humana en el Reino Unido se debían a *M. bovis*, este porcentaje era del 30 % en los casos de niños menores de 5 años. *M. bovis* era aislado con mayor frecuencia y en orden decreciente de: lesiones en piel, lesiones cervicales, meningitis tuberculosas, lesiones en huesos y articulaciones, tuberculosis génito-urinaria, y sólo en un 1-3 % de los casos en procesos de tuberculosis pulmonar (Cutbill y Lynn, 1944). En estos años, la principal

vía de infección por *M. bovis* era la ingestión de leche, seguida por la exposición ocupacional (carniceros, lecheros etc...), por ello la enfermedad aparecía preferentemente en localizaciones no pulmonares.

El papel de la leche como vehículo para la transmisión de la tuberculosis bovina es conocido por los veterinarios desde hace más de un siglo (Fleming, 1875). La fuente habitual de *M. bovis* en la leche es la infección mamaria, pero también puede ocurrir por contaminación con heces, descargas uterinas, polvo del establo etc...

En EEUU la pasteurización de la leche se recomendó en 1907, como medida preventiva de la tuberculosis; sin embargo, en gran parte de Europa, existía aún un gran debate sobre el papel inmunizante de la leche tuberculosa, debido a la opinión de algunos sectores médicos de que la patogenicidad de *M. bovis* para el hombre era menor que la de *M. tuberculosis* (Cobbett, 1917; Calmette, 1936), y de que una infección localizada por *M. bovis* protegía de la muerte por tuberculosis (ley de Marfan).

Se han hecho estudios relacionando las tasas de mortalidad por tuberculosis en humanos y las cifras de incidencia de tuberculosis bovina (Francis, 1958; Sjogren y Sutherland, 1975); comprobándose que sobre la población en general, la leche tuberculosa tiene realmente un efecto inmunizante pero también un inaceptable precio para una minoría. Por lo que, si la población realmente necesita tal inmunidad, es más adecuado y seguro proporcionársela mediante la vacunación con BCG (bacilo de Calmette y Guérin) (aunque existen serias dudas sobre la eficacia real de la misma).

Otra de las posibles vías de transmisión de la enfermedad es la carne procedente de ganado infectado. Dado que la carne es un alimento que generalmente se cocina antes de su consumo, no representa una grave fuente de infección para el hombre. Aún así existen las excepciones del peligro que entraña como enfermedad ocupacional para trabajadores de mataderos y manipuladores de carne, además del riesgo para aquellas culturas en las que la carne se consume cruda o poco cocinada.

Ruys en 1939 y Sigurdsson en 1945 demostraron la transmisión de la tuberculosis por inhalación dentro del establo, desde el ganado al hombre; y que era

posible la propagación de *M. bovis* entre humanos por vía pulmonar. Esta afirmación plantea aún controversia aunque han sido publicados varios casos (Collins y Grange, 1987).

Debido al avance de las campañas de erradicación en animales, la incidencia actual de casos de *M. bovis* en humanos ha descendido considerablemente. La instauración de las políticas de decomiso de alimentos afectados y de pasteurización de la leche, hacen que los casos actuales de tuberculosis humana por *M. bovis* aparezcan, casi exclusivamente, como reactivaciones de antiguas infecciones. El pulmón es hoy en día el órgano más afectado, seguido por el tracto génito-urinario y por linfadenitis cervicales (Yates y Grange, 1988), lo cual explica porqué ocurren aún nuevas infecciones por *M. bovis* preferentemente en niños en contacto con estos pacientes (Wilkins et al., 1986a). En esta situación, el hombre se convierte en un importante reservorio de *M. bovis* para el ganado y estas transmisiones han sido comunicadas en diferentes áreas: Suecia (Magnusson, 1941), Inglaterra (Lesslie et al., 1968), USA (Baldwin, 1968), Holanda (Huitema, 1969), Checoslovaquia (Rossi y Dokoupil, 1969), Nueva Zelanda (Black, 1972), Canadá (Wigle et al., 1972) y Alemania (Werner, 1981).

La transmisión de *M. bovis* del hombre al ganado ha originado brotes explosivos de tuberculosis en diferentes rebaños. Sin embargo, los casos conocidos de transmisión de *M. tuberculosis* no parecen producir enfermedad clínica en el ganado, aunque el microorganismo puede ser excretado por leche. La vía más frecuente de transmisión de la enfermedad desde el hombre a los bóvidos es por contaminación urinaria y fecal de las camas, pastos y alimentos de los animales, aunque también ha sido comunicada la transmisión por vía aerógena.

La información epidemiológica actual sobre el impacto de la tuberculosis bovina en la salud humana sigue siendo bastante deficiente, debido en gran parte a que el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis humana, se limita generalmente a la baciloscopia directa. Incluso en los casos en los que se realizan cultivos, no se suelen tener en cuenta, en la rutina habitual de trabajo, las necesidades peculiares

para el aislamiento e identificación de micobacterias "fastidiosas" como *M. bovis* (Yates y Grange, 1988; Ritaco y de Kantor, 1992). Por ello, la contribución de *M. bovis* a las cifras de morbilidad y mortalidad tuberculosa nunca ha podido ser calculada de una manera estricta, y estos datos se calculan mediante extrapolación de pequeños estudios a las cifras medias generales.

Existen trabajos aislados sobre la incidencia de estas infecciones en áreas concretas como Argentina, en la que los porcentajes de tuberculosis humana por *M. bovis* están entre el 0,4 y el 6 % (Centragolo, 1971; Barrera y de Kantor, 1987).

Las cifras de aislamiento de *M. bovis* de humanos para el Reino Unido en la década de 1980 fueron del 1,9% de los casos de tuberculosis (Davies et al., 1984). Aunque en algunas regiones con mayor prevalencia de bovinos afectados, la cifra se elevaba al 2,6 % (Wilkins et al., 1986a y b). En 1981, Collins y Yates confirmaron que el 2,7 % de los casos de tuberculosis humana en el sureste de Inglaterra se debían a *M. bovis*. Yates y Grange en 1988, estimaron que en esa misma región, el bacilo bovino era responsable del 1 % de todos los casos de tuberculosis y del 0,6 % de los casos de tuberculosis pulmonar.

A nivel global y de acuerdo con los datos publicados por la PAHO/WHO (Pan American Health Organization/World Health Organization) cada año en América latina aparecen 7.000 nuevos casos de tuberculosis humana por *M. bovis*, lo que representa una tasa de 2 casos por 100.000 habitantes. Las cifras oficiales no son demasiado fiables y la verdadera incidencia podría ser hasta ocho veces superior, sobretodo en países en vías de desarrollo (de Kantor et al., 1991).

En zonas deprimidas del continente africano, la importancia de esta zoonosis se incrementa como resultado de una serie de factores como son: la mayor proximidad física entre animales infectados y humanos, el hecho de que un 90 % de la leche se consuma sin pasteurizar y la alta incidencia de infección con HIV. Aún así no se dispone de datos globales sobre la incidencia de *M. bovis* en la población humana de estas áreas. En un reciente estudio llevado a cabo en Egipto se comprobó que el 5 % de 300 micobacterias cultivadas a partir de esputos humanos eran *M. bovis* (Elsabban et al., 1992).

Como resumen puede resaltarse que la infección primaria por *M. bovis* en humanos no es común en países desarrollados en los que la tuberculosis bovina ha sido erradicada, aunque aún ocurren reactivaciones postprimarias con un potencial real en la transmisión de la infección, tanto a humanos como a animales. La mayor parte de estos casos se dan en personas que nacieron antes de la finalización de los esquemas de erradicación en animales. En tiempos pasados, los casos de infección primaria por *M. bovis* eran preferentemente de localización no pulmonar, sin embargo hoy en día, aproximadamente el 50 % de las reactivaciones afectan al pulmón, lo cual aumenta las posibilidades de transmisión de *M. bovis* entre humanos. La transmisión entre pacientes HIV positivos ha sido confirmada recientemente en un brote nosocomial en un hospital de París (Bouvet et al., 1993) y en nuestro país (Gómez-Mampaso, comunicación personal).

En los países en vías de desarrollo las infecciones primarias aún representan un serio problema sanitario, y la situación se ve empeorada con la concurrencia de enfermedades inmunosupresoras que facilitan la transmisión de *M. bovis* entre humanos.

Por todo ello es de destacar que la tuberculosis humana por *M. bovis* aún tiene importancia, tanto en países desarrollados, como en países en vías de desarrollo, y que es necesaria una continua vigilancia de la misma, para lo que es de gran utilidad contar con métodos rápidos y fiables para la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

La **tuberculosis bovina** es conocida desde el siglo pasado (McFadyean, 1888; Smith, 1898) y hoy en día aún tiene una gran importancia en la economía agraria de muchos países. Cuando se estableció la conexión entre la tuberculosis en humanos y el consumo de leche contaminada con bacilos tuberculosos, la mayor parte de los países avanzados pusieron en marcha campañas para la detección de animales infectados y la erradicación de la enfermedad.

La tuberculosis bovina no sólo tiene importancia por sus implicaciones zoonóticas sino también porque origina ingentes pérdidas económicas debidas a

mortalidad en los animales, a los decomisos en las canales y a las pérdidas en la producción láctea. Cuando no se establecen las medidas de control adecuadas para esta enfermedad, los efectos en la economía y en la salud humana progresan lenta y constantemente.

En países con gran tradición ganadera como Argentina, las pérdidas en la producción de leche en vacas tuberculosas respecto a vacas sanas se han cifrado en un 18%. Estas pérdidas son debidas principalmente a un retraso en la primera lactación, y a una disminución del número y duración de sucesivas lactaciones (Nader y Husberg, 1988). Un problema añadido es el cierre de los mercados de exportación a aquellos países que no estén libres de la enfermedad.

Varios países, aún utilizando las más modernas técnicas diagnósticas de las que se dispone, no han erradicado la enfermedad debido a la existencia de fauna salvaje que actúa como reservorio de *M. bovis*. Como ejemplos de esta situación se puede citar a Nueva Zelanda, cuyo reservorio es el possum (*Trichosus vulpecula*) o Gran Bretaña, cuyo reservorio es el tejón (*Meles meles*). Además en diversos países, otros animales como cerdos, jabalíes, ciervos, bisontes, búfalos, etc..., se han mostrado como posibles reservorios de la enfermedad.

La situación actual en la Comunidad Europea según datos de 1991 es la siguiente: la enfermedad ha sido erradicada en Dinamarca, Luxemburgo y Holanda. Bélgica, Alemania, Francia, Gran Bretaña, Grecia y Portugal tienen índices de prevalencia en rebaños menores al 0,4 %, e Italia, Irlanda y España muestran aún índices elevados de incidencia en rebaños (llegando a ser en España del 10,8 %) (Caffrey, 1994).

En el caso de Canadá la erradicación total se espera para dentro de pocos años (8 de sus 10 provincias están hoy en día libres de la enfermedad). En una situación similar se encuentran los EEUU aunque cuentan con dos graves problemas: las importaciones de ganado mejicano y la existencia de núcleos, recientemente descubiertos, de tuberculosis en cérvidos en cautividad (Essey y Koller, 1994).

En los países de América latina y del Caribe las cifras de incidencia en rebaños oscilan entre el 37 % de Argentina y el 0 % de Panamá (de Kantor y Ritacco, 1994). En este área el censo de ganado se estima en 300 millones de cabezas, de los cuales

80 millones están en países con baja o nula incidencia, y los restantes 220 se encuentran en países con alta incidencia de infecciones por *M. bovis*.

Australia fue considerada como libre de tuberculosis bovina en 1992, aunque durante 1993 y 1995 se dieron pequeños focos de la enfermedad en lugares concretos que están bajo un estricto control (Cousins, 1995 comunicación personal). En Nueva Zelanda existen aún zonas endémicas en las que la enfermedad es mantenida en reservorios salvajes (Tweddle y Livingstone, 1994).

En nuestro país, la lucha contra la tuberculosis se inició con la promulgación de la Ley de Epizootias de 1952, tomando carácter con la Orden Ministerial del 24 de mayo de 1965, por la que se estableció el Plan Nacional de lucha contra la tuberculosis. En los últimos 10 años se ha conseguido rebajar la prevalencia de tuberculosis del 20 % al 1,6 % (1994). Sin embargo, esta prevalencia resulta elevada si se compara con el resto de los países de Europa (Tabla 1). Según datos de 1994, 14.189 establos (el 5,7 % de los 249.815 investigados) en España fueron positivos a la intradermotuberculinización (IDTB) (Tabla 2). Se chequearon el 67 % de los animales censados y el 1,6 % de los animales sometidos a examen fue positivo (Tabla 3).

En la actualidad (1994), la Comunidad Autónoma de Madrid (C.A.M.) ocupa el octavo puesto en el mapa autonómico en cuanto al porcentaje de positividad de animales a la intradernotuberculinización (1,14 %); si nos atenemos al número de rebaños infectados, Madrid ocupa el quinto lugar (13,5 %), estando entre las únicas 8 regiones cuya tasa supera el 10 %. Si se estudia la evolución temporal de la enfermedad (Tablas 4 y 5) se observa que la disminución de la incidencia ha sido paulatina y progresiva en los últimos años y que nos estamos acercando a una situación asintótica.

En el año 1995, los cálculos de las indemnizaciones por sacrificio ascendieron a 3.694 millones de pesetas, sufragados en un 66,29 % por el Ministerio de agricultura, pesca y alimentación (M.A.P.A.) y en un 33,71 % por las Comunidades Autónomas (C.C.A.A.). Esta cantidad supuso el 49,5 % del total de las indemnizaciones por sacrificio de las campañas de saneamiento de enfermedades infecciosas en España. En el caso de la C.A.M. los gastos por indemnizaciones ascendieron a

45.700.000 pesetas de las cuales 16.815.360 fueron aportados por la comunidad autónoma.

También en 1995, los gastos de ejecución de la campaña de tuberculosis sumaron 1.478 millones de pesetas, repartidos entre las CC.AA. (1.441 millones) y el M.A.P.A. (37 millones). En el caso de la C.A.M. los gastos de ejecución fueron de 18.000.000 pesetas de las cuales 17.638.050 fueron aportadas por la comunidad autónoma.

Los gastos totales (indemnizaciones más ejecución) estimados para España en 1996 se cifran en 3.650 millones de pesetas.

Como conclusión puede señalarse que la erradicación total de la tuberculosis en España será muy lenta si no se toman medidas adecuadas, con el consiguiente peligro de revertir a situaciones anteriores. Es por ello **muy necesaria** la aplicación de las últimas técnicas diagnósticas disponibles para detectar un mayor número de animales infectados y hacerlo más precozmente, así como la realización de un mapa epidemiológico nacional de las cepas de *M. bovis*, lo cual posibilitaría la identificación del origen de los brotes y el seguimiento epidemiológico de los mismos.

Tabla 1. Prevalencia de tuberculosis en rebaños en países miembros de la Comunidad Europea, en 1991. (Caffrey, 1994).

País	Prevalencia en rebaños (%)
Dinamarca, Luxemburgo, Holanda	0
Bélgica	0,01
Alemania	0,024
Portugal	0,12
Reino Unido	0,15
Grecia	0,31
Francia	0,35
Italia	3,71
Irlanda	8,8
España	10,8

Tabla 2. Prevalencia de la tuberculosis en rebaños en España. (Situación de la Sanidad Animal en España, Secretaría General de Producciones y Mercados Agrarios del M.A.P.A., 1994).

Año	Establos investigados	Establos libres	Establos libres (%)
1990	247.313	220.674	89,2
1991	261.050	236.962	90,7
1992	255.096	236.067	92,5
1993	248.875	234.169	94,1
1994	249.815	235.626	94,3

Tabla 3. Prevalencia de la tuberculosis en ganado vacuno en España. (Situación de la Sanidad Animal en España, Secretaría General de Producciones y Mercados Agrarios del M.A.P.A., 1994).

Año	Animales censados	Animales investigados	Animales positivos	Animales positivos (%)
1990	5.126.000	2.652.878	98.006	3,7
1991	5.063.000	3.217.042	118.363	3,7
1992	5.122.000	3.060.270	65.415	2,1
1993	5.059.000	3.384.637	58.162	1,7
1994	5.217.000	3.531.940	57.447	1,6

Tabla 4. Prevalencia de la tuberculosis en rebaños de ganado vacuno en la C.A.M. entre 1991 y 1994.

Año	Número de rebaños investigados	Número de positivos	Positivos (%)
1991	1.387	450	32,4
1992	1.621	482	29,7
1993	1.224	301	24,6
1994	1.221	165	13,5

Tabla 5. Prevalencia de la tuberculosis en ganado vacuno en la C.A.M. entre 1991 y 1994.

Año	Número de animales investigados	Número de positivos	Positivos (%)
1991	47.910	2.164	4,51
1992	56.818	2.154	3,79
1993	48.659	1.102	2,26
1994	45.800	520	1,13

I.2 SISTEMÁTICA DEL GÉNERO *Mycobacterium*

Las micobacterias son microorganismos de morfología bacilar, difíciles de teñir mediante la tinción de Gram (aunque estructuralmente considerados como Gram positivos), con un elevado porcentaje de G+C (Guanina-Citosina), aeróbicos, no esporulados, inmóviles y con la propiedad de ser ácido alcohol resistentes (una vez teñidos resisten la decoloración con alcoholes acidificados y con ácidos minerales fuertes). Pertenecen a la familia *Mycobacteriaceae*, que posee un sólo género: *Mycobacterium*.

En los primeros tiempos de la Micobacteriología, las micobacterias fueron divididas en aquellas capaces de causar tuberculosis y que pueden transmitirse entre sus hospedadores, y aquellas que son ambientales o saprofitas (Runyon, 1959). Este último grupo ha sido denominado de múltiples formas como: micobacterias no tuberculosas, atípicas, anónimas, intermedias, ambientales u oportunistas.

Desde entonces las micobacterias han sido clasificadas en diferentes especies según infinidad de esquemas que se basan en su velocidad y temperatura de crecimiento, patogenicidad, características del crecimiento (pigmentación y características de las colonias), morfología, y reacción en diferentes pruebas bioquímicas y de sensibilidad a drogas (Runyon, 1959; Bönicke, 1962; Bojalil et al., 1962; Runyon et al., 1974; Marks, 1976; Jenkins et al., 1982).

Aunque aún no hay un sistema definitivo para la clasificación común para todos los investigadores, hay una lista de especies reconocidas de micobacterias (Skerman et al., 1980).

Más recientemente se han hecho numerosísimos estudios para identificar a las micobacterias mediante técnicas de inmunoelectroforesis (Roszman et al., 1968), inmunodifusión (Stanford, 1973), inmunofluorescencia (Gilmour y Angus, 1976), cromatografía en capa fina (Jarnagin et al., 1983), ELISA para los antígenos glicolipídicos (Yanagihara et al., 1985), cromatografía líquido-gas (Tisdall et al., 1982) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rogall et al., 1990b; Böddinghaus et al., 1990; Vaneechoutte et al., 1993), siendo estas últimas las más utilizadas y extendidas en la actualidad debido a su especificidad, simplicidad y rapidez.

I.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS MIEMBROS DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*.

I.3.1 Sistemática de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*

El Complejo *M. tuberculosis* comprende a las especies *M. tuberculosis* (bacilo tuberculoso humano), *M. bovis* (bacilo tuberculoso bovino), *M. africanum* (grupo heterogéneo de cepas encontradas principalmente en Africa ecuatorial y con propiedades intermedias entre ambos tipos), *M. bovis* BCG (cepa vacunal derivada de *M. bovis*) y *M. microti* (bacilo tuberculoso de roedores y pequeños mamíferos). Además ocasionalmente se aíslan miembros del complejo que no se ajustan a ninguna de las especies señaladas (ejemplo "bacilo de focas", Cousins et al., 1990).

Como se comentó anteriormente, el bacilo tuberculoso fue descubierto por Koch en 1882 y fue más tarde, en 1896, designado con el nombre de *Mycobacterium tuberculosis* por Lehmann y Neuman. Durante muchos años *M. tuberculosis* incluyó a los tipos humano y bovino del bacilo. *M. tuberculosis* causa infección en el hombre, aunque también ha sido descrito en perros y gatos (Aranaz et al., 1996) y en otros animales en contacto con humanos infectados.

El "bacilo bovino" fue aislado por primera vez por Smith en 1896, siendo él quien introdujo la nomenclatura de *M. tuberculosis* tipo humano y bovino. El tipo bovino fue denominado *M. tuberculosis typus bovinus* por Lehmann y Neumann en 1907, aunque no fue oficialmente reconocido y publicado hasta 1970 (Karlson y Lessel, 1970).

M. bovis BCG es una variante atenuada de laboratorio de *M. bovis* producida por Calmette y Guérin en 1908.

M. africanum fue descrito como una nueva especie por Castets et al. en 1969 y tiene importancia como productor de la tuberculosis en el continente africano. Causa infecciones principalmente en el hombre y en los primates (Thorel, 1980)

M. microti o "vole bacillus" fue descrito por primera vez por Wells y Oxen en 1937 y denominado como tal por Breed et al. en 1957, esta especie afecta principalmente a pequeños roedores (Wells y Robb-Smith, 1946; Smith, 1960; Cousins

et al., 1994) y aunque se han comunicado infecciones en un gato, cerdos (Huitemá y Jaartsveld, 1967) y llamas (Pattyn et al., 1970), no es considerado patógeno para el hombre.

Aunque estas especies pueden ser diferenciadas entre sí por un limitado número de pruebas fenotípicas y por sus características epidemiológicas, estudios taxonómicos basados en la relación entre antígenos solubles citoplásmicos, y en la homología entre los ADN, indican claramente que los integrantes de este complejo son realmente miembros de una única especie. Así por ejemplo, estudios de homología ADN-ADN han revelado que no existen diferencias significativas entre ellas, presentando porcentajes de homología entre el 85 y el 100 % (Bradley, 1972; Baess, 1982; Imaeda, 1985). Por ello existe un considerable debate en torno a esta clasificación y algunos autores creen más apropiado clasificarlos como variedades o subespecies de *M. tuberculosis* (Grange, 1979; Collins y Yates, 1982; Imaeda, 1985).

Rogall et al. en 1990a y b, después de secuenciar el ADN que codifica para el ARN 16S vieron que no existen diferencias en las secuencias de las distintas cepas del complejo. Más aún, en un reciente estudio, se encontró tras la secuenciación de los espaciadores internos transcritos (ITS) entre los ADN ribosómicos 16S y 23S, que no existían diferencias entre las especies pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* (Frothingham et al., 1994).

Estos hechos apoyan la tesis de que la definición de especies dentro de este complejo es algo infundamentado, sin embargo las diferencias epidemiológicas y de patogenicidad existentes entre ellas, hacen que sea práctico mantener la separación de las mismas.

1.3.2 Morfología y tinción

Los microorganismos pertenecientes a este complejo son considerados como Gram positivos (a pesar de su dificultad para teñirse por este método), ácido-alcohol resistentes, generalmente con forma bacilar (aunque pueden adoptar formas

pleomórficas) y con un tamaño aproximado de $1\mu\text{m} \times 3-6\mu\text{m}$. Es frecuente encontrarlos en formaciones serpentiformes semejantes a cuerdas, que pueden evidenciarse por microscopía después de la tinción mediante el método de Ziehl-Neelsen.

Poseen una pared celular muy gruesa (Draper, 1982), característica de este género y con una estructura de 3 capas que comprende:

1) Una capa basal de peptidoglicano (compuesto por ácido N-glicosil murámico y N-acetil glucosamina)

2) Una capa intermedia compuesta de complejos ácido micólico-arabinogalactanos (mantienen estable la unión de la mureína interna con la envoltura externa de ácidos micólicos).

3) Una capa externa rica en depósitos lipídicos [micósidos, cord factor (6,6-O dimicoltrealosa), sulfolípidos, etc...] (Imaeda et al., 1968).

Rastogui et al. en 1986 describieron otra capa adicional compuesta por polisacáridos acídicos.

Minnikin en 1991 propuso un modelo estructural para la fracción lipídica de la pared micobacteriana. Este autor propone la existencia de una matriz de ácidos micólicos (unida a los arabinogalactanos) a la cual se asocian covalentemente toda una variedad de complejos lipídicos libres (desde los tiocerolos o ceras no polares, pasando por los glicolípidos fenólicos, hasta los glicopéptidolípidos y los lipooligosacáridos muy polares). La matriz de ácidos micólicos se estructura a su vez en 4 subcapas: la barrera estructural de permeabilidad, la región de uniones paralelas, la región de interacción hidrofóbica y la región hidrofílica exterior.

El peso seco de la pared contiene más de un 60 % de lípidos (Kotani et al., 1959), siendo esta fracción lipídica la responsable de la propiedad de ácido-alcohol resistencia de las micobacterias (Harada, 1976); ésta consiste en la capacidad del material lipídico para formar complejos estables con ciertos colorantes solubles en lípidos, y estos complejos no se decoloran mediante el tratamiento con mezclas de alcoholes y ácidos o con ácidos minerales. Esta propiedad se demuestra mediante las

tinciones de Ziehl-Neelsen (Carleton, 1967) o mediante tinción con auramina O (Winblad y Duchek, 1973).

Las micobacterias difieren de otros actinomicetos poseedores de ácidos micólicos (ácidos grasos de elevado peso molecular que poseen un hidroxilo en posición beta y una ramificación en posición alfa) en la complejidad de los tipos de ácidos micólicos presentes; las micobacterias son los únicos microorganismos capaces de sintetizar ácidos micólicos de 60-90 átomos de carbono, conteniendo sólo una o dos insaturaciones y diferentes funciones oxigenadas en su molécula. Esto permite que el análisis de estos lípidos mediante técnicas cromatográficas [cromatografía en capa fina (Jenkins, 1981), cromatografía de gases, etc...] sea útil en la identificación de múltiples especies micobacterianas. Se ha comprobado también que la longitud de las cadenas de ácidos micólicos está íntimamente relacionada con la capacidad de ácido alcohol resistencia.

I.3.3 Características de cultivo

Son microorganismos de crecimiento lento, con una temperatura óptima de crecimiento de unos 37°C, no pigmentados, y aeróbicos o microaerofílicos (según la especie). Como el resto de las micobacterias, son microorganismos ácido-alcohol resistentes, lo cual es aprovechado para la descontaminación de las muestras antes de su siembra. Debido a su lenta velocidad de crecimiento, las micobacterias serían "ahogadas" por el crecimiento de otros microorganismos si las muestras no fueran tratadas para destruir a las bacterias y hongos acompañantes que pueden estar presentes en las muestras que se reciben para cultivo.

Para su aislamiento primario son necesarias entre 3 y 5 semanas, aunque en algunos casos pueda llegar a 4 meses. Se ha comprobado que especies bacterianas con una velocidad de crecimiento mucho más rápida que la de las micobacterias poseen en su genoma múltiples copias de los genes para el ARNr (ARN ribosómico). Bercobier et al. en 1986 determinaron que las especies de micobacterias de crecimiento rápido poseían 2 copias de estos genes mientras que las especies de

crecimiento lento sólo tienen una copia del gen. Para estos autores el bajo número de copias en los genes para el ARNr podría ser la causa de la lenta velocidad de crecimiento.

Estos microorganismos tienen requerimientos nutritivos complejos y por ello necesitan para su cultivo medios enriquecidos.

Se han descrito varios medios de cultivo sólidos para las micobacterias del grupo tuberculoso, todos ellos con formulaciones complejas de nutrientes. Entre ellos se incluyen los medios con base de huevo [Löwenstein-Jensen (Jensen, 1932), Coletsos (Coletsos, 1971), y Stonebrink (Stonebrink, 1958)], y los medios con base de agar; dentro de estos últimos están aquellos enriquecidos con albúmina sérica bovina [Middelbrook 7H10 (Dubos y Middelbrook, 1947), Middelbrook 7H11 (Gallagher y Horwill, 1977)], y aquellos enriquecidos con sangre bovina [B83 (Cousins et al., 1989)].

Parece ser que la albúmina es un componente esencial para el metabolismo de los lípidos en las micobacterias (Davis y Dubos, 1946, 1947), y que el dióxido de carbono tiene un efecto estimulante en el crecimiento de estos microorganismos (Horwitz y Gultiz, 1974).

M. bovis crece pobremente en medios glicerinados (Karlson, 1940) y su crecimiento se inhibe con concentraciones de glicerol superiores al 0,5 % (Runyon, 1970). Sin embargo, se ha comprobado que concentraciones de piruvato sódico entre el 0,2-0,4 % favorecen su crecimiento, al igual que el de *M. africanum* (Cohn et al., 1968). *M. tuberculosis* y *M. microti*, sin embargo crecen mejor en medios suplementados con glicerol (20 ml/l). Estas características tienden a cumplirse, aunque existen cepas que no muestran preferencia por el sustrato (glicerol o piruvato).

..... En cuanto a las características del crecimiento en medios sólidos, *M. bovis* presenta un crecimiento disgónico apareciendo en forma de colonias planas de hasta 3 mm de diámetro, de coloración y aspecto ceroso y con apariencia rugosa de su superficie. *M. tuberculosis* presenta sin embargo un crecimiento eugónico apareciendo en forma de colonias piramidales de gran exuberancia (Royal Commission, 1911). La morfología de las colonias de *M. africanum* y *M. microti* es muy variable entre

cepas. Estas características no son constantes y diferenciar entre especies por ellas es, en la gran mayoría de las veces, inviable.

También se utilizan medios líquidos para el cultivo de estos microorganismos [Kirchner (Mitchison et al., 1973)] y se ha comprobado que el crecimiento se favorece con la agitación de los cultivos (Bowles y Segal, 1965). Además la adición de surfactantes como el Tween 80 (mono-oleato de polioxietilen sorbital) o como el Triton X (fenoxi polietoxietanol) a los medios líquidos, mejora la velocidad de crecimiento ya que previene la agregación de las células (Mallmann y Lippe, 1961).

El sistema líquido de cultivo BACTEC, que utiliza un sustrato (ácido palmítico) marcado radioactivamente con ^{14}C (Park et al., 1984), se ha utilizado con éxito para el cultivo de *M. tuberculosis* a partir de muestras humanas y para el cultivo de *M. bovis* (Neill et al., 1986), *M. paratuberculosis* (Damato y Collins, 1990) y *M. avium* (Weber y Naumann, 1992), a partir de tejidos animales. Este método de cultivo se basa en la medida de la conversión del sustrato marcado en CO_2 marcado, el cual es extraído del vial registrándose su actividad como un índice de crecimiento en una escala numérica.

Han sido descritos procedimientos para la diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, basados en pruebas de inhibición selectiva del crecimiento usando métodos radiométricos (Gross y Hawkins, 1985).

Estos métodos radiométricos requieren un equipo muy costoso, además del manejo de radioisótopos, por lo que su uso está limitado.

I.3.4 Identificación tradicional de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*

La identificación de los aislados micobacterianos se ha basado tradicionalmente en características macroscópicas como velocidad de crecimiento, producción de pigmentos, morfología de las colonias y en pruebas bioquímicas convencionales (Vestal, 1975) tales como producción de niacina, reducción de nitratos, hidrólisis del tween 80, crecimiento en presencia de la hidracida del ácido 2 tiofenocarboxílico (TCH), actividad arilsulfatasa y ureasa.

Las pruebas más útiles en la diferenciación de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum* son: capacidad para la reducción de los nitratos (Virtanen, 1960), preferencia por el oxígeno (aeróbicos o microaerofílicos), susceptibilidad a la TCH (hidracida del ácido 2-tiofenocarboxílico) (Yates y Collins, 1979) y susceptibilidad a la piracinamida (Konno et al., 1967). El comportamiento de las cepas en cada una de estas pruebas se resume en la Tabla 6.

Otra prueba interesante es la producción de niacina (Konno, 1956), la cual es variable en alguna de las cepas y por ello no es tan discriminativa como las anteriores.

El caso de *M. africanum* merece una especial atención, éste fue descrito como una nueva especie por Castets et al. en 1969, estos autores sugerían que se trataba de un grupo fenotípicamente intermedio entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. David et al. en 1978 en un extenso análisis mediante taxonomía numérica de cepas de *M. africanum* procedentes de diversas áreas del continente africano, concluyeron que las cepas africanas no llenaban la discontinuidad fenotípica existente entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, sino que se agrupaban o con el taxón de *M. tuberculosis* o con el de *M. bovis*. Esta similitud con una u otra especie dependía principalmente del origen geográfico de los aislados; de forma que la mayoría de las cepas procedentes del oeste de Africa, se asemejaban a *M. bovis* en sus características fenotípicas, mientras que las cepas de las regiones del este se asemejaban a *M. tuberculosis* (aunque al integrar estas cepas en este taxón se incrementaba considerablemente la heterogeneidad en el mismo). Los mecanismos que originan esta inestabilidad genética en las cepas africanas son aún desconocidos.

La identificación bioquímica es extremadamente lenta y tediosa (puede llevar hasta 3 meses después del aislamiento primario), precisa la obtención de crecimiento suficiente de la cepa a identificar para realizar una batería de pruebas (lo cual no siempre es fácil en especies de crecimiento "fastidioso" como es el caso de *M. bovis*), e implica la utilización de reactivos peligrosos (Ej. bromuro de cianógeno, necesario para la prueba de detección de niacina).

TABLA 6. Diferenciación de especies del complejo *M. tuberculosis*.

Especie	Variedad	TCH	NO ₃	O ₂	PZA
<i>M. tuberculosis</i>	Humana clásica	Res	Pos	Aer	Sens
	Humana Asia	Sens	Pos	Aer	Sens
<i>M. africanum</i>	Tipo I	Sens	Neg	Mic	Sens
	Tipo II	Sens	Pos	Mic	Sens
<i>M. bovis</i>	Bovina clásica	Sens	Neg	Mic	Res
	BCG	Sens	Neg	Aer	Res

TCH: sensibilidad a la hidracida del ácido 2-tiofeno carboxílico

NO₃: capacidad de reducción de los nitratos

O₂: preferencia por el oxígeno (aeróbico o microaerofílico)

PZA: sensibilidad a la pirazinamida.

I.3.5 Determinantes antigénicos

Antígenos (Ag) son aquellas sustancias capaces de inducir una respuesta inmune. Los antígenos micobacterianos pueden ser proteínas, glúcidos, lípidos o combinaciones entre ellos; pueden formar parte de la pared celular, membrana citoplásmica, matriz citoplasmática, ribosomas, metabolitos y enzimas.

Pueden establecerse 4 grupos dentro de los antígenos micobacterianos (Stanford, 1983):

Grupo I. Antígenos comunes a todos los microorganismos pertenecientes al género e incluso a algunos pertenecientes a los géneros *Nocardia* y *Corynebacterium*. Pueden ser proteínas (ribosómicas o del citoplasma), glicolípidos (de la pared celular) o polisacáridos (de la pared celular), siendo estos últimos los más importantes del grupo.

Grupo II. Antígenos comunes a las especies de crecimiento lento (complejos

M. tuberculosis y *M. avium-intracelulare*), aún no han sido atribuidos a ninguna estructura de la bacteria. Son capaces de inducir respuesta inmune de base celular y están presentes en grandes proporciones en los derivados proteicos purificados (PPD) procedentes de los filtrados de los cultivos. Son los responsables de las reacciones cruzadas entre las PPD de *M. avium* y *M. bovis*.

Grupo III. Antígenos comunes a todas las micobacterias de crecimiento rápido.

Grupo IV. Son los antígenos especie-específicos, casi todos ellos son proteínas (Dienna et al., 1968). Son los que más contribuyen a las reacciones de hipersensibilidad retardada y la hipersensibilidad a estos antígenos es responsable del daño tisular.

La mayoría de los antígenos identificados hasta el momento son antígenos compartidos entre todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*. A continuación, y en orden decreciente de peso molecular, se describen los antígenos más representativos encontrados hasta hoy dentro de este complejo:

1) **Ag 71 kDa** (García et al., 1989): se trata de un miembro de la familia de proteínas de respuesta al *stress* térmico hsp70. Las proteínas de *stress* más importantes en el complejo *M. tuberculosis* son el Ag 71 kDa, Ag 65 kDa, Ag 19 kDa y el Ag 12 kDa. Las proteínas de *stress* bacterianas y humanas muestran un alto grado de identidad en sus secuencias y representan una proporción significativa del total de proteínas presente en las células vivas. Su función primaria es actuar como mediadores en la traslocación de otras proteínas dentro de la célula, dada su actividad como proteínas capaces de unir a otras cadenas polipeptídicas. Su síntesis y por consiguiente sus niveles están sujetos a regulación en respuesta a una variedad de estímulos ambientales entre los que destacan los incrementos de temperatura. Se cree que existe una relación entre estas proteínas y la capacidad de supervivencia de las bacterias patógenas dentro de los hospedadores mamíferos.

Parece ser que estas proteínas son inmunógenas durante la infección con bacterias vivas, pero sin embargo no son capaces de inducir respuesta durante la inmunización experimental con bacterias inactivadas o extractos bacterianos (Young

y Garbe, 1991a). El Ag 71 kDa tiene un alto grado de homología con las proteínas hsp70 humanas, y las respuestas inmunes frente al mismo están implicadas en los mecanismos de tolerancia y en la inducción de respuestas autoinmunes asociadas a la infección por micobacterias.

Algunos autores han comprobado que estas proteínas, en especial el Ag 71 kDa, son capaces de actuar como portadores de otros antígenos para la inducción de la formación de Ac frente a antígenos sintéticos en ausencia de adyuvantes, esta estrategia de vacunación puede ser utilizada en humanos (Perraut et al., 1993).

2) **Ag 65 kDa** (Thole et al., 1988): se trata de una proteína inmunodominante expresada en *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. leprae*. Estudios sobre secuenciación de los genes en las tres especies, muestran que la proteína es idéntica en las dos primeras y que hay una diferencia en 24 aminoácidos para la proteína de 65 kDa de *M. leprae*. La secuenciación posterior de los genes para esta proteína en otras especies micobacterianas muestran altas homologías entre ellas aunque se han podido detectar secuencias especie específicas dentro del gen.

Este antígeno parece jugar un papel dominante en la respuesta inmune a las micobacterias ya que un gran número de clones murinos de linfocitos T así como de Ac monoclonales murinos reaccionan con ella. Se ha comprobado que en un alto porcentaje de individuos inmunizados o infectados por micobacterias se detectan tanto Ac como células T reactivas frente al Ag 65 kDa, y que en un cierto número de individuos sanos existen respuestas tanto humorales como celulares frente a este Ag.

Parece claro que en las diferentes PPDs, así como en un gran número de micobacterias estudiadas, existen antígenos que muestran reacciones cruzadas con algunos Ac monoclonales frente al Ag 65 kDa. Este Ag es miembro de una familia de proteínas antigénicamente relacionadas (antígeno común) presente en más de 50 especies bacterianas, y parece ser que este Ag común juega un importante papel en la estabilidad del ARNm y en la regulación de la respuesta bacteriana al *stress* ambiental. De Bruyn et al. en 1989 encontraron que los niveles secretados de esta proteína se incrementaban considerablemente cuando las micobacterias eran cultivadas en medios deficientes en Zn^{2+} .

Varios autores han demostrado que el Ag 65 kDa de *M. tuberculosis* es reconocido específicamente por Ac anti-lactoferrina humana (Esaguy et al., 1991). La existencia de estas reacciones cruzadas podría intervenir en la formación de autoanticuerpos y de inmunocomplejos frecuentes durante la enfermedad y responsables de daños tisulares. La aparición de esta reactividad cruzada persiste durante algún tiempo después de la muerte de la micobacteria en el hospedador. En 1993, Peetermans et al. demostraron que el Ag 65 kDa es capaz de activar a los macrófagos peritoneales murinos, de forma que su capacidad microbicida *in vitro* se ve incrementada considerablemente, inhibiendo la proliferación intracelular de diversos patógenos.

3) **Ag 60** (Cocito y Vanlinden, 1986): este Ag es el principal componente inmunógeno termoestable de las PPDs. Se trata de un complejo lipopolisacárido-proteína encontrado en el citoplasma micobacteriano, está presente no sólo en el género *Mycobacterium* sino también en géneros relacionados como *Corynebacterium* y *Nocardia*. Este Ag es altamente inmunogénico y se ha comercializado un ELISA (Anda Tb, Anda Biologicals) para la detección de IgGs frente al mismo aunque con resultados poco esperanzadores.

4) **Ag 39 kDa o Ag 5** (Daniel y Anderson, 1978): se trata de una glicoproteína muy relacionada con el Ag 38 kDa, es específico para *M. tuberculosis* y *M. bovis*, aunque se ha visto que no es más específico en la inducción de hipersensibilidad retardada que la PPD.

5) **Ag 38 kDa, proteína b o Pab** (Young et al., 1986): es una lipoproteína (Young y Garbe, 1991b) específica de *M. tuberculosis* y *M. bovis* que posee un péptido señal, y que es secretada desde el citoplasma de la célula intacta durante los estadios iniciales de la infección. Debido a la existencia de una cola lipídica se la atribuye un papel funcional en el transporte de nutrientes a través de la pared celular (Young y Garbe, 1991b), además está relacionada con el metabolismo del fosfato (Andersen et al., 1990).

Se ha visto que los linfocitos T aislados de animales inmunizados proliferan cuando son cultivados en presencia de Pab purificada (Kadival et al., 1987; Young et al., 1986), y que un alto porcentaje de humanos que sufren tuberculosis activa desarrollan anticuerpos (Ac) anti-Pab.

Esta proteína posee 2 epítomos reconocidos por los Ac monoclonales **TB71** y **TB72**; estos epítomos se expresan mucho más intensamente en *M. tuberculosis* que en *M. bovis* y, **bajo ciertas condiciones**, estos Ac monoclonales pueden diferenciar entre ambas especies (Coates et al., 1981). Estos dos epítomos no se repiten en ninguna otra especie del género *Mycobacterium*. Andersen et al. en 1986 desarrollaron un anticuerpo monoclonal (**HYT 28**) frente a la glicoproteína 38 kDa, el cual era similar al **TB72** desarrollado por Coates et al. en 1981; ambos monoclonales eran de la misma subclase y reaccionaban con la misma proteína, aunque según los hallazgos de Andersen et al., este monoclonal reaccionaba con *M. tuberculosis* y con *M. bovis* BCG con lo cual la especificidad del monoclonal no es exclusiva de *M. tuberculosis* como indicaron Coates et al. Otros estudios (Morris e Ivanyi, 1985) revelaron que los monoclonales TB71 y TB72 no reconocían a *M. bovis* cuando el antígeno era fijado en la placa en solución acuosa (fijación húmeda) y sin embargo, sí que era reconocido cuando el antígeno era fijado sin solución acuosa (fijación seca).

Kadival y Chaparas en 1987 demostraron que el Ag 38 kDa contiene epítomos específicos (para *M. tuberculosis* y *M. bovis*) detectables por serología, pero que también posee epítomos no específicos que muestran reacciones cruzadas con otras micobacterias (*M. intracelulare*, *M. kansasii*) en pruebas para la inmunidad celular.

La especificidad de esta proteína para las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* fue estudiada por PCR (Sjöbring et al., 1990).

6) **Ag 32 kDa, P32 o Ag 85 A** (Borremans et al., 1989): se trata de una proteína abundantemente secretada en el sobrenadante de los cultivos de una amplia variedad de micobacterias, y parece ser un importante estimulador de la inmunidad celular y humoral. Es una proteína muy inestable y por ello su concentración es mayor en los sobrenadantes de los cultivos jóvenes, De Bruyn et al. en 1989 demostraron un incremento en el nivel de secreción de esta proteína cuando los cultivos se realizaban

en condiciones de deficiencia de Zn^{2+} . Estudios sobre las secuencias de ADN para este Ag muestran un 73.8 % de homología con el Ag alfa o MPB 59 o Ag 85 B (Wiker et al., 1986).

En un 70 % de los pacientes tuberculosos se encuentran niveles altos de IgG frente al Ag 32 kDa; además esta proteína también induce respuesta específica en los ensayos de proliferación de linfocitos y producción de interferón en individuos tuberculosos o PPD positivos. En varios estudios se ha constatado que esta proteína posee una marcada capacidad para estimular a las células T (Andersen et al., 1991b).

Mediante la amplificación de un segmento del gen que codifica para esta proteína se ha comprobado su especificidad para el género *Mycobacterium* y se ha detectado su presencia en todas las especies de micobacterias estudiadas, excepto en algunas cepas de *M. avium*, *M. gordonae*, *M. malmoense* (Soini et al., 1992).

7) **Ag 30 kDa, MPB 59, Ag alfa o Ag 85 B** (Wiker et al., 1986): es una proteína que muestra una alta homología con la anterior, aunque existen suficientes diferencias en su secuencia como para originar variabilidad antigénica entre ambas. Este Ag es también muy inestable y se secreta activamente al medio. Está presente en un amplio espectro de especies del género, de forma que estudios mediante amplificación de un segmento de este gen (Fauville-Dufaux et al., 1992) han puesto de manifiesto su presencia en una amplia gama de especies excepto en algunas cepas de *M. xenopi* y *M. chelonae*.

Se ha comprobado que el complejo antigénico 85 tiene un gran papel en la alta afinidad de las micobacterias por la fibronectina (Abou-Zeid et al., 1988)

8) **Ag 85 C** (Abou-Zeid et al., 1991): Nagai et al. en 1991 demostraron la existencia de una familia de proteínas secretadas durante los primeros días de cultivo a la que se conoce como complejo del antígeno 85. Este grupo de proteínas constituye aproximadamente el 20-30 % de las proteínas en los sobrenadantes de los cultivos jóvenes, y se encuadran dentro de un intervalo de pesos moleculares entre 30-32 kDa. El complejo comprende, al menos, 3 componentes estrechamente relacionados, los ya descritos 85 A, 85 B y el 85 C. Todos ellos presentan en sus genes una secuencia que

codifica para un péptido señal que está ausente en la proteína madura. Además de las tres fracciones citadas, se ha descubierto la existencia de una proteína de 55 kDa también con alta afinidad por la fibronectina y que pudiera pertenecer a la misma familia (Abou-Zeid et al., 1991).

El mayor interés de este complejo de antígenos es su capacidad para unirse a la fibronectina, actuando como mediadoras en la adhesión de las micobacterias a las superficies tapizadas por este compuesto. Esta propiedad es de gran importancia en la patogenia promoviendo la adherencia a superficies mucosas, alterando las funciones de los macrófagos y alterando las interacciones con la matriz extracelular (Abou-Zeid et al., 1991).

El complejo del antígeno 85 ha sido descrito como una diana importante en las respuestas humoral y celular (Rumschlag et al., 1988). El hecho de que existan múltiples genes involucrados en la expresión de varias proteínas estrechamente relacionadas, sugiere la posibilidad de que esta familia posea una función esencial para la supervivencia de las micobacterias.

9) **Ag 29,8 kDa** (Morris et al., 1985): se trata de un Ag presente en los extractos de *M. bovis* pero no en los de BCG, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. avium* y *M. paratuberculosis*. Morris et al. en 1985 desarrollaron, frente a esta proteína, un Ac monoclonal (**MB5**) especie-específico para *M. bovis*. El epítipo identificado por **MB5** no fue detectado en preparaciones de PPD. Este epítipo especie específico no ha sido aún utilizado en ensayos serológicos para identificación de animales infectados por *M. bovis*.

10) **Ag 24 kDa o MPB 64** (Yamaguchi et al., 1989): es una proteína inmunogénica que se encuentra específicamente en filtrados de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* no tratados con calor. Andersen et al. en 1991a mostraron que se trata de una proteína excretada que se produce en grandes cantidades durante los primeros días de cultivo y que se acumula en el medio, pero que en el bacilo está presente sólo en trazas. Existen diferencias en los niveles de producción de esta proteína de unas cepas a otras.

Esta proteína induce una fuerte reacción de hipersensibilidad retardada en individuos sensibilizados frente a *M. tuberculosis* o *M. bovis* pero no frente a otras micobacterias. La inmunización con MPB64 induce una rápida producción de Ac y no se han observado reacciones cruzadas con otras 6 especies micobacterianas diferentes de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, aunque si con *Nocardia asteroides*.

Su especificidad para la especie del complejo *M. tuberculosis* ha sido comprobada mediante PCR por varios autores (Shankar et al., 1991; Cormican et al., 1992; Manjunath et al., 1991).

11) **Ag 22 kDa, MPB70, MPB80 o proteína P2** (Nagai et al., 1981): es una proteína termoestable aislada a partir de filtrados de cultivos de *M. bovis* BCG, y representa más del 10 % de las proteínas secretadas al medio por esta bacteria.

Según este estudio, la proteína no contiene ningún grupo glucídico y se trata de un antígeno especie específico para *M. bovis* BCG en la producción de reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada. Reich et al. en 1982 aislaron y caracterizaron a partir de filtrados de cultivos de *M. tuberculosis*, una proteína de 22 kDa (P2) de propiedades semejantes a la MPB70 y que era el antígeno más inmunológicamente reactivo de los filtrados. Miura et al. en 1983 demostraron que MPB70 era capaz de inducir reacciones de hipersensibilidad retardada sólo en aquellos animales previamente inmunizados con células vivas de BCG pero no en aquellos inmunizados con células inactivadas por calor.

Se ha comprobado que este Ag es secretado por las cepas de *M. bovis* BCG, *M. bovis* y *M. tuberculosis* (Harboe y Nagai, 1984), su tamaño es de unos 18-23 kDa y se trata de un antígeno predominante en las preparaciones de PPD bovina, capaz de inducir respuestas humorales y celulares durante la inmunización experimental. En este mismo estudio se demostró que existen marcadas diferencias entre cepas en la producción de esta proteína, observándose que *M. tuberculosis* y ciertas cepas de *M. bovis* BCG producen cantidades muy pequeñas de la misma. En distintas pruebas realizadas, no se encontraron reacciones cruzadas con otras micobacterias pero si con *Nocardia asteroides*.

Un análisis mediante anticuerpos monoclonales ha mostrado que MPB70

contiene, al menos, 3 epítomos especie-específicos para *M. bovis* y *M. bovis* BCG (Wood et al., 1988). Corner et al. en 1988 describieron una técnica rápida de inmunoperoxidasa en porta para la identificación de aislados del complejo *M. tuberculosis* mediante el uso de un Ac monoclonal (4C3/17, Agen Biochemical Ltd.) frente a esta proteína.

El ganado infectado por *M. bovis* a menudo muestra respuesta serológica a MPB70, además se trata de un potente estimulador de las células T en estos animales. Cuando se utilizó MPB70 como Ag en un ELISA para el diagnóstico de infecciones por *M. bovis*, la especificidad encontrada fue mucho mayor que al usar filtrados de cultivo, aunque la sensibilidad encontrada fue menor (debido a que sólo una fracción de los Ac en el suero de un animal infectado están dirigidos contra este Ag) (Fifis et al., 1989). Radford et al. en 1990 describieron los anticuerpos monoclonales SB9 y SB10 específicos para *M. bovis* y que reconocen epítomos diferentes dentro de la proteína MPB70. Aún queda por comprobar si estos epítomos especie específicos son reconocidos por los sueros de animales infectados.

El hecho anteriormente mencionado de que las cepas de *M. tuberculosis* y ciertas cepas de *M. bovis* BCG sólo producen esta proteína en pequeñas cantidades podría explicar el bajo número de reacciones cruzadas entre ambas especies con el uso de Ac monoclonales. Además estas diferencias en la producción explicarían porqué ninguno de los Ac monoclonales producidos para *M. tuberculosis* parecen reconocer a la proteína MPB70, ya que las cepas usadas en la inmunización son poco productoras de este antígeno.

El gen que codifica para MPB70 fue clonado y secuenciado por Radford et al. en 1988 y la especificidad del mismo fue estudiada mediante amplificación por PCR encontrándose sólo en los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Cousins et al., 1991). Recientemente (Hewinson y Russel, 1993) se ha conseguido la producción en *E. coli* de MPB70 recombinante, lo cual facilita su obtención a gran escala para poder ser utilizado en estudios serológicos.

12) Ag 19 kDa (Ashbridge et al., 1989): se trata de un antígeno específico de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, aunque existe reacción cruzada con *M.*

kansasii. Es una proteína de *stress* no relacionada con ninguna otra proteína de este tipo conocida hasta ahora (Collins et al., 1990). Este Ag es capaz de inducir la proliferación de linfocitos T en ratones inmunizados con bacterias inactivadas (Andersen et al., 1991b). Young et al. en 1991 demostraron que esta proteína lleva asociada una cola lipídica, y que como lipoproteína, juega un importante papel en la activación de las respuestas humorales y celulares; además parece estar implicada en los mecanismos de transporte de nutrientes a través de la pared celular.

13) Ag 14 kDa o mtp40 (Parra et al., 1991): este antígeno fue descrito como una proteína codificada por un gen presente sólo en *M. tuberculosis* y no en *M. bovis* o BCG. La proteína posee epítomos B y T y dada su especificidad, podría ser útil en la elaboración de pruebas serológicas para el diagnóstico de la tuberculosis humana (Falla et al., 1991).

14) Ag 12 kDa o MPB57 (Harboe et al., 1986): se trata de un Ag presente en los sobrenadantes de cultivos y en sonicados celulares. Parece ser un Ag específico del complejo *M. tuberculosis* ya que posee ciertos epítomos que son sólo reconocidos por sueros de pacientes humanos enfermos de tuberculosis (Verbon et al., 1990).

I.3.6 Características del genoma.

Las micobacterias incluidas en el complejo *M. tuberculosis* presentan un contenido G+C del 65 % (Bradley, 1972) y su genoma tiene un tamaño de 2,5 a $2,8 \times 10^9$ Daltons (Bradley, 1973). Como se comentó anteriormente, entre todas ellas existe un alto porcentaje de homología ADN-ADN (Imaeda, 1985).

Las secuencias de los genes que codifican para el **ARN ribosómico (ARNr)** están altamente conservadas entre los procariotas y han sido utilizadas para establecer relaciones filogenéticas entre numerosas especies bacterianas (Woese et al., 1983). Se ha comprobado que especies bacterianas con una velocidad de crecimiento mucho más rápida que la de las micobacterias poseen en su genoma múltiples copias

de los genes para el ARNr. Bercobier et al en 1986 determinaron que las especies de micobacterias de crecimiento rápido poseían 2 copias de estos genes mientras que las especies de crecimiento lento sólo tienen una copia del gen. Para estos autores el bajo número de copias en los genes para el ARNr podría ser la causa de la lenta velocidad de crecimiento.

El análisis comparativo de las secuencias de los genes para el ARNr ha puesto de manifiesto que existen zonas con secuencias altamente conservadas y otras zonas con una alta variabilidad (Woese, 1987), lo cual puede ser aprovechado para la identificación de especies bacterianas. Varios grupos han determinado las secuencias de nucleótidos del gen para el ARNr 16S en numerosas especies de micobacterias (Böddinghaus et al., 1990; Rogall et al., 1990). Estas secuencias han revelado que las especies de crecimiento lento y de crecimiento rápido están separadas filogenéticamente, aunque todas ellas se integren en el grupo de los actinomicetales, no existiendo diferencias en las secuencias encontradas para los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Rogall et al., 1990a y b).

El orden de los genes ARNr en las micobacterias es -5'-16S-23S-5S-3'- ; las especies de crecimiento lento tienen un único operón ARNr, el cual se transcribe como una unidad que posteriormente se procesa en ARNr 16, 23 y 5S. Como ya se indicó, el gen ARNr 16S (ADN ribosómico) ha sido ampliamente utilizado para análisis filogenéticos a niveles de género y de especie. Sin embargo el espaciador interno transcrito (ITS) entre el ADNr 16S y el ADNr 23S, es una zona mucho más variable que la región hipervariable del ADNr 16S, y se han descrito sus secuencias para numerosas especies micobacterianas. Aún existiendo esta gran variabilidad entre especies, las secuencias de los ITS son idénticas en todas las especies del complejo *M. tuberculosis* (Fröthingham et al., 1994).

Estudios realizados sobre la organización de los genes para el ARN de transferencia (ARNt) han demostrado que la organización de estos genes es idéntica en todas las especies del complejo *M. tuberculosis* (Bhargava et al., 1990).

I.4 NUEVOS CONCEPTOS SOBRE LA INFECCIÓN POR *M. bovis*.

I.4.1 Epidemiología

I.4.1.1 Espectro de hospedadores y transmisión de la infección.

M. bovis posee uno de los más amplios espectros de hospedadores entre los patógenos conocidos, la epidemiología de esta infección es muy compleja y engloba interacciones entre el hombre, animales domésticos y animalés salvajes. Entre los posibles hospedadores de esta especie se encuentran el hombre, los primates no humanos, vaca, cabra, oveja, cerdo, jabalí, caballo, asno, gato, perro, ciervo, bisonte, búfalo, antílope, oryx, camello, llama, alpaca, reno, tejón, opossum, liebre, conejo, hurón, feneco, elefante, jirafa, rinoceronte, tigre, león, foca etc...

En el **ganado bovino**, los resultados de infecciones experimentales por las vías respiratoria y digestiva, junto a la distribución de las lesiones encontradas en el ganado naturalmente infectado, muestran que aproximadamente un 80-90% del ganado se infecta por inhalación (Francis, 1947; Pritchard, 1988). Incluso en terneras ésta es la vía más importante, aunque existe un grupo de animales que puede ser infectado por vía digestiva. Parece ser que, aunque un número relativamente alto de bacilos se eliminan por las heces (con la consiguiente contaminación de los pastos), las terneras que pastan en estos campos no suelen contraer la infección hasta que no son estabuladas, momento en que la transmisión por vía aerógena cobra mayor importancia.

Varios estudios clásicos realizados con infecciones experimentales apoyan también esta teoría, y se ha comprobado que mientras que bastan unos pocos bacilos para producir la infección por vía respiratoria, se necesitan varios miles de millones de ellos para hacerlo por vía oral (McFadyean, 1910; Chausé, 1913).

La lesión más frecuentemente encontrada es un foco bronconeumónico en pulmón y lesión en el ganglio linfático correspondiente (complejo primario). La forma en que se desarrollan las lesiones en los linfonódulos retrofaríngeos es aún

desconocida; Thoen y Himes en 1986a y b, propusieron la teoría de que estas lesiones podrían deberse a la inhalación de bacilos que no penetran en el tracto respiratorio inferior y que empiezan a multiplicarse en la orofaringe, la cual drena en los retrofaríngeos.

Tradicionalmente, y de un modo erróneo, se ha considerado que sólo excretan *M. bovis* aquellos animales con lesiones en pulmón claras y evidentes. Al contrario, se ha comprobado que los animales en las primeras fases de la enfermedad y antes del desarrollo de lesiones visibles, contribuyen notablemente a la producción de aerosoles infectivos (McIlroy et al., 1986; Neill et al., 1988). Neill et al. en 1991 y 1992 comprobaron que existe una relación inversamente proporcional entre la dosis infectante y el tiempo que transcurre hasta la liberación por vía respiratoria de *M. bovis*, y que en las infecciones naturales la eliminación de bacilos comienza a los 87 días de la infección, ocurriendo en algunos casos en ganado negativo a la tuberculina.

Como resumen podría comentarse que aunque en el pasado las vías de transmisión oral y genital pudieron tener importancia epidemiológica, desde el establecimiento de los programas de erradicación la vía dominante de transmisión es la aerógena (Morris et al., 1994).

Ciertos estudios parecen demostrar que dentro del ganado bovino existen variaciones en la resistencia a la tuberculosis, de forma que las razas africanas y asiáticas (zebús) son más resistentes a la enfermedad que el ganado europeo (Carmichael, 1939, 1941).

Las principales características de la infección por *M. bovis* en el **hombre** fueron comentadas con anterioridad.

En el caso de los **primates no humanos** hay que señalar que son igualmente susceptibles a la infección por *M. bovis* y *M. tuberculosis*, habiéndose también notificado infecciones por *M. africanum*. La infección aparece raramente en animales en libertad, aunque existen comunicaciones de casos ocurridos por ingestión de carcasas procedentes de ganado tuberculoso (Tarara et al., 1985). Sin embargo, en

cautividad la incidencia de tuberculosis en estos animales es extremadamente alta y han sido comunicados varios brotes de enfermedad en zoológicos (Wilson et al., 1984) y animalarios (Thoen et al., 1977a y b), jugando la vía de transmisión aerógena un importante papel. Ha sido señalado que las especies del "Nuevo Mundo" son más resistentes a la enfermedad que las del "Viejo Mundo".

El **ganado caprino** es muy susceptible a la tuberculosis. Aunque en un estudio sobre morfopatología de las lesiones presentadas por estos animales se concluyó que eran similares a las encontradas en ganado bovino (Bernabé et al., 1991), en nuestra experiencia son lesiones mucho más caseificadas y con un menor número de bacilos ácido-alcohol resistentes detectables por microscopía. Un estudio posterior reveló también diferencias histológicas entre las lesiones encontradas en caprinos y bovinos (Gutiérrez y García Marín, 1993). La prevalencia de la enfermedad es desconocida en la mayoría de los países ya que sólo se han realizado estudios aislados sobre la misma. En el caso de España, se cree que la prevalencia es bastante elevada en varias regiones (Murcia, Cataluña, Levante, Madrid) y se ha comprobado que las cepas de *M. bovis* involucradas en este problema forman un conjunto genéticamente homogéneo y diferente del constituido por las cepas bovinas. La importancia de este ganado en el mantenimiento y transmisión de la tuberculosis bovina está aún por determinar.

Varios autores reconocen que el **ganado ovino** es muy susceptible a la infección vía respiratoria por *M. bovis* (Cordes et al., 1981). Aún así esta enfermedad se ha considerado como rara en los ovinos, y la mayoría de las comunicaciones de la misma han sido de casos aislados. Parece ser que las razones de esta aparente contradicción son, por una parte, la naturaleza de los sistemas de explotación de este ganado que limita el contacto con bovinos infectados, y por otra parte, su particular comportamiento "desconfiado" que hace improbable el contacto con reservorios moribundos o sus cadáveres (Morris et al., 1994). Otro factor que puede contribuir a la escasa notificación de casos en esta especie es que las lesiones que presentan son muy similares a las de una linfadenitis caseosa y los bacilos ácidoalcohol resistentes

son muy escasos y difíciles de encontrar (Cordes et al., 1981).

El **cerdo** es susceptible a la infección por *M. bovis* y los niveles de la enfermedad en estos animales generalmente son reflejo de los existentes en el ganado bovino. La transmisión habitualmente ocurre por vía digestiva por el consumo de leche, restos de matadero o heces de bovinos infectados. La transmisión entre cerdos es muy poco importante ya que las lesiones suelen ser localizadas y los animales se suelen sacrificar a una edad temprana (Morris et al., 1994). Se han encontrado casos de tuberculosis en nuestro país en **jabalíes**, los cuales presuntamente contrajeron la enfermedad por ingestión de cadáveres de bovinos tuberculosos.

La infección en **caballos y asnos**, aunque posible, es poco frecuente, cursa con una mortalidad muy elevada y las lesiones son de aspecto tumoral (O'Reilly y Daborn, 1995).

La tuberculosis en el **perro** y en el **gato** puede estar producida indistintamente por *M. bovis* o por *M. tuberculosis* (Aranaz et al., 1996), aunque parece que los gatos son mas susceptibles al primero y los perros más al segundo. La infección es adquirida tanto por vía digestiva como aerógena. Estos animales pueden tener importancia como reveladores precoces de la tuberculosis humana y como reservorios de *M. bovis* para el ganado bovino y para el hombre.

La tuberculosis producida por *M. bovis* es una enfermedad frecuente en los **cérvidos**. La distribución de las lesiones en estos animales sugiere que tanto la vía respiratoria como la digestiva son importantes en la transmisión de la enfermedad (Morris et al., 1994). Parece ser que el ciervo es más susceptible a la infección por *M. bovis* que los bóvidos, y en ellos es típica la formación de lesiones extensivas de desarrollo rápido, a menudo con formación de abscesos. Esta situación origina un aumento de la probabilidad de la transmisión del agente en un rebaño y constituye un riesgo para otros animales y para el hombre (Clifton-Hadley y Wilesmith, 1991). La enfermedad constituye un importante problema económico y sanitario en los

rebaños de ciervos domésticos en Nueva Zelanda, Dinamarca y Reino Unido, países en los que se lleva a cabo un programa de erradicación de la enfermedad. También presenta importancia en los rebaños de Canadá y U.S.A., originando problemas en los esquemas de erradicación de la tuberculosis bovina. En varias ocasiones se ha descrito la transmisión de *M. bovis* desde los ciervos al hombre (Fanning y Edwards, 1991), al ganado bovino (O'Reilly y Daborn, 1995), a tejones (Bouvier et al., 1957) y a opossums (Morris et al., 1994).

La tuberculosis bovina es una enfermedad endémica en las poblaciones de búfalos del norte de Australia (Hein y Tomasovic, 1981), ha sido también descrita en búfalos en Uganda (Woodford, 1982), Sudáfrica, Egipto e India (O'Reilly y Daborn, 1995). Las lesiones encontradas en estos animales afectaron a los órganos torácicos, lo cual parece sugerir que la vía principal de transmisión en estos animales es la vía aerógena. La razón para este hecho la constituye los hábitos de comportamiento de estos animales que deambulan en grandes rebaños con una alta densidad de animales. Una situación similar ocurre en las poblaciones de bisontes de Canadá y Estados Unidos (Tessaro et al., 1990), con el consiguiente riesgo de transmisión al ganado.

La familia de los *Camelidae* (camellos, dromedarios, llamas, alpacas, vicuñas) y otros ruminantes exóticos (antílope, oryx, etc...) son también susceptibles a la infección por *M. bovis* y constituyen un riesgo potencial para la transmisión del agente al ganado bovino, por ello se recomienda limitar al máximo el contacto entre especies y extremar las medidas de cuarentena en las importaciones de estos animales (O'Reilly y Daborn, 1995).

La primera comunicación de infección por *M. bovis* en tejones se produjo en Suiza (Bouvier et al., 1957). Aunque esta especie está ampliamente distribuida en el continente europeo, no parece presentar problemas a los esquemas de erradicación de la tuberculosis salvo en el Reino Unido e Irlanda, países en los que la tuberculosis es endémica en las poblaciones de tejones. En estos dos países el tejón actúa como un

excelente reservorio para *M. bovis*; los tejones son animales que pueden vivir largo tiempo bajo los efectos de la infección tuberculosa sin que la estructura de sus poblaciones se afecte sustancialmente, de forma que *M. bovis* puede persistir en ellos en ausencia de fuentes externas de contagio. Parece ser que la vía principal de transmisión entre tejones es la vía aerógena, y que principalmente ocurre en forma de transmisión pseudovertical postnatal desde las hembras a sus crías (Wilesmith, 1991). También tiene importancia la transmisión entre machos en épocas de combates en las que el agente se transmite por mordeduras y por vía aerógena.

Hay evidencias de que el riesgo de transmisión de *M. bovis* al ganado tiene un carácter estacional, siendo la primavera la época de mayor riesgo. Esto se debe a una mayor actividad de las poblaciones de tejones y a la existencia de hembras lactantes que desarrollan enfermedad activa después del *stress* del invierno. En cuanto al modo de transmisión de la enfermedad al ganado, existe cierta controversia, se ha comprobado que las lesiones encontradas en los tejones afectan principalmente al pulmón y a los ganglios torácicos, aunque cuando se produce una diseminación hematogena, el lugar afectado con mayor frecuencia es el riñón (aproximadamente un 37% de los tejones tuberculosos excretan *M. bovis* en orina). Algunos autores piensan que la contaminación urinaria de los pastos y el consumo de los mismos por el ganado es la causa de la transmisión. Sin embargo otros proponen que debido al escaso período de supervivencia de *M. bovis* en el medio externo, la vía más importante de transmisión debe ser la respiratoria y que se produce por un comportamiento anormal de los tejones en estado terminal y por la "curiosidad" exhibida por el ganado vacuno hacia los mismos o sus cadáveres. Estos autores sugieren que incluso en los casos en los que el vehículo de la infección es la orina, la transmisión ocurre por inhalación de microgotas de los pastos recientemente contaminados e incluso por inhalación de aerosoles ruminales después de la ingesta de los mismos (Morris et al., 1994; O'Reilly y Daborn, 1995).

El caso de los **opossums** es similar al del tejón aunque con ciertas diferencias, estos animales han originado la imposibilidad de completar la erradicación en Nueva Zelanda, a pesar de los enormes esfuerzos destinados a ello. El opossum sufre una

enfermedad progresiva e invasiva característica de una pobre respuesta inmunológica. Las lesiones extensivas en pulmón son la tónica dominante, mientras que la excreción renal o fecal parece no tener importancia. Los principales mecanismos de transmisión de la enfermedad entre opossums son la transmisión aerógena pseudovertical y la transmisión aerógena horizontal en las épocas de apareamiento. La transmisión al ganado se realiza principalmente por contacto de los mismos con animales moribundos o sus cadáveres (Morris et al., 1994).

Existen otros animales (principalmente mustélidos, liebres etc...) que pueden infectarse por *M. bovis* al consumir animales afectados o sus cadáveres, suelen ser predadores o carroñeros y su capacidad para transmitir la infección a otros animales es limitada.

I.4.1.2 Supervivencia del microorganismo

Aunque *M. bovis* es un patógeno obligado, puede sobrevivir durante largos períodos de tiempo si las condiciones ambientales son favorables. Los principales factores que influyen en esta capacidad de supervivencia son: temperatura, humedad, pH, tensión de oxígeno, exposición a la luz solar, disponibilidad de nutrientes, microflora existente y localización en el ambiente. En 1994, Morris et al. en una revisión de la literatura sobre este tema, indican que la duración de la infectividad de *M. bovis* en pastos, orina y heces debe medirse en **semanas** y no en meses, ya que bajo las mismas condiciones, los microorganismos existentes en el material contaminado de forma natural mueren mucho más rápidamente que los presentes en el mismo tipo de material pero contaminado experimentalmente. Si se contaminan heces o suelo estéril con *M. bovis* y se almacenan protegidos de la luz, los microorganismos pueden sobrevivir varios meses. Sin embargo, a medida que las condiciones ambientales se acercan a las naturales, el tiempo de supervivencia disminuye considerablemente. Estos hechos, unidos a la elevada dosis infectiva que se requiere para producir infección vía oral, hacen pensar que la importancia real de la existencia de productos contaminados en el medio ambiente es menor de lo que

se había considerado tradicionalmente.

En el caso de los cadáveres de animales infectados, la supervivencia de *M. bovis* depende del grado de putrefacción de los mismos y por lo tanto de la temperatura ambiente y grado de humedad. Little et al. en 1982 demostraron que el aislamiento de *M. bovis* a partir de cadáveres de tejones podía conseguirse después de 2 semanas (cadáveres en la superficie de los pastos) o de 6 semanas (cadáveres enterrados) de la muerte del animal. Pfeiffer y Morris en 1991 fueron capaces de recuperar *M. bovis* a partir del interior de cadáveres secos con, al menos, un mes de antigüedad. Estos cadáveres son pues, fuente de infección para los carroñeros y para el ganado que pasta en sus proximidades.

En resumen puede concluirse que, en ausencia de reservorios salvajes, la tuberculosis bovina es una enfermedad controlable y el éxito de su control está determinado por los hábitos de comportamiento de ganaderos y tratantes de ganado, y por el ganado en sí mismo. La existencia de pruebas con una sensibilidad adecuada que se apliquen con un intervalo menor de un año, la inmediata eliminación de los animales positivos a las mismas, y la instauración de una política de seguimiento estricta han permitido la erradicación de la enfermedad en varios países. Hay que destacar que el movimiento de ganado entre rebaños y la actitud de los ganaderos ante el saneamiento, son los factores más importantes que condicionan el éxito o fracaso del control.

Merece especial atención el caso del ciervo, en el cual parece darse una elevada tasa de transmisión de la enfermedad tanto entre ciervos, como entre éstos y otras especies, por lo que merecen una atención especial en los programas de erradicación. Una situación similar podrían representarla las cabras en nuestro país, aunque esta teoría está aún por confirmar.

La situación es completamente diferente cuando existe un reservorio salvaje. Para que una especie sea considerada como un reservorio, debe existir transmisión y mantenimiento de *M. bovis* dentro de esa especie y transmisión desde la misma al ganado. En estos casos la dificultad de controlar a las poblaciones salvajes y el conocimiento incompleto de sus cadenas epidemiológicas, hacen que la erradicación

de la tuberculosis bovina en esas áreas sea prácticamente inviable. Hasta el momento existen varios reservorios reconocidos (tejón, opossum, algunos ungulados) en los que la vía principal de transmisión intra e inter-específica es la vía respiratoria. Además existe una larga lista de posibles hospedadores salvajes de *M. bovis*, y debido a que la tuberculosis no es una enfermedad estática, deberíamos preguntarnos si en un futuro esta infección no se hará endémica en un espectro dinámico de hospedadores salvajes. Por ello los programas de control deben poner un especial interés en limitar al máximo los posibles contactos de estos hospedadores con ganado afectado (Morris et al., 1994).

I.4.2 Patogenia: importancia de los factores de virulencia y del sistema inmune.

La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica, casi siempre progresiva y que en los casos avanzados, cursa con un estado de debilidad extrema y muerte. Para comprender los mecanismos implicados en la patogenia es necesario tener en cuenta aspectos como el de las **fuentes y vías de infección, factores de virulencia intrínsecos del microorganismo y la respuesta inmune por parte del hospedador.**

Aunque la virulencia ha sido una propiedad tradicionalmente atribuida a propiedades intrínsecas del bacilo tuberculoso, la patogenia de esta enfermedad se debe en su mayor parte a una serie de complejas interacciones entre el hospedador y la bacteria.

El estudio de los **FACTORES DE VIRULENCIA** en *M. bovis* es muy difícil debido a que su velocidad de crecimiento es extremadamente lenta, y a que en estas cepas los procesos de recombinación homóloga son o muy escasos o inexistentes.

La clave de la virulencia de *M. tuberculosis* o de *M. bovis* es su **capacidad de multiplicarse dentro de los monocitos o de los macrófagos.** Aún no existen pruebas convincentes de la existencia de factores de invasión o "invasinas" que permitan a estos patógenos entrar activamente en un fagocito, aunque esta idea no está descartada.

Uno de los factores de virulencia que permiten a *M. tuberculosis* sobrevivir en los macrófagos es su capacidad de **impedir la acidificación de los fagosomas** mediante una actividad ATPasa (la acidificación inhibe la multiplicación bacteriana y es un paso indispensable en la fusión lisosoma-fagosoma y en la activación de los factores bactericidas liberados durante la misma) (Crowle, 1991).

Varios autores han sugerido la posibilidad de que los **complejos glicolípidos** de la pared celular de estas micobacterias, actúen protegiéndolas de los efectos bactericidas de los derivados de oxígeno activados que se producen en los fagolisosomas (Lowrie y Andrew, 1988).

Por último existen autores que sugieren la existencia de factores de virulencia

capaces de **inhibir la fusión fagosoma-lisosoma**, o bien que permiten a las bacterias atacar la membrana del fagosoma permitiendo su liberación al citoplasma (Grange, 1985). Recientemente se ha clonado un gen cuya secuencia es muy similar a la del gen de la **hemolisina** de *Listeria monocitogenes* y que pudiera estar implicado en los mecanismos que utiliza la bacteria para escapar de las vesículas fagocíticas (Salyers y Whitt, 1994).

Aunque *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir en el interior de macrófagos "en reposo", estas bacterias son destruidas por los macrófagos activados. Otro tipo de factores de virulencia serían pues, aquellos responsables de **evitar la acción de los macrófagos activados**. Como será comentado más adelante, la producción de GIFN (gamma interferón) por parte de los linfocitos T estimulados es uno de los factores esenciales para la activación de los macrófagos; ha sido demostrado que el **lipoarabinomanano** (LAM, glicolípido de la pared celular) producido por *M. tuberculosis* suprime la proliferación de los linfocitos T y bloquea la activación transcripcional de genes inducibles por el GIFN, impidiendo así la activación de los macrófagos (Ellner y Wallis, 1989; Chan et al., 1991).

El **Ag 85A** actúa uniéndose a moléculas de fibronectina, la cual interviene en la estimulación de las células T, interfiriendo así en la activación de los macrófagos. Además este Ag puede tener un efecto de supresión de la migración de los monocitos y macrófagos hacia el sitio de infección (Salyers y Whitt, 1994).

Como después se comentará en profundidad, una de las posibles explicaciones del **daño tisular** causado por *M. tuberculosis* es el desencadenamiento de una respuesta inmune celular "**destruictiva**". Aún se desconocen cuales son los Ag responsables de este tipo de respuesta, aunque existen algunos indicios de que el **cord factor** (lípidos de la pared celular) es capaz de estimular las respuestas inflamatorias, y se ha visto que al ser inyectado en animales es tóxico. El **muramildipéptido** (otro componente de la pared celular) es también capaz de estimular la producción de linfoquinas. La hipótesis más aceptada es la de que la mayor parte del daño tisular se debe a la liberación del **factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)** por

los macrófagos activados inducida por componentes de la pared celular. Por último la liberación de **componentes lisosómicos** por parte de los macrófagos para intentar destruir a las bacterias, contribuye también al daño tisular.

La **INTERACCIÓN ENTRE LAS MICOBACTERIAS Y EL HOSPEDADOR EN EL CONTEXTO DEL SISTEMA INMUNE** es un proceso extremadamente complejo y aún muy poco conocido (Kaufmann, 1990). A partir de una infección micobacteriana se instauran dos tipos de inmunidad, la de base humoral y la de base celular. La producción de anticuerpos podría contribuir a la patogenicidad a través de la formación de **inmunocomplejos** que son capaces de producir daño tisular mediante la activación del complemento, o bien son capaces de inhibir la fagocitosis por parte de los macrófagos (Grange, 1985). Además parece ser universalmente aceptado que la **inmunidad de base celular** juega el papel más importante en los mecanismos de protección frente a la enfermedad, y que paradójicamente es también la responsable principal de los mecanismos de daño tisular.

Cuando *M. bovis* penetra en el organismo (ya sea por vía aerógena o por cualquier otra) es ingerido por células fagocitarias. En los bóvidos las principales células fagocitarias son los fagocitos polimorfonucleares y los fagocitos mononucleares; los primeros predominan en la sangre periférica, y dentro de los segundos, tenemos a los monocitos circulantes y a los fagocitos tisulares (presentes en un elevado número en tejidos como hígado, bazo, ganglios linfáticos y pulmón). Cuando *M. bovis* se establece en un tejido, actúa como un potente factor quimiotáctico que atrae a los polimorfonucleares y a los macrófagos hacia el foco de infección. La ingestión de los bacilos se acelera por la presencia de opsoninas (Ac que "tapizan" a los bacilos).

Pritchard en 1988 sugiere que los polimorfonucleares no son capaces de matar eficientemente a *M. bovis*, y que la muerte de estas células junto a la subsecuente liberación de enzimas y de Ag micobacterianos, produce un foco de lesión que histológicamente caracteriza a las infecciones tempranas por *M. bovis*. Según este autor, la función de los polimorfonucleares en la lesión es sólo la de limpiar de bacilos muertos; mientras que los fagocitos tisulares actúan fagocitando a bacterias

muertas y vivas, procesando los Ag, y presentándoselos a los linfocitos T. Sin embargo, Brown et al. en 1987 demostraron que los polimorfonucleares humanos eran capaces de matar a *M. tuberculosis in vitro*; el hecho de que estas células con tan alta capacidad quimiotáctica y metabólica se vean atraídas como primera línea de defensa hacia las lesiones incipientes en el ganado bovino (Pritchard, 1988), hace pensar que quizás juegen un papel más importante del que se les ha atribuido hasta hoy (Neill et al., 1994a).

M. bovis tiene la propiedad de sobrevivir y multiplicarse en el interior de los macrófagos no activados (Hahn y Kaufmann, 1981), y por ello no pueden ser efectivamente atacados por mecanismos de base humoral (Ac). En términos generales, la inmunidad de base celular se instaura con el reconocimiento por parte de los linfocitos T de los Ag procesados en la superficie de las células presentadoras de Ag, dentro del contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. Esta interacción causa una serie de mecanismos efectores (liberación de linfoquinas por los linfocitos T) con la subsecuente activación de las capacidades antimicobacterianas de los macrófagos y de los monocitos sanguíneos (Kaufmann, 1990). La instauración de esta inmunidad de base celular beneficia al hospedador iniciando procesos que pueden destruir o inhibir a las micobacterias. Paralelamente, interacciones de similar naturaleza conllevan a la instauración de reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH). Éstas pueden también inhibir a los bacilos tuberculosos, pero en este caso los macrófagos que contienen bacilos en multiplicación son destruidos, lo cual hace que las micobacterias se liberen de su favorable y protector ambiente intracelular permitiendo que los macrófagos activados las fagociten. Sin embargo, la destrucción celular contribuye a su vez a la patogenia provocando daño tisular y diseminación de los microorganismos (Kaufmann, 1989).

Los macrófagos activados se consideran como los principales efectores en la protección frente a las enfermedades producidas por micobacterias (Pritchard, 1988; Thoen y Himes, 1986a y b). La mayoría de los estudios sobre mediación y expresión de la inmunidad celular se han realizado en infecciones por *M. tuberculosis* en humanos y en ratón. Sin embargo, los aspectos detallados sobre la inmunidad celular bovina frente a *M. bovis* están aún por definir. La interacción inicial entre *M.*

tuberculosis y macrófagos produce una doble respuesta en la que se involucran linfocitos T colaboradores (Th CD4+) y linfocitos T citotóxicos (CD8+) (Muller et al., 1987; Kaufmann, 1989). Existe una considerable controversia sobre la importancia relativa de cada uno de los 2 tipos de células T, aunque se acepta que ambas son necesarias para una protección efectiva.

Dentro de los **linfocitos T CD4+** existen 2 subpoblaciones de importancia: la primera de ellas está constituida por los **Th2**, que producen interleuquina (**IL 4**), la cual estimula la producción de Ac por parte de los linfocitos B (inefectivos frente a las micobacterias) y que a su vez actúa sobre los Th1 estimulando la producción de gamma interferón (GIFN); los Th2 también producen **IL 10** que ayuda en la activación de los macrófagos. La segunda subpoblación CD4+ son los **Th1** cuya principal función es la de liberar **GIFN**, principal responsable de la activación de los macrófagos. Hay otras células capaces de producir GIFN como las "asesinas naturales" o NK, las TCR gamma/delta y los CD8+, aunque lo hacen en mucha menor cantidad.

Las IL son generalmente producidas por los linfocitos CD4+ que reconocen a los antígenos micobacterianos en el contexto de las moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estos linfocitos tienen predilección por los llamados Ag exógenos (Ag recogidos por las células del hospedador y que residen en el compartimiento endosómico). Las IL tienen una gran importancia en la protección local (Hahn y Kaufmann, 1981) y en la activación de los macrófagos (Dannenberg, 1989).

Se ha comprobado *in vitro* que el GIFN es la única IL capaz de conferir a los macrófagos murinos no infectados la capacidad de inhibir el crecimiento micobacteriano (Flesch y Kaufmann, 1987). Sin embargo, se ha constatado que cuando los macrófagos son infectados con *M. bovis*, responden con menor intensidad al GIFN, mientras que adquieren capacidad de respuesta a las IL 4 y 6 secretadas por los linfocitos B (Kaufmann, 1990). El GIFN además estimula la unión de los linfocitos T a las células endoteliales, favoreciendo así su paso desde la sangre hacia el área infectada. La importancia del GIFN ha sido demostrada mediante experimentos con líneas transgénicas de ratones deficientes en GIFN, los cuales son mucho más

susceptibles a la infección por *M. tuberculosis* que la línea parental (Salyers y Whitt, 1994). Parece evidente que el GIFN *per se* no aumenta la inhibición de *M. tuberculosis* por parte de macrófagos humanos (Rook, 1987). Sin embargo, se ha demostrado que éstos sí que actúan sobre *M. tuberculosis* bajo la influencia del factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α) y la dihidroxi vitamina D₃, ya sea por separado, o en combinación (Denis, 1991); estos aspectos son aún desconocidos en la especie bovina.

Las micobacterias residen primariamente en los fagocitos de los macrófagos, cuyos mecanismos efectores antibacterianos pueden ser estimulados por las IL producidas principalmente por los CD4+. Como se ha comentado, parece ser que los mecanismos implicados en la protección y en la destrucción tisular (enfermedad) son los mismos, aunque aún no está nada claro cual es la diferencia entre aquellos animales que resisten la enfermedad y los que la padecen. Las últimas teorías parecen sugerir que aquellos animales en los que el perfil de citoquinas es del tipo Th1 (IL 4) son los que desarrollan la enfermedad, y que sin embargo aquellos con un perfil tipo Th2 (GIFN, IL2) muestran resistencia a la misma. Lo único que parece claro hasta el momento es que el GIFN es necesario, aunque no suficiente, para la adquisición del estado de protección y que cuando la IL4 domina la respuesta inmunológica, se instaura la situación de enfermedad. Se ha comprobado *in vivo* que existe una marcada relación inversamente proporcional entre las cantidades de GIFN y de IL4.

Se ha comprobado también que las infecciones por micobacterias son capaces de activar a los linfocitos CD8+, los cuales reconocen a los Ag en el contexto de las moléculas de clase I del CMH (Kaufmann, 1988). Estas células normalmente reconocen a los Ag de nueva síntesis en su camino a través del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico.

Existe controversia sobre si *M. tuberculosis* es capaz de escapar desde los fagolisosomas hacia el citoplasma del macrófago y si una vez allí se multiplica activamente o no. Una razón para pensar que esta afirmación es cierta, sería la existencia de la respuesta citotóxica por parte de los CD8+ asociados a moléculas CMH de clase I, la cual normalmente aparece cuando los microorganismos se están multiplicando en el citoplasma o en el núcleo. Sin embargo recientes estudios han

demostrado, que la asociación con moléculas de clase I no requiere necesariamente la existencia de neosíntesis, y que la mera presencia de Ag en el compartimiento citoplásmico es suficiente para desencadenarla (Moore et al., 1988). Lo que parece universalmente aceptado es que *M. tuberculosis* tiene la capacidad de trasladarse desde el fagolisosoma al citoplasma, aunque suelen retener restos de membranas alrededor (Leake et al., 1984; Gaillard et al., 1986). Como ya se comentó, recientemente se ha clonado un gen en *M. tuberculosis* con gran similitud en su secuencia al gen de la hemolisina de *Listeria monocitogenes* y cuya función en esta especie es la de permitir a la bacteria escapar desde una vesícula fagosómica.

Los CD8+ activados muestran capacidad citotóxica y son capaces de matar y/o alterar a los fagocitos infectados que no han sido capaces de parar con éxito la infección micobacteriana (Kaufmann, 1988), de forma que las bacterias liberadas pueden ser ingeridas e inactivadas por los macrófagos activados. Existen también otras células con actividad citolítica como son los CD4+ (Ab et al., 1990) y las células NK ("Natural Killer") (Ota et al., 1990).

El reconocimiento de los antígenos por parte de los linfocitos T se efectúa a través de un receptor que en los CD4+ y CD8+ convencionales es un heterodímero compuesto por una cadena alfa y una cadena beta; sin embargo existe un menor porcentaje de células cuyo receptor está compuesto por una cadena gamma y una cadena delta (células g/d). En humanos sólo un 10 % de las células T tienen este tipo de receptor (Kaufmann, 1990). Aún se conoce muy poco de la función de estas células, aunque varios grupos han demostrado que poseen una especial predilección por las micobacterias y que responden a antígenos micobacterianos (Modlin et al., 1989; Kabelitz et al., 1990; Havlir et al., 1991). Kaufmann en 1990 demostró que estas células poseían capacidad citolítica hacia dianas homólogas cuando estas exhibían antígenos micobacterianos. En comparación con el hombre y con el ratón las células g/d son relativamente numerosas en el sistema inmune bovino (Hein y Mackay, 1991), aunque su función aún no ha sido claramente definida.

Recientemente se ha comprobado que existe una progresión dinámica en la dominancia de las diferentes subpoblaciones de células T durante la infección por *M.*

bovis. De forma que inicialmente (15 días postinfección) predominan las células gamma-delta, después (50 días postinfección) los CD4+, y en la última fase dominan los CD8+.

Ya en 1977, Lenzini et al. presentaron la teoría de la existencia de una **gama de respuestas inmunológicas** en la tuberculosis humana. Estos autores constataron la existencia de pacientes **altamente reactivos**, con fuertes reacciones a la prueba tuberculínica y a la de migración de linfocitos, lesiones muy localizadas, sin presencia de bacilos en esputo, y con bajos títulos de Ac circulantes. Por otro lado estaban aquellos pacientes **poco reactivos**, negativos en la prueba tuberculínica y migración linfocitaria, con presencia de bacilos en el esputo, y con altos títulos de Ac.

Parece ser que una situación similar ocurre en el ganado bovino (Lepper et al., 1977), estos autores demostraron que el ganado anérgico (negativo a las pruebas de inmunidad celular) tiene normalmente lesiones múltiples y con tendencia a la progresión. Gerney-Rieuse y Tacquet en 1952 mostraron una elevada tasa de Ac en el ganado severamente afectado por la enfermedad, en relación con aquel menos afectado. En un estudio similar, Lepper et al. en 1983 correlacionaron las lesiones tuberculosas del ganado bovino con el título de Ac circulantes, encontrando que aquellos animales con múltiples lesiones o con lesiones activas (con elevado número de bacilos) tenían altos títulos de anticuerpos.

En estudios más recientes con animales experimental y naturalmente infectados (Hanna et al., 1989, 1992) se ha comprobado que al ser inoculados con dosis elevadas, existen algunos animales que desarrollan múltiples lesiones y mueren al poco tiempo; mientras que hay otros que sólo presentan escasas lesiones confinadas en ganglios linfáticos o pulmón (situación similar a la encontrada en la mayoría del ganado tuberculoso naturalmente infectado). Al reducir la dosis infectante se reduce la gravedad de la enfermedad y el número de lesiones encontradas, aumentando el período entre la infección y la detección de Ac. En animales infectados naturalmente se ha demostrado la existencia de una relación inversa entre las respuestas inmunes humoral y celular (Ritacco et al., 1991).

Thorns y Morris en 1983 estudiaron la gama de respuestas inmunológicas en

diferentes especies animales estableciendo varias categorías: 1º) Algunos animales muy sensibles a la tuberculosis bovina como el tejón, el opossum o el hurón que muestran una respuesta celular muy débil, permitiendo la multiplicación incontrolada de los bacilos tuberculosos; 2º) En el extremo opuesto se encuentran animales como los monos, conejos o cobayas que también son muy sensibles a la enfermedad y que sin embargo se comportan como hipereactivos en las pruebas de inmunidad celular, provocando caseificación y licuefacción de los tejidos lesionados y favoreciendo así la diseminación de *M. bovis*; 3) Animales más resistentes a la infección por *M. bovis* como son la rata, el perro o la oveja, en los que los mecanismos de la inmunidad celular es suficiente para controlar la infección.

I.4.3 Control de la tuberculosis bovina mediante vacunación

Como resultado de una serie de medidas de control (vacunación con BCG, pasteurización de la leche, campañas de erradicación en el ganado bovino, etc...), así como de las mejoras en las condiciones de vida, trabajo y dieta, la incidencia de la tuberculosis humana descendió paulatinamente durante el siglo pasado. Fue después de la introducción de la quimioterapia antituberculosa, cuando las cifras de esta enfermedad se redujeron espectacularmente, y como consecuencia de ello se predijo que esta enfermedad sería totalmente erradicada del mundo desarrollado para el año 2.000 (CDC, 1982). Debido a este optimismo reinante durante los años 1960-70, se descuidaron los programas de control epidemiológico y los fondos destinados a la investigación sobre esta enfermedad. Como consecuencia de todo ello, y para sorpresa de la comunidad médica internacional, hemos asistido a un renacer de la tuberculosis, con la consiguiente preocupación de las autoridades sanitarias en el control de esta infección.

La única vacuna disponible hasta el momento es la BCG (bacilo de Calmette-Guérin), esta vacuna fue producida por atenuación *in vitro* entre los años 1908 y 1918 de una cepa bovina de *M. bovis*. Debido a la dispersión de esta cepa en diferentes laboratorios del mundo se han originado una serie de cepas vacunales microbiológicamente heterogéneas con diferentes perfiles antigénicos, diferentes capacidades para producir reacciones de hipersensibilidad retardada, y diferente toxicidad (Newell y Hewinson, 1995). Pese a la gran polémica que siempre ha existido en torno a su aplicación, la BCG es la vacuna más utilizada en el mundo, y se estima que aproximadamente el 70 % de los niños del mundo reciben una dosis de la misma. Aunque la mayor parte de los países han recomendado la vacunación rutinaria con BCG, existen enormes diferencias en las opiniones de los expertos sobre la dosis y el protocolo de vacunación utilizado.

En los numerosos estudios realizados sobre su eficacia se han encontrado un enorme abanico de resultados, desde eficacias del 0 % (India) hasta resultados del 80 % (Reino Unido) (Fine y Rodrigues, 1990; Colditz et al., 1994). Las discusiones sobre las razones para tal variabilidad de resultados aún continúan, y no se ha llegado a

un acuerdo al respecto. Entre las posibles causas se aducen:

1) Diferencias en las cepas vacunales utilizadas:

Si se examinan los datos de los diferentes experimentos, se observa que diferentes vacunas han proporcionado resultados idénticos en el mismo área, y que por el contrario, al utilizar la misma vacuna en áreas diferentes se han obtenido resultados discrepantes. Por ello esta razón no es muy convincente.

2) Diferencias regionales en la prevalencia de infecciones por otras micobacterias:

Las especies ambientales de micobacterias pueden inducir protección heteróloga frente a la tuberculosis, dificultando la evaluación de la eficacia de la vacunación con BCG. Contra esta hipótesis se ha comunicado que, en varios estudios, no se han encontrado diferencias de protección entre individuos con moderada reacción a la tuberculina antes de su vacunación e individuos totalmente negativos a la prueba.

3) La vacunación con BCG es más eficaz en impedir la diseminación hematológica (enfermedad primaria progresiva) que en parar el crecimiento de focos locales (reinfeción o reactivación). Esta teoría se ve apoyada por el hecho de que, en todos los ensayos, la vacunación con BCG es más eficaz en la prevención de meningitis que en prevenir otras formas de tuberculosis.

4) Diferencias genéticas en la población vacunada:

No existen evidencias reales a favor de esta hipótesis, y se ha comprobado que en la población asiática residente en Inglaterra la vacuna funciona mejor que en la misma población en su país de origen. Aún así se reconoce que pueden existir diferencias genéticas en la resistencia a la tuberculosis entre determinadas poblaciones

5) Diferencias fisiológicas en la población vacunada, principalmente edad y estado de nutrición.

6) Variaciones geográficas en las cepas de *M. tuberculosis* causantes de la enfermedad.

Lo más probable es que sean varios los factores que hayan propiciado la variabilidad de resultados en los distintos estudios. Colditz et al. en su controvertido

meta-análisis sobre todos los ensayos realizados hasta ahora con BCG, concluye que la vacunación con BCG reduce significativamente el riesgo de padecer tuberculosis activa. En su estudio, la cifra media de protección frente a la infección tuberculosa fue del 50 %. La vacuna protege frente a la tuberculosis diseminada (78 % protección), meningitis (64 %) y muerte (71 %). En este estudio encontraron que la edad a la vacunación no era un factor significativo en la eficacia de la vacuna y fueron incapaces de cuantificar la duración del efecto protector de la vacuna.

La tuberculosis bovina es una enfermedad controlable con los medios diagnósticos de los que se dispone actualmente, si se instaura una buena política de erradicación. Aún así, existen situaciones particulares en las que estos esquemas de control no son válidos; la primera de ellas es la existencia de reservorios salvajes de *M. bovis* que dificultan enormemente el control de la enfermedad en ciertas áreas, y la segunda es la imposibilidad de establecer los programas de "prueba y sacrificio" en el ganado de los países en vías de desarrollo. En estas dos situaciones la vacunación con una vacuna segura y eficaz sería de gran interés para la lucha contra esta infección.

Con respecto a la historia de la vacunación del ganado con BCG, durante los años 1920-40 se hicieron bastantes ensayos (Buddle et al., 1995) todos ellos con una serie de características en común:

- * vacunación con altas dosis (50-100 mg) de BCG vía subcutánea o intravenosa.
- * tras la inoculación experimental 3 meses después de la vacunación, generalmente se observaban ciertos niveles de protección frente al desarrollo de lesiones, pero los animales se infectaban y se podía cultivar *M. bovis* a partir de sus tejidos. Quizás esta situación se debía a la utilización de dosis elevadas del inóculo por una vía que no era la natural para *M. bovis*.
- * parece ser que los animales vacunados respondían de forma muy prometedora a la infección natural por *M. bovis*, aunque la inmunidad lograda era de corta duración y no se mantenía por revacunaciones posteriores.

En Gran Bretaña, durante los años de 1940-50 se llevaron a cabo experimentos de vacunación de ganado con BCG en rebaños en los que se conocía la existencia de tuberculosis y se constató que, como media, la vacunación protegía a un 25 % de los animales frente al desarrollo de lesiones tuberculosas (O'Reilly y Daborn, 1995). En Malawi (Elwood y Waddington, 1972) en un experimento similar, se demostró que el ganado vacunado era más resistente al desarrollo de lesiones que los controles no vacunados. En otro experimento en Madagascar (Cheneau y Blancou, 1975) se encontró que la vacunación con BCG confería entre un 18 y un 28 % de protección. Como resultado de estos estudios parece deducirse que tras la vacunación con BCG sólo se consigue una inmunidad protectora parcial de corta duración.

Hoy en día los conceptos en este campo han variado y se reconoce que es mejor la vacunación con baja dosis de BCG (10^3 ufc). Al vacunar con dosis bajas es más probable que se instaure una inmunidad celular protectora, mientras que si se vacuna con dosis altas, se prima la respuesta de tipo humoral con formación de Ac no protectores. Se ha comprobado que cada individuo tiene un umbral que marca la diferencia entre la instauración de ambos tipos de respuestas inmunológicas. Otro de los temas importantes es la vía de inoculación y parece ser que la vía intratraqueal es la más adecuada. Buddle et al. en 1995 encontraron que la vacunación del ganado con una dosis baja de BCG por esta vía, era efectiva en proteger a un 50-70 % del ganado frente al desarrollo de lesiones tuberculosas. Varios autores han demostrado que la estimulación del sistema inmune por micobacterias atípicas en animales no vacunados es un factor de enorme importancia y que conlleva a una gran disminución en la eficacia de la vacunación con BCG.

Uno de los mayores impedimentos encontrados en la vacunación del ganado con BCG es que los animales vacunados desarrollan sensibilidad a la tuberculina con lo que esta prueba deja de ser útil para el diagnóstico. Otro problema es el de la seguridad en el uso de la vacuna, aunque no existen evidencias de que la vacunación de ganado previamente infectado provoque una exacerbación de la enfermedad o induzca la excreción de *M. bovis*. Por último, tenemos el problema de cómo

comprobar cuando se ha establecido una respuesta inmune protectora en un animal, puesto que hay una tendencia a considerar que la medida de las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH) son un indicativo de protección, sin embargo no es así. El grado de protección no está correlacionado directamente con la respuesta DTH, y se ha comprobado que poblaciones vacunadas con una excelente respuesta en la intradermoreacción, no mostraron ningún grado de protección frente a la enfermedad (Fine y Rodrigues, 1990). Parecen existir evidencias de que los antígenos responsables de la inducción de la inmunidad protectora son distintos de los responsables de las respuestas DTH (Newell y Hewinson, 1995).

Actualmente se trabaja en el desarrollo de nuevas vacunas utilizando diferentes estrategias:

* Vacunas de subunidades y péptidos sintéticos:

Aunque parece claro que las vacunas vivas confieren un mayor grado de protección que este tipo de vacunas, se ha comprobado que mediante el uso de algunas proteínas extracelulares de *M. bovis* (Ej. Ag 85) se puede conseguir cierto grado de protección. Aún así se sabe que la respuesta inmunológica a antígenos micobacterianos individuales está genéticamente predeterminada (Bothamley et al., 1989), y que los Ag protectores para ciertos individuos, pueden no serlo para otros. De ello se deduce que sería necesario la utilización conjunta de varios de estos Ag para la creación de una vacuna.

* Administración de BCG a baja dosis.

* Clonaje de Ag en BCG:

Se basa en la introducción de genes de *M. bovis* en BCG de forma que se expresen los Ag necesarios para una inmunidad protectora.

* Utilización de otros vectores atenuados que expresen antígenos micobacterianos recombinantes.

* Manipulación genética de *M. bovis* con el fin de generar mutantes atenuados:

Para ello sería necesario conocer los factores de virulencia de *M. bovis* y un mayor desarrollo de la tecnología para manipular genes concretos en esta especie.

A pesar del enorme esfuerzo investigador que se está realizando, la mayor parte de estas propuestas están aún muy lejos de ser realidades y hoy por hoy la única solución a corto plazo sería la optimización del uso (dosis, vía de administración) de la BCG, o la introducción de nuevos antígenos en BCG. Los mecanismos de inmunidad más importantes en la tuberculosis son los de base celular, aunque existen grandes lagunas en la comprensión de los mismos, y se cree que la inmunidad protectora necesita de un delicado balance entre las funciones de las células colaboradoras y supresoras, por todo ello el mecanismo apropiado de acción para una vacuna ideal es aún desconocido.

I.5 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR MICROORGANISMOS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*.

I.5.1 Técnicas convencionales

I.5.1.1 Observación de lesiones e histopatología

La detección de lesiones macroscópicas en el examen *postmortem* es un aspecto importante en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, y el diagnóstico **presuntivo** de la enfermedad frecuentemente se realiza mediante esta vía. Las lesiones tuberculosas típicas pueden variar en tamaño desde 1 mm hasta más de 10 cm de diámetro, y puede tratarse de lesiones localizadas en un ganglio linfático o de complejos primarios.

No siempre es fácil diferenciar entre lesiones tuberculosas y aquellas causadas por actinomicas, actinobacilos, nocardias, rodococos, estreptomices, neoplasias y otros granulomas no tuberculosos. Tammemagi et al. en 1973, en un estudio sobre la etiología de lesiones sospechosas de tuberculosis, encontraron que sólo un 81 % de las lesiones macroscópicas sospechosas, son realmente lesiones tuberculosas al ser confirmadas histopatológicamente. Asimismo, varios autores han demostrado las deficiencias de la inspección *postmortem* en matadero en la detección de animales infectados (Corner et al., 1990).

La histopatología ha sido empleada durante muchos años como una técnica excelente para confirmar el diagnóstico en aquellas lesiones sospechosas de tuberculosis, y ha sido utilizada en las campañas de erradicación de varios países (EEUU, Australia).

Los problemas que conllevan estas técnicas se derivan de que algunas micobacterias atípicas pueden producir lesiones localizadas que son macroscópica e histopatológicamente indiferenciables de aquellas causadas por *M. bovis*. Se cree que la fuente de infección con estas micobacterias es ambiental, y nunca se han comunicado casos de transmisión lateral o vertical. Estas infecciones pueden causar

sensibilización a la tuberculina bovina, lo cual origina problemas en los esquemas de control de la enfermedad. Además de las micobacterias atípicas, otras infecciones como la actinobacilosis (*Actinobacillus lignieresii*), actinomicosis (*Actinomyces bovis*), botriomicosis (*Staphylococcus aureus*), nocardiosis (*Nocardia spp*), estreptomicosis (*Streptomyces spp*) y las causadas por *Rhodococcus equi*, pueden tener el aspecto característico de una reacción granulomatosa y pueden confundirse con una tuberculosis. En muchas ocasiones los bacilos ácido-alcohol resistentes son difíciles de evidenciar (especialmente en las lesiones crónicas) y es necesaria una búsqueda muy meticulosa para su detección.

Las lesiones granulomatosas causadas por *M. bovis* suelen tener el aspecto de un tubérculo con un área central de necrosis y con algún grado de calcificación, generalmente en el centro del área caseificada. La zona caseificada está rodeada de una zona de células epiteliales, con células gigantes de Langhans en el margen de la misma; las lesiones antiguas a menudo tienen una cápsula fibrosa.

Es importante resaltar a modo de diagnóstico diferencial que las lesiones causadas por *Rhodococcus* presentan macrófagos cargados con cocobacilos gram positivos. Las originadas por *Streptomyces/Nocardia* presentan numerosas células gigantes de cuerpo extraño y neutrófilos asociados con el área necrótica, y aquellas debidas a *Actinomyces/Actinobacillus* presentan filamentos radiados y colonias en forma de bastón.

I.5.1.2 Cultivo microbiológico

Debido a las limitaciones de la histopatología, el aislamiento e identificación de *M. bovis* a partir de las lesiones es un requisito indispensable para un diagnóstico certero de la tuberculosis, lo cual es necesario en los esquemas de control de la enfermedad. Esto es especialmente relevante en los casos en que la incidencia de la enfermedad es muy baja, como es el caso de "casi" todos los países europeos, norte América y Australia (en estos casos la prevalencia de animales sin lesiones visibles, pero positivos tras el cultivo microbiológico puede llegar al 10 %). El aislamiento del agente causal es aún la confirmación última de la infección, y por ello cualquier

nuevo método diagnóstico debe ser contrastado con las técnicas de bacteriología.

Han sido aisladas micobacterias a partir de fuentes ambientales (suelo, polvo, heces, agua), a partir de tejidos, fluidos del organismo y leche.

Para la confirmación de la infección por *M. bovis* generalmente son necesarios unos 2-3 meses. El cultivo convencional lleva asociados 3 pasos básicos: suspensión, concentración, y descontaminación de las muestras con ácidos, álcalis o detergentes con el fin de eliminar otras bacterias y hongos que podrían impedir el crecimiento de las micobacterias de crecimiento lento.

Para el cultivo de estos microorganismos son necesarios medios enriquecidos con suero, yema de huevo u ovoalbúmina. Está descrito que en los medios con base de huevo las colonias tardan una media de 35 días en hacerse visibles mientras que en aquellos con base de agar, lo hacen 4-6 días antes. Los medios de cultivo con base de huevo o de agar son más seguros y efectivos que el uso de la inoculación en animales de experimentación. Se ha comprobado que la sensibilidad del cultivo aumenta al incrementar el número de tubos de cultivo usados para cada muestra, y al incrementar la cantidad de material cultivado. También se ha observado que el número de colonias obtenido en los medios con base de huevo es mayor, y que estos medios son menos susceptibles a la contaminación.

La mayoría de estos medios de cultivo se hacen selectivos mediante la adición de colorantes como el verde malaquita o el cristal violeta. También se han desarrollado medios selectivos conteniendo diferentes antibióticos (Mitchison et al., 1973), aunque se ha detectado cierta inhibición de las micobacterias del complejo por estos antibióticos, por ello su uso se reserva a especímenes muy contaminados. Los medios selectivos con antibióticos que han demostrado mejores resultados son el agar Mycobactosel con cicloheximida, lincomicina y ácido nalidíxico (Petran y Vera, 1971), y el Middlebrook 7H11 con polimixina B, carbenicilina, anfotericina B y trimetropin (Mitchison et al., 1972).

Los reactivos elegidos para la descontaminación deben ejercer el mínimo efecto sobre la viabilidad de las micobacterias y al mismo tiempo ser capaces de inactivar al resto de los microorganismos contaminantes.

Petroff en 1915 describió por primera vez el uso del NaOH para descontaminar muestras de esputos antes de su cultivo y su método ha sido ampliamente adaptado para su aplicación a tejidos. Sin embargo, se ha comprobado que el NaOH es tóxico tanto para los contaminantes, como para las micobacterias. En los estudios de Kubica et al., 1963; Krasnow y Wayne, 1966; Mitchison et al., 1972 y Vestal en 1975 se demuestra la destrucción de organismos del complejo *M. tuberculosis* después de la exposición al NaOH, siendo *M. bovis* especialmente sensible a los tratamientos con álcalis. Por todo ello debe vigilarse la concentración de NaOH utilizada (nunca superior al 2 %) y el tiempo de contacto (nunca superior a 30 minutos). Tacquet y Tison en 1961 describieron un método de descontaminación mediante el uso combinado del laurilsulfato de sodio al 3 % y el NaOH al 1 %.

Kubica et al. en 1963 describieron otra técnica con el uso del agente mucolítico N-acetil-L-cisteína para la digestión y de NaOH al 1 % para la descontaminación.

Krasnow y Kidd en 1965 utilizaron el cloruro de benzalconio como agente decontaminante, aunque los hongos resistían los tratamientos con esta sustancia.

Hasta hoy el agente descontaminante que se considera menos tóxico para las micobacterias y especialmente para *M. bovis* es el cloruro de hexadecil-cetil-piridinio (HPC), se recomienda su uso a concentraciones del 0.075 al 0.75 % (en función de la contaminación de la muestra), y el tiempo de contacto nunca debe exceder de 60 minutos (Corner y Trajstman, 1988). Este decontaminante ha sido también utilizado con éxito en la descontaminación de heces para el cultivo de *M. paratuberculosis* (Whipple y Merkal, 1983), para preservar muestras de esputo antes del cultivo de *M. tuberculosis* (Smithwick et al., 1975), y para destruir hongos patógenos en el esputo (Phillips y Kaplan, 1976).

En aquellas muestras excepcionalmente contaminadas es necesario el uso de agentes más fuertes como el ácido oxálico al 5 % (Corper y Vyei, 1930) para la inactivación de microorganismos del género *Pseudomonas* y coliformes.

Tammemagi et al. en 1973 encontraron que la sensibilidad del cultivo respecto a lesiones confirmadas histopatológicamente era de un 90 %. Wood et al. en 1991 encontraron que sólo el 88 % de los animales con lesiones macroscópicas sospechosas

de tuberculosis, pudieron ser confirmados como infectados con *M. bovis* mediante cultivo, y que sin embargo *M. bovis* se aisló a partir del 6,4 % de los animales positivos a las pruebas de inmunidad celular pero sin lesiones visibles. En otros trabajos se ha estimado que la sensibilidad del cultivo en la práctica es de 102 bacilos/ml de muestra (McFadden et al., 1990).

I.5.1.3 Observación directa por microscopía

La preparación de improntas a partir del material caseoso de la zona más cercana a la pared interna de la lesión, y su tinción con una técnica de ácido-alcohol resistencia, puede ser utilizado para el diagnóstico presuntivo de tuberculosis. Las técnicas de tinción más utilizadas son: Ziehl-Neelsen y Kinyoun (fucsina básica), y tinción de fluorocromos (auramina fenolada). En las improntas teñidas con el método de Ziehl-Neelsen las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* se visualizan como bacilos rojos sobre fondo azul, de longitud media, y aislados o en grupos; con la técnica de auramina aparecen como bacilos amarillo brillante sobre un fondo de color oscuro.

La técnica de Ziehl-Neelsen ha sido el método tradicional para demostrar la existencia de micobacterias en las improntas, aunque la principal dificultad que surge al utilizar este método es que se requieren grandes aumentos. Sin embargo al usar tinciones de fluorescencia, las preparaciones pueden ser examinadas a bajos aumentos lo cual permite examinar toda la preparación en un tiempo mucho menor. Además, los bacilos amarillo-fluorescente son más fácilmente detectables que la bacilos rojos sobre fondo azul. La tinción clásica con auramina-O utiliza como colorante de contraste el permanganato potásico, la desventaja de usar este colorante es que no permite identificar la estructura del tejido; esta dificultad se salva fácilmente con el uso de fucsina básica como colorante de contraste (Rowlett y Corner, 1981). Aunque los microscopios de fluorescencia son caros y es necesario un aprendizaje para examinar estas tinciones, el uso de las mismas reduce el tiempo y el esfuerzo necesarios para el examen de las preparaciones, y los resultados son tan fiables como los obtenidos con la tinción de Ziehl-Neelsen (Huebner et al., 1993).

La microscopía es un método rápido para detectar microorganismos ácido-alcohol resistentes pero su sensibilidad no es muy elevada. Sólo detecta como positivas aquellas muestras en las que el número de bacilos sea mayor de 10.000 organismos/ml (Bates, 1979). Según otros autores es necesario que existan más de 10^5 micobacterias/ml para su detección por estos métodos (Eisenach et al., 1988). Morris et al. en 1993 en un estudio sobre el valor predictivo de la microscopía en el diagnóstico de la tuberculosis, dedujeron que la sensibilidad de estas técnicas es sólo del 34 %, y por lo tanto nunca deben ser utilizadas para decidir que muestras deben ser o no cultivadas. Otro de los problemas asociados a las técnicas de microscopía es que no permiten la identificación de las especies de micobacterias implicadas en el proceso.

I.5.2 Pruebas inmunológicas

I.5.2.1 Pruebas para la detección de la inmunidad humoral.

Durante los últimos años han sido evaluadas pruebas serológicas muy diferentes para la detección de la respuesta inmune a la infección por *M. bovis*. Entre ellas se incluyen la prueba de hemoaglutinación (Middlebrook y Dubos, 1948; Choi y Frost, 1984), fijación del complemento (Vardaman y Larsen, 1962), inmunodifusión en gel de agarosa (Richards et al., 1966; Blancou, 1972), hemoaglutinación-lisis (Middlebrook, 1950), inmunofluorescencia indirecta (Lepper y Pearson, 1975), caolín-hemoaglutinación (Zaki et al., 1980), etc... Ninguna de ellas fueron lo suficientemente sensibles y específicas como para sustituir a la intradermotuberculinización.

Diversos ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) han sido usados para el diagnóstico de la tuberculosis en el hombre (Nassau et al., 1976; Zeiss et al., 1982; Gómez-Mampaso et al., 1991). La sensibilidad encontrada para estas pruebas en humanos fue del 48 al 85 %.

Más recientemente las técnicas de ELISA han sido utilizadas por múltiples grupos en el diagnóstico de la tuberculosis bovina, tanto en infecciones

experimentales (Thoen et al., 1984; Auer y Schleeauf, 1988; Hanna et al., 1989; Ritacco et al., 1990; Harboe et al., 1990), como en pruebas de campo (Auer, 1987; Ritacco et al., 1987, 1990; Plackett et al., 1989; Dowling y Schleeauf, 1991; Fifis et al., 1992; Wood et al., 1992). Diferentes ELISA han sido utilizados también para el diagnóstico de la tuberculosis en tejones (Morris et al., 1979), ciervos (Griffin et al., 1991), focas (Cousins, 1987) y animales exóticos (Thoen et al., 1980; Haagsma y Eger, 1990). Duffield en 1990 desarrolló un ELISA para la detección directa de *M. bovis* en tejidos animales obteniendo una sensibilidad del 47 % respecto al cultivo.

Los ELISA no han dado resultados dignos de confianza como para su uso en la rutina diagnóstica; como una constante en todos los casos, las sensibilidades encontradas han sido sólo moderadas, con cifras entre el 15.3 % (Dowling y Schleeauf, 1991) y el 73 % (Ritacco et al., 1990). Una de las observaciones interesantes en el transcurso de estos estudios es que parece existir una correlación entre un incremento en el título de Ac y la severidad de la infección (Wallace et al., 1968; Lepper et al., 1973).

Varios autores han encontrado una marcada relación inversa entre la inmunidad de base celular (reacciones de hipersensibilidad retardada) y la de base humoral (títulos de Ac) en el trascurso de la tuberculosis bovina (Plackett et al., 1989; Harboe et al., 1990; Ritacco et al., 1991). Por ello se ha propuesto el uso de un ELISA de forma complementaria a la IDTB, con el fin de detectar animales anérgicos en los casos de enfermedad avanzada, en los que hay sospecha de falsos negativos a la IDTB (aún sabiendo que la especificidad del test no es muy elevada y que se sacrificarían reactores falsos positivos a la prueba de ELISA) (Plackett et al., 1989; Harboe et al., 1990). Griffin et al. en 1991 confirmó la idea de que las pruebas para detección de Ac son más efectivas en el diagnóstico de aquellos animales que se encuentran en fases proliferativas de la enfermedad (animales que suelen ser IDTB negativos). Sin embargo, en un reciente estudio se encontró que los animales anérgicos en dos pruebas diferentes para medida de la inmunidad celular eran también negativos en un ELISA para detección de Ac (Wood et al., 1992).

Otra de las limitaciones que provocan una baja sensibilidad del ELISA, es la

existencia de un intervalo de tiempo entre la infección y la seroconversión, con lo que los animales en estadios tempranos de infección no son detectados.

En numerosos estudios se ha constatado la detección de altos valores en los ELISA en aquellos animales infectados con *M. bovis* que han sido sometidos a intradermoreacción con PPD bovina (Ritacco et al., 1990; Harboe et al., 1990; Dowling y Schleeauf, 1991), sin embargo en los animales no infectados la inyección de PPD bovina no parece tener influencia en el título de Ac detectado (Thoen et al., 1984).

El gran inconveniente de las pruebas serológicas son los fallos en la especificidad debido principalmente a reacciones cruzadas con otras micobacterias. Los valores de especificidad encontrados por los diferentes autores han estado entre el 96,4 % (Wood et al., 1992), 94,1 % (Ritacco et al., 1990), 60 % (Fifis et al., 1992) y el 52,6 % (Auer, 1987).

Los antígenos utilizados para las pruebas de ELISA han sido de muy diverso origen, desde antígenos crudos (PPD, sonicados de *M. bovis* tratados con calor, filtrados de cultivo etc...) hasta antígenos supuestamente especie específicos (MPB70). En ningún caso se han obtenido resultados que recomendasen la utilización de las pruebas serológicas en el diagnóstico rutinario de tuberculosis. Cuando se utilizan antígenos crudos se refleja un inaceptable número de falsos positivos, por el contrario cuando se utilizan antígenos más específicos se mejora la especificidad pero disminuye considerablemente la sensibilidad.

Harboe et al. en 1990 desarrollaron un ELISA para la detección de anticuerpos frente al antígeno MPB70 (específico de *M. bovis*). Estos autores encontraron que aunque la sensibilidad de la prueba era insuficiente para su uso con fines diagnósticos, el riesgo de reacciones falsamente positivas era muy pequeño. Observaciones similares fueron hechas por Wood et al. en 1992 en una prueba de campo con 1.362 animales, demostrando que la sensibilidad de un ELISA para la detección de Ac frente a MPB70 era sólo de un 18,1 %; es decir que aunque la especificidad de la técnica se mejora con estos antígenos, la sensibilidad de la misma disminuye considerablemente. Al contrario que Harboe et al., Wood et al. en 1992 encontraron que, en condiciones de campo, el nivel de reacciones cruzadas al

antígeno MPB70 es mayor del que originalmente se pensó, obteniéndose cifras de especificidad del 96,4 %. La fuente de estos falsos positivos es aún desconocida, aunque se sabe que algunas bacterias como *Nocardia asteroides* muestran cierto grado de reacción cruzada a este antígeno (Harboe y Nagai, 1984).

I.5.2.2 Pruebas para la detección de la inmunidad celular

La detección de la inmunidad de base celular (hipersensibilidad retardada) es el método diagnóstico más frecuentemente usado para detectar la tuberculosis.

Existen 2 grupos de pruebas para este fin, pruebas *in vivo* y pruebas *in vitro*. En las primeras los antígenos (micobacterias enteras o subproductos) son inyectados subcutáneamente o intradérmicamente para posteriormente medir la respuesta del animal en la zona. La respuesta también puede ser medida *in vitro* mediante la medida del grado de reactividad de los linfocitos frente a los antígenos.

La **intradermotuberculinización (IDTB)** simple ha sido aceptada universalmente para detectar la tuberculosis en el ganado y se utiliza en los programas de erradicación de la enfermedad.

La tuberculina más utilizada hoy en día es la PPD (*Purified Protein Derivative*), aunque el uso de la tuberculina HCSM (*Heat Concentrated Synthetic Medium*) está también permitido en la UE (Unión Europea). En varios estudios se han comparado diferentes dosis de PPD en pruebas de campo y se ha visto que los valores óptimos están entre 0.2 y 0.4 mg de PPD bovina (Lepper et al., 1979a,b). Cada lote de tuberculina producido debe ser probado en animales, y comparado con un patrón de referencia para la determinación de su potencia (Directiva 80/219/EEC).

Actualmente se utilizan 2 tipos de pruebas tuberculínicas:

a) Prueba intradérmica simple o IDTB: esta prueba puede llevarse a cabo en la región cervical (Europa) o en la región caudal (Norte América, Australia y Nueva Zelanda), y se ha demostrado que la sensibilidad de la prueba es superior si el antígeno se inoculara en la zona cervical (Francis et al., 1978; de Kantor et al., 1984),

aunque la lectura de la misma es más incómoda.

La directiva 80/219/EEC de la Unión Europea recoge las instrucciones para la inyección e interpretación de esta prueba:

Dosis: 0,1 ml (2.000 Unidades Comunitarias de Tuberculina o CTU)

Lugar de inyección: límite entre los tercios medio y anterior del cuello.

Lectura: 72 horas post-inyección.

Interpretación: menor de 2 mm, negativo.

entre 2 y 4 mm y sin síntomas, dudoso.

mayor de 4 mm, positivo.

Intervalo mínimo para la repetición de la prueba: 42 días.

En la literatura se han publicado diferentes ensayos para calcular la sensibilidad y especificidad de esta prueba. Los valores de sensibilidad están entre el 95.6 % (Lepper et al., 1979a,b), el 72 % (Francis et al., 1878) y el 68 % (Wood et al., 1991). La especificidad estuvo entre el 98.8 % (Francis et al., 1978) y el 85 % (Lepper et al., 1979a,b).

b) Prueba intradérmica simple comparativa: esta prueba se utiliza extensivamente en el Reino Unido e Irlanda, debido a que un 6-12 % de los animales en estas áreas muestran sensibilizaciones inespecíficas a la prueba intradérmica simple (Lesslie et al., 1975). Para ello se inoculan intradérmicamente en el cuello y separadas 12,5 cm entre sí, tuberculina bovina (2.000 CTU) y tuberculina aviar (2.000 IU); de forma que si la reacción a la PPD aviar es mayor que a la PPD bovina se considera al animal como sensibilizado frente a micobacterias atípicas.

Aunque existen pocos datos sobre su utilización, se ha comprobado que la técnica es muy específica (99 %) para detectar falsos reactores a la IDTB simple en rebaños libres de tuberculosis (Lesslie et al., 1975; Roswurm y Konya, 1973), y su sensibilidad se encuentra entre el 77 (de Jongh y Ekdahl, 1969) y el 95 % (O'Reilly y McClancy, 1975).

La principal limitación de la prueba tuberculínica es la existencia de fallos en

la sensibilidad (**falsos negativos**) que son debidos a varios motivos (Monaghan et al., 1994):

- 1) El ganado recientemente infectado no muestra reactividad hasta 30-50 días post-infección.
- 2) Existen animales en estado de enfermedad generalizada que no responden a la prueba.
- 3) Utilización de tuberculinas de baja potencia o mal conservadas.
- 4) Fallos en la utilización de las jeringas multidosis con la consiguiente inyección de dosis menores a las recomendadas.
- 5) Período de desensibilización: Radunz y Lepper en 1985 encontraron que después de la inyección intradérmica de PPD bovina se producía una supresión de la reactividad en la prueba tanto a la PPD bovina como a la aviar, y que para recuperarse la sensibilidad original eran necesarios al menos 60 días desde la inoculación.
- 6) Estados de inmunosupresión postparto o por malnutrición: ha sido demostrado que existe una marcada depresión en la respuesta a la intradermoreacción en los primeros 14 días después del parto y que la respuesta vuelve a los niveles originales a las 4-6 semanas (Kerr et al., 1946).
- 7) Lecturas incorrectas o fallos en la identificación de los animales.
- 8) Variaciones debidas a la subjetividad de la lectura.
- 9) Enmascaramiento intencionado de la reacción mediante inyección de fármacos inmunosupresores.

Estos fallos en la sensibilidad de la técnica originan que un cierto número de animales enfermos queden sin detectar en los rebaños, siendo esta situación un inconveniente grave para la erradicación de la enfermedad.

Aunque la especificidad de la prueba tuberculínica es generalmente alta, a veces se presentan fallos en la especificidad (**falsos positivos**) de la prueba, que se atribuyen a la sensibilización con micobacterias diferentes de *M. bovis* (Corner y Pearson, 1978; Ketterer et al., 1981). Para detectar estos fallos se propuso el uso de la prueba comparativa. Las principales especies que intervienen en estas

sensibilizaciones inespecíficas son: *M. avium subespecie paratuberculosis* (infección o vacunación), *M. avium* (contacto con aves infectadas), micobacterias atípicas (presentes en el suelo, agua, pastos y tracto digestivo de los herbívoros) y el agente desconocido productor de la tuberculosis cutánea.

Otra desventaja de esta prueba es que su utilidad para predecir la presencia o ausencia de enfermedad no depende sólo de la sensibilidad y especificidad de la técnica, sino también de la prevalencia de la enfermedad en la población. Cuanto mayor sea la prevalencia, mayor probabilidad existe de que un resultado positivo sea indicativo de enfermedad; pero cuando el nivel de la infección desciende en la población, aumenta la proporción de animales falsos positivos que no muestran indicios de enfermedad (Monaghan et al., 1994).

Las reacciones de hipersensibilidad retardada también pueden medirse *in vitro*, así la **prueba de transformación de linfocitos** ha sido utilizada para detectar la inmunidad celular en el ganado (Outteridge y Lepper, 1973; Muscoplat et al., 1975), ciervos (Griffin et al., 1991) y tejones (Morris et al., 1978). Esta prueba parece ser tan sensible como la IDTB (aunque no más) y no plantea problemas de falsos positivos (Muscoplat et al., 1975). Estas técnicas son extremadamente tediosas y lentas, ya que requieren la separación de los linfocitos sanguíneos, su incubación en complejos medios de cultivo, y el uso de reactivos radioactivos para detectar el nivel de proliferación celular. Todo ello hace que su utilización como una prueba de rutina para testar los miles de animales involucrados en una campaña de erradicación, sea inviable. Aún así su uso ha sido propuesto como una herramienta poderosa dentro del llamado **BTB (New Zealand Blood test)**, se trata de una prueba mixta dentro de la cual se incluyen la realización de transformación de linfocitos, medida de la producción de Ac (ELISA) y medida del nivel de cofactores de inflamación (ICF), todo ello en muestras de sangre. A pesar de su precio prohibitivo el BTB ha sido utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis en ciervos con una sensibilidad mayor del 95 % y una especificidad superior al 97 %. La sensibilidad puede incrementarse si se utiliza conjuntamente con la IDTB.

La liberación de linfoquinas a partir de linfocitos T estimulados puede ser medida directamente. Una de estas linfoquinas es el gamma-interferón (GIFN) el cual interviene en los mecanismos de defensa frente a la tuberculosis ya que es un activador del metabolismo de los macrófagos. Los niveles de GIFN circulantes en animales sanos son prácticamente nulos, sin embargo cuando se instaura una respuesta de tipo celular específica frente a un determinado antígeno, sus niveles aumentan espectacularmente.

Wood et al. en 1990b describieron un ensayo biológico *in vitro* para el diagnóstico de la tuberculosis bovina basado en la **detección de GIFN**. Con posterioridad se produjeron y caracterizaron una serie de Ac monoclonales frente al GIFN bovino (Wood et al., 1990a) y se desarrolló un ELISA para la detección de GIFN liberado después de la estimulación *in vitro* con antígenos tuberculínicos de los linfocitos sensibilizados (Rothel et al., 1990).

Jones et al. en 1992 encontraron que un elevado porcentaje (42,4 %) de los sueros de animales no infectados reaccionaban positivamente al ELISA descrito para la captura de GIFN (Rothel et al., 1990). En su trabajo demostraron que estas reacciones inespecíficas eran debidas a la presencia en los sueros bovinos, de Ac heterófilos con afinidad por los Ac monoclonales tanto de captura como de detección de la prueba de ELISA; y solventaron el problema diluyendo 1/2 los sueros bovinos con PBS suplementado con caseína al 1 %, tween 20 al 0,05 % y suero normal de ratón al 5 %. El suero de ratón actuaba como absorbente de los Ac heterófilos eliminando así la reacción cruzada con los Ac del ELISA.

Rothel et al. en 1992 establecieron las condiciones ideales para el cultivo de las sangres antes del ELISA para detectar GIFN, encontrando que es necesario recoger la sangre en heparina (los demás anticoagulantes inhiben la reactividad de los linfocitos), y que ésta debe ser mantenida a temperatura ambiente hasta su cultivo. El cultivo debe realizarse en presencia de, al menos, 20 µg/ml de PPD en las primeras 8 horas tras la recogida de la muestra, y las sangres deben incubarse a 37°C en atmósfera húmeda durante 16 horas. Para cada localización geográfica es conveniente utilizar tuberculinas locales; Gorla et al. en 1993 en una prueba de campo en Italia demostraron que existe un 20 % de discrepancias en los resultados obtenidos

en la prueba dependiendo de la utilización de tuberculinas australianas o italianas.

En una prueba de campo en Australia (Wood et al., 1991) con 6.754 animales procedentes de rebaños con tuberculosis los valores de **sensibilidad** para la técnica de detección de GIFN fueron del 77-94 %, frente a cifras del 65.6 % encontrados en la misma población para la IDTB. En un estudio posterior con 1.362 animales, la sensibilidad del GIFN fue del 81,8 %, frente a un 68,1 % de la IDTB (Wood et al., 1992). Más recientemente esta técnica se ha evaluado en Irlanda en una población de 6.220 animales procedentes de rebaños infectados, encontrándose una sensibilidad del 86 % para el GIFN y del 79 % para la IDTB (Monaghan et al., 1995). En un trabajo similar realizado en Irlanda del Norte sobre una población de 94.562 animales procedentes de rebaños infectados se estimó que la sensibilidad para el GIFN era del 79,64 % y entre el 57,5 y el 85 % para la IDTB dependiendo del esquema usado para su lectura (Neill et al., 1995). Aunque ninguna de las dos pruebas (GIFN o IDTB) fue capaz de detectar a todos los animales infectados, la sensibilidad se mejora con su uso conjunto alcanzando valores medios entre el 95 % (Wood et al., 1991) y el 97 % (Monaghan et al., 1995).

La **especificidad** de la prueba de GIFN calculada en 6.337 animales procedentes de rebaños libres de tuberculosis fue del 96-98 % (Wood et al., 1991). Monaghan et al. en 1995, sobre una población de 923 vacas procedentes de rebaños libres de la enfermedad encontraron que la especificidad para el GIFN era del 94,2 %, y Neill et al. en 1995, sobre 904 animales libres de la enfermedad encontraron una especificidad del 97,68 %.

La IDTB y la prueba de liberación de GIFN no miden exactamente los mismos aspectos de la infección y por ello existe un porcentaje de animales positivos a una de la pruebas y sin embargo negativos a la otra, no encontrándose aún una explicación para este hecho.

La IDTB es más simple y más barata que la prueba de GIFN, sin embargo

además de las mejoras en la sensibilidad y especificidad, la técnica de detección de GIFN ofrece una serie de ventajas sobre la IDTB: los resultados están disponibles en 24 horas, los animales no tienen que estar controlados durante los 3 días que se requieren para la IDTB (lo cual causa importantes pérdidas por stress en aquellos animales criados en extensivo), y la prueba puede ser utilizada de una forma comparativa si se usan antígenos bovinos (PPD bovina) y aviares (PPD aviar).

Existen aún serias dudas sobre el efecto de la intradermoreacción en la prueba de liberación de GIFN. Rothel et al. en 1992 encontraron que la inoculación de PPD no ejercía ningún efecto sobre los niveles de GIFN detectados en animales no infectados. Pero sin embargo, en los animales infectados, después de la realización de la prueba tuberculínica se observaba una marcada supresión en la liberación de GIFN y la respuesta no retornaba a los niveles originales hasta 59 días después de la intradermoreacción. Por ese motivo recomendaban no realizar la prueba de GIFN hasta, al menos, 59 días después de la IDTB. Sin embargo, Buddle et al. en 1994 encontraron que sólo eran necesarios 10 días después de la IDTB para recuperar la reactividad en la prueba de GIFN.

Plackett et al. en 1989 utilizando un ELISA para la detección de Ac eran capaces de identificar un grupo de animales tuberculosos negativos a la IDTB. Wood et al. en 1991 demostraron que una prueba para detección de Ac no era capaz de detectar a ningún animal infectado que no hubiera sido ya detectado por las pruebas de inmunidad celular (IDTB y/o GIFN) y que la sensibilidad de estas pruebas era considerablemente superior a la de las pruebas serológicas. En este estudio (Wood et al., 1991) vieron que los casos de animales anérgicos a las pruebas de inmunidad celular no se debían a tuberculosis generalizadas, sino a otros factores como malnutrición, gestación y alto nivel de *stress*. Ha sido demostrado que a las 2-4 semanas después del parto los niveles de GIFN detectados retornan al estado preparto (Buddle et al., 1994). Recientemente se ha vuelto a poner de manifiesto la utilidad del GIFN en la detección de animales tuberculosos negativos a la IDTB (Neill et al., 1994b).

Aunque se ha demostrado la existencia de epítomos específicos para *M. bovis* en proteínas como MPB70, su valor práctico en pruebas diagnósticas es dudoso debido a la diversidad genética de la respuesta inmune en los animales infectados. Estos intentos en aumentar la especificidad de las pruebas diagnósticas originan una disminución en la sensibilidad de las mismas lo cual es inconcebible en el marco de una campaña de erradicación.

I.5.3 Técnicas moleculares en el diagnóstico de la enfermedad

En la última década se ha producido un sustancial avance en el diagnóstico de la tuberculosis con la introducción de nuevos métodos de diagnóstico, identificación y tipificación, que son un reflejo de la nueva tecnología disponible en el campo de la biología molecular.

I.5.3.1 Sondas de ADN

Como fue comentado previamente, la identificación de micobacterias por los métodos bioquímicos convencionales es un proceso lento y laborioso, recientemente se ha descrito el uso de sondas de ADN marcadas con el isótopo ^{125}I para la detección de microorganismos pertenecientes a los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracelulare* (Drake et al., 1987; González y Hanna, 1987; Musial et al., 1988; Peterson et al., 1989); la aplicación de estos sistemas requiere instalaciones para trabajar con radioactividad lo cual limita su uso.

Como alternativa se han desarrollado las mismas sondas marcadas con ésteres de acridinio (Arnold et al., 1989; Goto et al., 1991). El uso de estas sondas fue evaluado por Lebrun en 1992, viéndose que su sensibilidad y especificidad era del 100 %; aunque en recientes comunicaciones (Saubolle et al., 1993; Stockman et al., 1993; Butler et al., 1994) se han identificado cepas de *M. terrae* y *M. celatum* que daban resultados falsos positivos con las sondas AccuProbe (Gene Probe) para el complejo *M. tuberculosis*.

Este tipo de sondas son útiles en la identificación de los aislados de los citados

complejos, se trata de sondas de ADN que reconocen el ARN ribosómico y se encuentran disponibles comercialmente (Gen Probe Corporation) pero su sensibilidad es inaceptable para su uso directo sobre muestra clínica (Pao et al., 1988).

1.5.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue utilizada por vez primera en 1985 (Saiki et al., 1985) y fue descrita con tal nombre por Mullis y Faloona en 1987. Esta técnica permite la amplificación de secuencias específicas de ADN que se encuentren acotadas por oligonucleótidos específicos denominados cebadores o iniciadores. Mediante su uso es posible detectar material "diana" que esté presente sólo en cantidades del orden de picogramos (Oste, 1988). Es una técnica extremadamente sensible y específica (dependiendo de los iniciadores usados). Para su aplicación fue fundamental el descubrimiento de una ADN polimerasa termoestable (Kornberg, 1955) capaz de elongar al cebador unido a su secuencia diana específica mediante la incorporación de nucleótidos a su extremo 3'.

Para la aplicación mediante la PCR es necesario conocer con detalle la secuencia que se desea amplificar, para poder sintetizar los oligonucleótidos cebadores de la reacción, aunque no es necesario que la secuencia que se quiere amplificar se encuentre inicialmente presente en forma pura, sino que puede tratarse de una fracción menor en una mezcla compleja de ADN (Ej: un fragmento de un gen en todo un genoma). Para la optimización de la reacción de PCR es necesaria la titulación de sus diferentes componentes como: ADN polimerasa, $MgCl_2$, cebadores y DNA diana. La temperatura de hibridación es otro de los parámetros críticos en la reacción y debe ser fijada cuidadosamente. Con el fin de evitar amplificaciones inespecíficas no es aconsejable que el número de ciclos de amplificación exceda de 35.

Las técnicas de PCR han sido usadas en áreas básicas de investigación como el clonaje (Scharf et al., 1986) y la secuenciación (Wong et al., 1987), pero también en el desarrollo de pruebas diagnósticas (Kwok et al., 1987; Olive, 1989; Moser et al.,

1989; Van Eys et al., 1989) y en ciencias forenses (Beroldingen et al., 1987).

Debido al lento crecimiento de estos microorganismos, en la mayor parte de los laboratorios de micobacteriología se han introducido en la rutina diagnóstica el uso de técnicas de amplificación de ADN para la identificación rápida de los aislados del complejo *M. tuberculosis*. Estas técnicas también han sido ensayadas en el diagnóstico mediante su aplicación directa a muestras clínicas (esputos, tejidos, sangre etc).

En los últimos años se han utilizado diferentes dianas en las micobacterias para su amplificación por PCR, entre las principales se encuentran:

Antígeno MPB70: mediante la amplificación de fragmentos de este elemento es posible la detección específica de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Cousins et al., 1991; Wilton y Cousins, 1992; Cousins et al., 1992).

IS6110, IS986 o IS987 : este elemento sólo ha podido ser detectado en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, aunque recientemente han sido encontrados algunos aislados carentes de este elemento repetitivo (Eisenach et al., 1990; Thierry et al., 1990a; Brisson-Noel et al., 1991; Eisenach et al., 1991; Plikaytis et al., 1991; Savic et al., 1992; Victor et al., 1992; Buck et al., 1992; Veringa et al., 1992; Kolk et al., 1992; Folgueira et al., 1993; Clarridge III et al., 1993, Wilson et al., 1993; Shawar et al., 1993; Liébana et al., 1995).

IS1081: el rango de hospedadores de esta secuencia de inserción está restringido a los miembros del complejo *M. tuberculosis* (Collins and Stephens, 1991; Van Soolingen et al., 1992a).

Ag 38 KDa: se trata de un fragmento genómico específico para el complejo *M. tuberculosis* (Sjöbring et al., 1990).

Ag MPB64: la amplificación del gen que codifica para este elemento es

específica para los integrantes del complejo *M. tuberculosis* (Manjumath et al., 1991; Shankar et al., 1991; Cormican et al., 1992).

Antígeno 65 KDa: El PCR basado en la amplificación de secuencias de ADN pertenecientes al Ag 65 KDa permite la detección de cepas pertenecientes al género *Mycobacterium* (Hance et al., 1989; Pao et al., 1990; De Wit et al., 1990; Brisson-Noel et al., 1991; Pierre et al., 1991; Ghossein et al., 1992). Mediante una hibridación posterior con sondas específicas que hibridan selectivamente es posible la identificación de varias especies micobacterianas (Hance et al., 1989). Recientemente Telenti et al. en 1993 describieron otra forma de diferenciar entre especies mediante la digestión con enzimas de restricción de los productos obtenidos tras la PCR.

Ag 85 KDa: este gen es común a todas las especies del género *Mycobacterium*, sin embargo mediante PCR falló su amplificación en algunas cepas de *M. avium*, *M. gordonae*, *M. malmoense*, *M. chelonae* y *M. xenopi* (Soini et al., 1992; Fauville-Dufaux et al., 1992).

Gen *dnaJ*: Takewaki et al. en 1993 desarrollaron una reacción de PCR específica para el género *Mycobacterium* y se diseñaron sondas para la posterior hibridación de los productos de PCR capaces de identificar a los complejos *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare* y *M. kansasii*.

ARNr 16S: la molécula del ARNr 16S (constituyente del ribosoma bacteriano) es una molécula muy conservada en todas las especies bacterianas, con raros cambios en su secuencia en determinadas posiciones. Sin embargo la localización de estos cambios es específica para un grupo de especies o especie determinada (Gray et al., 1984). Esta especificidad de la secuencia del ARNr 16S y la información contenida en la misma permite el análisis filogenético y la identificación de especies una vez que se ha determinado su secuencia (Woese, 1987). Mediante la amplificación por PCR del gen que codifica para esta molécula (Edwards et al., 1989; Wilson et al., 1990) y su posterior secuenciación y análisis, pueden identificarse las regiones hipervariables que

son género, grupo o especie específicas. Mediante este sistema Böddinghaus et al. en 1990 definieron una serie de oligonucleótidos específicos para el género *Mycobacterium* y para varias de sus especies, demostrando que la amplificación por PCR de determinadas secuencias del ADNr 16S proporciona una valiosa herramienta en la detección e identificación de micobacterias.

Regiones espaciadoras de los genes ribosómicos: mediante la amplificación y posterior secuenciación de la región espaciadora entre los genes para el ARNr 16S y 32S se demostró que esta secuencia es idéntica para todos los miembros del complejo *M. tuberculosis*; de este modo se diseñó una pareja de iniciadores específicos para este grupo de micobacterias (Glennon et al., 1994)

*mtp40*: este fragmento genómico fue definido como especie-específico para *M. tuberculosis* por Parra et al. en 1991. Este gen codifica para una proteína de 13.8 KDa específica de la especie *M. tuberculosis* y puede tener importancia en la elaboración de pruebas para la identificación de la misma. Los oligonucleótidos PT1 y PT2 que corresponden a los nucleótidos 9 al 25 y 385 al 401, fueron deducidos a partir de su secuencia y se usaron como iniciadores en una reacción de PCR (Del Portillo et al., 1991).

Los valores de sensibilidad obtenidos al aplicar las técnicas de PCR al diagnóstico directo sobre muestras clínicas humanas (esputos) han oscilado entre el 55,9 % (Soini et al., 1992), el 86 % (Clarridge III et al., 1993), y hasta valores superiores al 90 % (Wilson et al., 1993; Savic et al., 1992). En todos los casos la especificidad de la técnica ha sido muy alta aunque se ha puesto de manifiesto la necesidad de prevenir al máximo las posibilidades de contaminación cruzada entre las muestras mediante una clara separación en las diferentes zonas de trabajo y con la inclusión de controles negativos de extracción y de reacción.

En el caso de la tuberculosis bovina, con la aplicación del PCR a muestras tisulares la sensibilidad de la técnica fue de un 71,4 % (Liébana et al., 1995). Se han realizado estudios preliminares sobre la aplicación de la técnica a muestras de sangre

(Barry et al., 1993) pero aún no se conocen trabajos a mayor escala.

Plikaytis et al. en 1991 propusieron un método basado en técnicas moleculares para diferenciar entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. El método que proponen se basa en la amplificación por PCR de la secuencia de inserción IS6110 y en la estimación del número de copias presentadas de este elemento. El criterio que proponen para la diferenciación es el hecho de que *M. tuberculosis* presenta un elevado número de copias de este elemento mientras que *M. bovis* y *M. bovis* BCG sólo llevan 1 o 2 copias del mismo. Recientes descubrimientos de cepas de *M. bovis* con elevado número de copias de IS6110 y de cepas de *M. tuberculosis* carentes de la citada secuencia hacen que la especificidad de esta prueba no sea adecuada para su uso en la identificación de aislados.

I.6 TIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE *M. bovis* MEDIANTE ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS.

M. bovis es aún uno de los agentes causantes de enfermedades infecciosas más importante en la industria ganadera de muchos países. Debido a que es capaz de infectar a una gran variedad de especies, tanto domésticas como salvajes e incluso al hombre, hay una gran necesidad de definir los principales reservorios y las rutas de transmisión entre ellos (Huitema, 1988). Una de las herramientas más poderosas para el estudio de la epidemiología de las micobacterias patógenas es la diferenciación de cepas. Ni las diferencias fenotípicas (Barrow, 1981) ni la fagotipia (Crawford y Bates 1984) permiten una discriminación suficiente entre cepas para su uso en la epidemiología de *M. bovis*, por ello se ha recurrido a la utilización de técnicas genéticas de tipificación. Estas técnicas, basadas en diferencias genéticas (polimorfismos del ADN), están siendo aplicadas cada vez con mayor frecuencia a estudios taxonómicos e investigaciones epidemiológicas.

I.6.1 Análisis de polimorfismos genéticos por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

El descubrimiento de las enzimas de restricción ha sido el hecho más importante en el desarrollo de la biología molecular, desde aquel momento se han desarrollado múltiples técnicas a velocidades vertiginosas. Las enzimas de restricción fueron usadas por primera vez para caracterizar y tipificar cepas de *Leptospira* (Marshall et al., 1981); esta técnica, antes conocida como BRENDA (*Bacterial Restriction Enzyme DNA Analysis*), ha sido usada desde entonces por multitud de investigadores en la caracterización y tipificación de bacterias, virus y parásitos. Hoy en día se la conoce con el nombre de *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) del ADN genómico, también llamado REA (*Restriction Endonuclease Analysis*).

El REA ha sido utilizado con éxito por varios autores para tipificar aislados del complejo *M. tuberculosis* (Collins y De Lisle, 1984, 1985, 1987; Collins et al., 1986, 1988). Con esta técnica se pueden establecer un gran número de tipos para *M. bovis*,

y los patrones de restricción generados son lo suficientemente estables en el tiempo y pueden relacionarse con áreas geográficas determinadas (Collins et al., 1986, 1988), lo cual permite su aplicación en epidemiología. El REA ha sido utilizado en el estudio de la transmisión de la infección entre ganado y possums (Collins et al., 1986, 1988) y en estudios de brotes de TB en gatos (De Lisle et al., 1990) y focas (Cousins et al., 1990, 1993a). Sin embargo para su aplicación se deben analizar, al menos, 3 enzimas por cada cepa y se necesita un gran poder de resolución en las electroforesis de los geles para poder poner de manifiesto las ligeras diferencias entre los patrones (Cousins et al., 1993a y b). Además, la comparación de los patrones es dificultosa debido al gran número de bandas que se generan. Todo ello complica el análisis cuando se maneja un gran número de aislados.

La técnica puede mejorarse si se consigue que sólo se pongan de manifiesto los fragmentos polimórficos de restricción mediante el uso de sondas específicas dirigidas a determinadas regiones. La transferencia de fragmentos de ADN a membranas de nitrocelulosa o nylon mediante capilaridad o vacío, y el desarrollo de las técnicas de hibridación con ADN ha posibilitado un estudio más discriminativo de los RFLP permitiendo el estudio de genes individuales.

Stull en 1988 propuso la utilización de una sonda de amplio espectro en estudios de epidemiología molecular, esta sonda consistía en ARN ribosómico de *E. coli*. La técnica, llamada ribotipificación, presenta la ventaja de utilizar una sonda común que se encuentra repetida un cierto número de veces en el genoma de la mayoría de especies bacterianas (Romaniuk, 1987; Stull, 1988; Snipes, 1989), esta simplicidad permite su aplicación en cualquier laboratorio siendo más fácil su estandarización y la comparación de resultados obtenidos en diferentes lugares. Desafortunadamente esta técnica no puede aplicarse a la tipificación de micobacterias ya que las micobacterias de crecimiento lento poseen sólo una copia del gen para el ARNr (Bercovier et al., 1986; Suzuki et al., 1987).

En las cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se han identificado 5 diferentes elementos genéticos que contribuyen a la diferenciación entre cepas y que pueden ser útiles en estudios epidemiológicos. Dos de estos son las secuencias de inserción IS6110 e IS1081, y los otros tres son secuencias cortas repetitivas de ADN

que se encuentran intercaladas en el genoma. La función precisa de todas estas secuencia repetitivas es aún desconocida.

La secuencia **IS6110**, **IS986** o **IS987** es un miembro de la familia IS3 de elementos de inserción, se han secuenciado 3 copias de esta secuencia y entre ellas sólo difieren en unas pocas bases (Thierry et al., 1990a y b; McAdam et al., 1990; Hermans et al., 1991). Esta IS tiene una longitud de 1.361 pb y en sus extremos posee repeticiones invertidas de 28 pb (con 3 bases de error). Fue descrita como una secuencia específica de las especies del complejo *M. tuberculosis*, aunque en un reciente estudio se encontró homología entre **IS6110** y 6 cepas de *Mycobacterium* spp utilizando una técnica de *Nested* PCR; y nuestro laboratorio comunicó la amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos INS-1/INS-2, de un fragmento de tamaño compatible con el esperado para **IS6110**, en una cepa de *M. ulcerans* y una cepa de *M. gilvum* (Liébana et al., 1996). Debido al número de copias tan variable de esta IS y a que los lugares de integración en el genoma son también variables, las cepas epidemiológicamente no relacionadas muestran un alto grado de polimorfismo en los fragmentos de restricción que contienen a la secuencia (Hermans et al., 1990b; Cave et al., 1991; Mazurek et al., 1991; Mendiola et al., 1992).

Estos polimorfismos se deben presumiblemente a la capacidad potencial de la IS para "moverse" o cambiar de posición en el cromosoma sin demasiada preferencia por el lugar de integración (Hermans et al., 1990a y b, 1991). La transposición de **IS6110** origina la duplicación de una secuencia corta en el lugar de integración en el genoma (McAdam et al., 1990) y estas trasposiciones son la base de los polimorfismos entre cepas. El extremadamente alto grado de polimorfismos observado con **IS6110** dentro de las cepas de *M. tuberculosis* parece sugerir que se trate de un elemento muy inestable con una gran movilidad en el genoma. Sin embargo se cree que la frecuencia de transposición es relativamente baja, ya que nunca ha sido observada la transposición de este elemento durante prolongados períodos de cultivo *in vitro* o de crecimiento *in vivo* (Hermans et al., 1990b; Van Soolingen et al., 1991; Rastogi et al., 1992).

Las cepas de *M. tuberculosis* y *M. africanum* generalmente presentan múltiples

copias (hasta 19) en diferentes regiones de su genoma y se ha comprobado que esta IS es un excelente marcador para la diferenciación entre las cepas de *M. tuberculosis* (Van Embden et al., 1992). Las cepas de *M. bovis* procedentes de animales salvajes (antílopes, monos, focas etc...) y de cabras (Gutiérrez et al., 1995) llevan también múltiples copias de IS6110 (Van Soolingen et al., 1994). Sin embargo las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado bovino, *M. bovis* BCG, así como las de *M. tuberculosis* de Asia y Africa sólo suelen llevar una copia de IS6110 y generalmente en un mismo lugar de su genoma (en un fragmento de restricción por *PvuII* de 1,9 kb), lo cual limita su uso en la diferenciación de las mismas. Recientemente ha sido comunicada la existencia de cepas de la India carentes de este elemento (Van Soolingen et al., 1993; Yuen et al., 1993; Liébana et al., 1996).

La inmensa mayoría de las cepas del complejo *M. tuberculosis* que llevan sólo una o dos copias del elemento, lo hacen en un determinado *locus* del cromosoma (región DR) que puede ser considerado como un lugar preferente para la integración de esta secuencia (Hermans et al., 1991). Parece ser que aunque la secuencia mantiene su capacidad de "saltar" desde este *locus*, no lo hace tan frecuentemente como desde otras localizaciones. Van Soolingen et al. en 1993 investigaron varias cepas asiáticas de *M. tuberculosis* no relacionadas epidemiológicamente y que contenían sólo 2 copias de IS6110; todas ellas llevaban las copias en fragmentos de restricción por *PvuII* de idéntico tamaño y sin embargo se mostraron como cepas diferentes al ser analizadas con otros marcadores genéticos (DR, PGRS), este resultado podría sugerir que quizás existe un segundo sitio preferente de integración para IS6110 en el cromosoma micobacteriano.

Se ha comprobado que IS6110 es un excelente marcador para la diferenciación entre las cepas de *M. tuberculosis* que son multicopia para este elemento, y ha sido utilizado en estudios epidemiológicos en la investigación de varios brotes de tuberculosis, comprobándose que los patrones obtenidos de cepas relacionadas epidemiológicamente son similares y que sin embargo existe una enorme diversidad de tipos de RFLP en cepas sin relación epidemiológica (Hermans et al., 1990b; Otal et al., 1991; Mazurek et al., 1991; Van Soolingen et al., 1991, 1993; Van Embden et al., 1992, 1993; Das et al., 1993). Sin embargo, varios autores han demostrado que el uso

de esta IS como sonda no permite la diferenciación entre las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado bovino, así como *M. tuberculosis* de Asia y Africa que sólo suelen llevar una copia de IS6110 (Collins et al., 1993; Cousins et al., 1993b; Van Soolingen et al., 1994).

La segunda secuencia de inserción **IS1081**, descubierta por Collins y Stephens en 1991, está igualmente presente en todas las especies del complejo *M. tuberculosis*. Esta secuencia está relacionada con la IS256 de *Staphylococcus aureus*, su longitud es de 1.324 pb. Posee extremos con secuencias repetidas e invertidas de 15 pb, así como secuencias repetitivas que lo flanquean. Al contrario que con IS6110, el número de copias de esta IS en el genoma es bastante constante (de 5 a 7) y los lugares de inserción en el cromosoma son también similares de unas cepas a otras. Recientes estudios han demostrado que **IS1081** no es de gran utilidad en la epidemiología de la tuberculosis (Van Soolingen et al., 1992a, 1993; Collins et al., 1993), aunque *M. bovis* BCG puede diferenciarse del resto de las especies del complejo *M. tuberculosis* ya que en esta especie aparece específicamente una copia de **IS1081** en un fragmento de restricción por *PvuII* de 8 kb.

Además de las mencionadas IS (secuencias de inserción) existen tres tipos de pequeños elementos repetitivos asociados con los polimorfismos del ADN dentro del complejo *M. tuberculosis* y que son: **MPTR (Major Polymorphic Tandem Repeat)** (Hermans et al., 1992), **DR (Direct Repeat)** (Hermans et al., 1991), **PGRS (Polimorphic GC Rich Repeat)** (Ross et al., 1992).

Los **MPTR** son secuencias de 10 pares de bases repetidas en *tándem* e invariablemente separadas por espaciadores de una longitud de 5 pb. Dado que las secuencias repetitivas son ligeramente heterogéneas en secuencia se las denominó como *tándem* mayor de repeticiones polimórficas (MPTR). Estas secuencias se encuentran presentes en los miembros del complejo *M. tuberculosis*, excepto *M. africanum* y también aparecen en *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. asiaticum*, *M. gastri*

y *M. szulgai*. El uso de los MPTR (*Major Polymorphic Tandem Repeat*) en estudios epidemiológicos fue investigado por Hermans et al. en 1992, demostrando que este elemento repetitivo no es útil en la tipificación de aislados de *M. tuberculosis* por RFLP pero si lo es en aislados de *M. gordonae* y *M. kansasii*.

Los **DR** son secuencias de 36 pares de bases directamente repetidas que se encuentran intercaladas en la región de ADN que flanquea a la *IS6110* y que están separadas por espaciadores de ADN con una longitud de 36 a 41 pares de bases. El conjunto de secuencias DR está localizado en un solo *locus* del cromosoma y el número de DR varía en las diferentes cepas del complejo *M. tuberculosis*. Hermans et al. en 1991 mostraron que aproximadamente el 85 % de las cepas de *M. tuberculosis* que investigaron, llevaban una o dos copias de *IS6110* en la región DR del cromosoma, por ello el *locus* DR está considerado como un lugar preferente para la integración de la *IS6110* y parece ser que esta IS no tiene la capacidad de moverse desde esta región tan fácilmente como lo hace desde otras localizaciones genómicas (Hermans et al., 1991). La utilidad de los DR (*Direct Repeat*) como sondas en el RFLP para la diferenciación de micobacterias ha sido estudiada recientemente (Van Soolingen et al., 1993, 1994), y se han mostrado útiles tanto en cepas de *M. tuberculosis* como en cepas de *M. bovis*. Parece ser que los polimorfismos existentes entre cepas en esta región se deben a fenómenos de recombinación homóloga entre DRs cercanos o distantes (Groenen et al., 1993)

Los **PGRS** son secuencias polimórficas repetitivas cortas de unos 24 pb separadas por espaciadores de longitudes variables. Se encuentran presentes en, al menos, 30 copias por genoma y aparecen en las especies del complejo *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. gastri* y *M. szulgai*. Al contrario que los DR que están localizados en un solo *locus*, los PGRS están presentes en varios *loci* cromosómicos en cada uno de los cuales existen múltiples copias de la secuencia. Han sido secuenciados 2 segmentos cromosómicos cada uno de ellos con múltiples copias y con una estructura diferente (Ross et al., 1992; Doran et al., 1993). Los PGRS (*Polimorphic GC Rich Repeat*) han sido utilizados con éxito para el estudio de la epidemiología de *M. bovis* (Ross

et al., 1992; Cousins et al., 1993 a y b; Van Soolingen et al., 1994) obteniendo resultados mejores que los encontrados con la sonda DR. Los mejores resultados se obtienen con el uso de *AluI* para la digestión del ADN genómico y sondas dirigidas a la secuencia de PGRS. Los fenómenos por los que se originan los polimorfismos de esta región son aún desconocidos. Aunque no existen datos sobre la estabilidad de los patrones generados con PGRS, ciertos estudios sugieren que es similar a la de los patrones de IS6110 (Dwyer et al., 1993) y que por ello son bastante estables (Van Soolingen et al., 1994).

Se ha comprobado que ciertos elementos repetitivos de ADN son más inestables que otros, esto abre la posibilidad de utilizar a estos elementos como "relojes moleculares diferenciales" para determinar las distancias evolutivas entre cepas del complejo *M. tuberculosis* y parece claro que el paso del "reloj" IS1081 es más lento que el de los "relojes" IS6110, DRs y PGRSs. Un factor que hace difícil utilizar a las IS para tal fin es el hecho de la fuerte dependencia existente por un determinado locus para la transposición; sin embargo los DRs, MPTRs y PGRSs podrían ser más útiles en la medida cuantitativa de relaciones evolutivas ya que las reorganizaciones causadas por estos elementos se producen de una forma totalmente aleatoria (Van Soolingen et al., 1993).

1.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa mediante emparejamiento aleatorio (RAPD).

El RFLP esta ampliamente reconocido como útil para el estudio de la epidemiología de la tuberculosis, sin embargo requiere el uso de ADN purificado, una restricción enzimática y una transferencia de los fragmentos obtenidos a una membrana para su posterior hibridación con la sonda apropiada. Este proceso es largo, por ello sería de gran utilidad encontrar técnicas mas rápidas y sencillas.

La técnica RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) descrita por primera vez por Williams et al., 1990; está basada en la utilización de uno o varios iniciadores elegidos al azar para una reacción de PCR con una baja temperatura de emparejamiento, de esta forma se favorece un elevado número de uniones poco específicas de los iniciadores y por lo tanto se generan múltiples productos de amplificación. La técnica es rápida, requiere menos ADN que otras, y para su aplicación no es necesario conocer características especiales del genoma a estudiar. Esta técnica ha sido utilizada en la tipificación de microorganismos de varios géneros: *Campylobacter* (Mazurier et al., 1992), *Candida* (Lehmann et al., 1992), *Streptococcus* (Versalovic et al., 1993), *Listeria* (MacGowan et al., 1992), *Lactococcus* (Cancilla et al., 1992), *Helicobacter* (Akopyanz et al., 1992), *Haemophilus* (Myers et al., 1993), etc... La técnica de RAPD es también útil en estudios filogenéticos y puede ser utilizada para construir mapas genéticos en una variedad de especies (Williams et al., 1990).

La aplicación de la técnica a microorganismos del complejo *M. tuberculosis* (Palittapongarnpim et al., 1993; Linton et al., 1994; Aranaz et al., 1995) ha demostrado su utilidad en la tipificación rápida de estas especies, aunque la técnica presenta graves inconvenientes ya que existen múltiples factores que afectan a la repetibilidad de los resultados obtenidos (Linton et al., 1994; Aranaz et al., 1995) y por tanto es difícil la comparación de resultados entre diferentes laboratorios. Mediante su aplicación se ha podido establecer grupos de aislados relacionados epidemiológicamente en la especie *M. tuberculosis* (Palittapongarnpim et al., 1993; Linton et al., 1994).

I.6.3 Polimorfismos en la región de repeticiones directas (DVR spooligotopificación).

Recientemente ha sido descrita una técnica rápida mediante PCR para la tipificación de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* conocida como DVR spooligotopificación (Groenen et al., 1993). Está basada en los polimorfismos existentes en un sólo locus del cromosoma, la región DR, que se encuentra sólo en microorganismos del complejo *M. tuberculosis*.

Una cepa contiene muchos espaciadores diferentes, la mayoría de ellos están presentes sólo una vez en la región DR, pero algunos aparecen dos veces separados bien por un sólo DR o por varios DRs y otros espaciadores. Cuando se compararon las regiones DR de varias cepas, se vio que el orden de los espaciadores es casi el mismo en todas las cepas pero con deleciones/inserciones de DRs y espaciadores. Parece ser que los mecanismos implicados en estos polimorfismos son dobles, por una parte la existencia de recombinaciones homólogas entre DRs próximos o distantes y por otra mecanismos de deleción, duplicación e inversión que ocurren asociados a la transposición de la IS6110 (Groenen et al., 1993).

La técnica se basa en el análisis de secuencias de amplificación generadas por PCR en la región de DR, estas secuencias consisten en consecutivos oligonucleótidos 5' que contienen a los diferentes espaciadores que separan a los DR. Mediante el análisis de estas secuencias se pueden calcular las relaciones filogenéticas entre las diferentes cepas. La técnica puede aplicarse directamente a muestras clínicas sin necesidad de contar con ADN purificado.

I.6.4 Utilización práctica de la tipificación en la epidemiología de *M. bovis*.

La técnica de RFLP ha sido y está siendo utilizada de una manera rutinaria en estudios epidemiológicos de tuberculosis humana producida por *M. tuberculosis*; mediante su aplicación se han estudiado brotes de la enfermedad, infecciones nosocomiales, transmisión entre enfermos de SIDA, y diseminación de cepas multiresistentes (Cave et al., 1991; Beck-Sagué et al., 1992; Edlin et al., 1992; Fischl et al., 1992). Sin embargo, hasta el momento, sólo se ha realizado un limitado número de estudios de epidemiología molecular de *M. bovis*, entre ellos y con el objeto de resaltar la utilidad de estas técnicas pueden destacarse:

* Mediante REA se demostró en Nueva Zelanda que existe relación entre el tipo de aislado y la procedencia geográfica del mismo, pudiéndose de este modo establecer áreas en las que la enfermedad era endémica y donde estaba producida por un tipo determinado de cepa (Collins et al., 1986).

* Con la misma técnica y en el mismo país se demostró que los possum actuaban como reservorio salvaje de la enfermedad para el ganado bovino (Collins et al., 1988). Asimismo se demostró la transmisión de cepas desde tejones al ganado en Irlanda (Collins et al., 1994).

* La técnica de RFLP con los elementos IS6110, DR y PGRS ha sido utilizada por varios autores en estudios epidemiológicos de *M. bovis*, y se ha mostrado útil en la demostración de la transmisión del agente (Cousins et al., 1993a), la identificación del origen de brotes de infección tanto en animales como en el hombre (Van Soolingen et al., 1994), y en la localización de posibles subpoblaciones de *M. bovis* con mayor especificidad por ciertas especies animales como focas (Cousins et al., 1993a; Romano et al., 1995) o cabras (Gutiérrez et al., 1995).

Debido a lo prometedor de estos estudios, la mayoría de los países en los que la tuberculosis bovina está próxima a su erradicación, están dirigiendo sus esfuerzos a la creación de una base de datos en la que se almacenen los tipos de RFLP representativos de las cepas causantes del problema. La utilización de una metodología estandarizada permite la comparación de los tipos encontrados entre distintas bases de datos, pudiendo en un futuro próximo localizarse con exactitud y rapidez el origen de una cepa.

CAPITULO I

**ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS TRATAMIENTOS DE
DESCONTAMINACIÓN EN EL AISLAMIENTO PRIMARIO DE
M. bovis A PARTIR DE MUESTRAS TISULARES**

II.1	OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO	91
-------------	-------------------------------------	-----------

II.2 MATERIAL Y MÉTODOS

II.2.1	Muestras sometidas al estudio	92
II.2.2	Bacteriología	92

II.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
-------------	-------------------------------	-----------

II.1 OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO.

La mayoría de las muestras tisulares remitidas para el aislamiento de *M. bovis* contienen una flora microbiana acompañante. Estas bacterias y hongos podrían enmascarar con su crecimiento a *M. bovis*, el cual como ya se ha comentado, es un crecedor lento. Por ello es necesaria la descontaminación de los especímenes con ácidos, álcalis o detergentes antes de su cultivo.

El grado de contaminación y las especies de contaminantes presentes en las muestras varían mucho según la naturaleza de la muestra y según su origen anatómico y geográfico. Por ello no es posible recomendar el uso de un descontaminante para su aplicación universal, ya que su eficacia va a depender a su vez de los citados factores. Los reactivos elegidos para la descontaminación deben ejercer el mínimo efecto sobre la viabilidad de las micobacterias y sin embargo deben ser capaces de destruir completamente la flora contaminante. Como ya hemos comentado, *M. bovis* gracias a su pared lipídica, tiene una mayor resistencia a ciertos agentes desinfectantes que el resto de las bacterias, lo cual es aprovechado para la descontaminación de las muestras en las que se haya presente. Hasta el momento no se conoce ningún agente desinfectante que carezca por completo de toxicidad para *M. bovis*. Los tratamientos actualmente más extendidos en los laboratorios de micobacteriología son: el método de descontaminación propuesto por Tacquet y Tison en 1961, basado en el uso combinado del laurilsulfato de sodio (SDS) al 3 % y NaOH al 1 %, y el tratamiento con cloruro de hexadecil-cetil-piridinio (HPC) a concentraciones del 0.075 al 0.75 % en función de la contaminación de la muestra (Corner y Trajstman, 1988).

El objetivo de este trabajo ha sido establecer cual de los dos tratamientos ofrece un mejor resultado en el primoaislamiento de *M. bovis* a partir de tejidos bovinos bajo las condiciones de nuestro laboratorio. Además los tratamientos de descontaminación se han comparado en paralelo con la utilización de 2 medios de cultivo: medio de Löwenstein-Jensen con piruvato y medio de Coletsos (bioMérieux, España).

II.2 MATERIAL Y MÉTODOS

II.2.1 Muestras sometidas al estudio

En este estudio se procesaron 224 muestras tisulares bovinas (en su mayoría ganglios linfáticos) procedentes de ganado sospechoso de tuberculosis (positivos a intradermotuberculinización y/o a liberación de GIFN). De estas 224 muestras, 148 presentaron lesiones macroscópicas de aspecto tuberculoso.

Las muestras se recogieron en un matadero donde los animales fueron examinados siguiendo una técnica de rutina (Corner et al., 1990). En su mayoría las muestras fueron seccionadas bajo las condiciones de matadero para la detección de posibles lesiones, lo cual nos hacía prever un alta carga microbiana en las mismas. Los especímenes así recogidos, se colocaron en contenedores estériles y se enviaron al laboratorio donde se mantuvieron congeladas a -80°C hasta el momento de su cultivo.

II.2.2 Bacteriología

Siempre que fue posible, las muestras se dividieron en porciones iguales y una de las mitades se mantuvo congelada para realizar un análisis confirmatorio en caso de necesidad. Todas las muestras se descongelaron a 4°C y se procesaron como se indica a continuación: Los especímenes se disecaron de grasa y tejido conectivo mediante una técnica estéril (en cabina biológica BIO-II B y con material estéril). Dos porciones de aproximadamente 2 g de tejido (procedente de áreas con lesiones cuando estas existían, o de áreas representativas escogidas al azar en el caso de muestras sin lesiones visibles) se desmenuzaron finamente con ayuda de un bisturí estéril. Uno de los dos alícuotas se descontaminó con NaOH/SDS y el otro con HPC.

1) Descontaminación con NaOH/SDS:

Los 2 gramos de tejido desmenuzado fueron homogeneizados durante 15 minutos con 3 ml de agua ultrapura estéril en un stomacher (FSE Ltd.). Seguidamente

se separaron 2 ml del homogeneizado a un tubo de centrifuga, al cual se le añadió 3 ml de la solución descontaminante (NaOH al 1 %, SDS al 3 %), después de mezclar por agitación fuerte, la mezcla se incubó en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de contacto, la muestra descontaminada se neutralizó con ácido ortofosfórico al 8,75 %, utilizando púrpura de bromocresol como indicador de pH (color violeta en condiciones básicas y amarillo en condiciones ácidas). Seguidamente la muestra se concentró por centrifugación a 3.500 rpm (centrífuga SIGMA 3-10) durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se procedió a la siembra del sedimento a razón de 0,25 ml por tubo de cultivo.

2) Descontaminación con HPC:

Los 2 gramos de tejido desmenuzado fueron homogeneizados durante 15 minutos con 10 ml de agua ultrapura estéril en un stomacher (FSE Ltd.). Todo el homogeneizado se transvasó a un tubo de centrifuga al cual se le añadió 10 ml de una solución de HPC al 0,75 %, esta mezcla fue incubada en agitación fuerte durante 30 minutos. Posteriormente la muestra se concentró por centrifugación a 3.500 rpm (centrífuga SIGMA 3-10) durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante por decantación y se procedió a la siembra del sedimento utilizando para ello escobillones de algodón estériles. Cada tubo se sembró 3 veces con inóculo recogido de la forma indicada.

Para la siembra de cada muestra se utilizaron 1 tubo de medio de Löwenstein-Jensen con piruvato y 1 tubo de medio de Coletsos, ambos de bioMérieux, España. Los tubos se incubaron a 37°C en atmósfera aerobia, y se examinaron para ver posible crecimiento a los 5, 7 y 10 días y después semanalmente hasta los 4 meses, período al cabo del cual si no se observaba crecimiento la muestra se clasificaba como negativa. Las colonias sospechosas de ser micobacterias se examinaban mediante tinción de Ziehl-Neelsen (Carleton, 1967) y su pertenencia al complejo *M. tuberculosis* se comprobaba utilizando el PCR múltiple para los genes ARNr 16S/MPB70 diseñado por Wilton y Cousins en 1992.

II.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cultivo microbiológico de las 224 muestras tisulares estudiadas se recogen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultado del aislamiento de *M. bovis* a partir de tejidos utilizando diferentes combinaciones de tratamiento de descontaminación/medio de cultivo.

	Número de positivos	Número de negativos	Número de contaminaciones
HPC/Coletsos	114	53	57
HPC/Löwenstein	118	60	46
NaOH-SDS/Coletsos	64	49	111
NaOH-DSD/Löwenstein	78	66	80
TOTAL	374	228	294

Los resultados del tiempo medio necesario para el primoaislamiento en los distintos medios y con los diferentes tratamientos de descontaminación se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Tiempo medio de crecimiento (en días) para el primoaislamiento de *M. bovis*.

	Coletsos	Löwenstein-Jensen
HPC	30,6	35,5
NaOH/SDS	40,8	44,8

La Tabla 3 refleja la eficacia comparada de los tratamientos de descontaminación estudiados.

Tabla 3. Valoración de los tratamientos NaOH/SDS *versus* HPC en la descontaminación de muestras tisulares.

	Nº de muestras contaminadas tras el tratamiento con NaOH/SDS pero no con HPC.	Nº de muestras contaminadas tras el tratamiento con HPC pero no con NaOH/SDS.
Coletsos	65	12
Löwenstein	52	18

Los resultados mostrados indican que con la utilización de HPC como descontaminante se consigue un 20 % más de cultivos positivos que con el tratamiento con NaOH/SDS. Asimismo, el riesgo de contaminación durante el tiempo del cultivo fue un 19,64 % inferior al descontaminar las muestras con HPC. Los resultados de nuestro estudio, así como los obtenidos en estudios similares por otros autores (Corner y Trajstman, 1988; Corner et al., 1995), recomiendan el uso del HPC ya que, hasta el momento, es el agente descontaminante que se considera menos tóxico para *M. bovis*. Aún así este detergente es también tóxico para *M. bovis* y nunca debe ser utilizado a concentraciones superiores al 0,75 %, y el tiempo de contacto con la muestra nunca debe exceder de 60 minutos (Corner, 1989). Otra de las ventajas de la descontaminación con HPC frente al NaOH/SDS es que el método es más simple y rápido y no se requiere el paso de neutralización.

Varios estudios (Kubica et al., 1963; Krasnow y Wayne, 1966; Mitchison et al., 1972 y Vestal, 1981) han puesto de manifiesto la destrucción de organismos del complejo *M. tuberculosis* después de la exposición al NaOH. *M. bovis* es especialmente sensible a los tratamientos con álcalis, y por ello debe vigilarse la concentración de NaOH utilizada (nunca superior al 2%) y el tiempo de contacto (nunca superior a 30 minutos).

Si se establecen comparaciones entre los dos medios de cultivo se observa que en Löwenstein-Jensen se consigue un 4 % más de cultivos positivos y que el riesgo de contaminación es un 9,4 % menor que con la utilización del medio de Coletsos. Independientemente del tipo de medio utilizado, el número de veces en los que los cultivos se contaminaron tras el tratamiento con NaOH/SDS sin que lo hicieran con la descontaminación con HPC, fue mucho mayor que a la inversa. Estos datos sugieren que el tratamiento con HPC fue más eficaz en la destrucción de la flora contaminante.

Respecto a la influencia del tratamiento descontaminante en la velocidad de crecimiento, se ha comprobado que tras el tratamiento con HPC el primoaislamiento de *M. bovis* se consigue una media de 10 días antes que con la utilización de NaOH/SDS (33 frente a 43 días). En cuanto a la influencia del medio de cultivo hemos observado que en el medio de Coletsos el crecimiento aparece una media de 4,5 días antes que en Löwenstein-Jensen (35,7 frente a 40,21 días).

Además, y como una constante en todos los cultivos realizados, se observó que el número de colonias conseguidas fue mucho más elevado cuando se utilizó HPC para la descontaminación.

Los resultados obtenidos para los medios de cultivo estudiados están de acuerdo con la formulación de los mismos. El medio de Coletsos es un medio especialmente pensado para el crecimiento de *M. bovis*, y su composición en nutrientes es más rica que la del Löwenstein-Jensen; esto podría ser la explicación de que la rapidez de cultivo sea mayor al utilizar medio de Coletsos pero que sin embargo se contamine con mayor facilidad. Algunos autores han comunicado que cuando se utiliza HPC para la descontaminación, la muestra debe sembrarse en medios con base de huevo ya que el HPC es inactivado por los componentes del mismo y por lo tanto no se genera una acción residual del descontaminante (Smithwick et al., 1975). Sin embargo otros autores no comparten esta teoría y en sus estudios han utilizado medios cuya base es el agar sin problemas de pérdida de

viabilidad de *M. bovis* por acciones residuales del HPC (Corner y Trajstman, 1988; Corner et al., 1995).

Como conclusión del estudio cabe destacar que en el primoaislamiento de *M. bovis* a partir de tejidos en nuestro laboratorio, el protocolo óptimo es la descontaminación con HPC, seguida de la siembra en los medios de Coletsos (por la rapidez del crecimiento) y Löwenstein-Jensen (por la menor posibilidad de contaminación). En aquellas muestras que se observe contaminación tras el uso del HPC se recomienda realizar una descontaminación con NaOH/SDS y si la contaminación persiste, una descontaminación doble seriada, primero con HPC y después con NaOH/SDS.

Es de destacar que utilizando este esquema de descontaminación en este estudio se consiguió aislar *M. bovis* a partir de 128 (87 %) de los 148 tejidos con lesiones, y de 12 de los 76 tejidos sin lesiones visibles. Estas cifras de sensibilidad sel cultivo respecto a la presencia de lesiones macroscópicas son similares a las encontradas (89 %) en otros estudios (de Lisle et al., 1995). Existen varias posibles razones para que el cultivo de *M. bovis* a partir de una lesión falle, y entre ellas están: la posibilidad de que un porcentaje de esas lesiones no se deba realmente a infecciones por micobacterias (Tammemagui et al., 1973), y que la congelación/descongelación de las muestras y los tratamientos de descontaminación de las mismas, provoquen una disminución de la viabilidad de los bacilos tuberculosos.

CAPITULO II

EVALUACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DIFERENCIACIÓN DE ESPECIES DENTRO DEL COMPLEJO *Mycobacterium tuberculosis*

III.1	OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO	99
III.2 MATERIAL Y MÉTODOS		
III.2.1	Cepas bacterianas utilizadas en el estudio	101
III.2.1.1	Micobacterias pertenecientes al complejo <i>M. tuberculosis</i>	101
III.2.1.2	Micobacterias pertenecientes al complejo <i>M. avium intracellulare</i> <i>scrofulaceum</i> (MAIS)	103
III.2.1.3	Micobacterias atípicas	103
III.2.2	Cultivo de las cepas bacterianas	106
III.2.3	Preparación de las muestras para la PCR	110
III.2.3.1	Preparación de las suspensiones bacterianas inactivadas	110
III.2.3.2	Extracción del ADN	110
III.2.3.3	Medida espectrofotométrica de la concentración del ADN	112
III.2.3.4	Cuantificación del ADN mediante la prueba comercial GIBCO BRL Fastcheck	112
III.2.4	Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR	115
III.2.5	Amplificación del ADN mediante PCR	117
III.2.6	Análisis de los productos de la amplificación	119
III.2.7	Prueba de la inmunoperoxidasa	120
III.3 RESULTADOS		

III.3.1	Titulación y cálculo de la concentración óptima de los componentes de la PCR	122
III.3.1.1	Titulación de la concentración de MgCl ₂	122
III.3.1.2	Titulación de la <i>Thermus thermophilus</i> ADN polimerasa ..	123
III.3.1.3	Titulaciones de los oligonucleótidos cebadores de la reacción Diseño y evaluación de una PCR múltiple para la identificación de <i>M. tuberculosis</i>	123
III.3.2	Estudio por PCR del espectro de hospedadores de las secuencias IS6110, IS1081, MPB70 y mtp40 en las cepas de micobacterias .	126
III.3.3	Resultados de la aplicación del test de la inmunoperoxidasa para detectar el antígeno MPB70	128
III.4	DISCUSIÓN	130

III.1 OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO

La identificación de los aislados de micobacterias está comúnmente basada en observaciones macroscópicas tales como velocidad de crecimiento, pigmentación y morfología de las colonias, y en pruebas bioquímicas convencionales. Todos ellos son procedimientos muy lentos cuando se trata de microorganismos incluidos en el complejo *M. tuberculosis*, debido a que su velocidad de crecimiento es extremadamente lenta (hasta 5 meses en el caso de *M. bovis*).

Recientemente se ha comenzado a introducir en la rutina diagnóstica de los laboratorios de micobacteriología la utilización de sondas de ADN y de reacciones de PCR para la identificación rápida de los aislados. No obstante, hasta hoy, estas técnicas no eran capaces de diferenciar a *M. tuberculosis* del resto de los miembros del complejo *M. tuberculosis*, entre los que se encuentran *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*.

Como ya se ha comentado, en los últimos años, la tuberculosis humana ha recuperado el protagonismo dentro de las enfermedades infecciosas, y la tuberculosis bovina es aún un serio problema económico y sanitario en muchos países, siendo un hecho reconocido su influencia en la salud humana.

Asimismo, se ha comprobado también que la variedad africana del bacilo tuberculoso (*M. africanum*) es capaz de causar tuberculosis pulmonar en el hombre y en los animales. Esta especie se diferencia de *M. bovis* sólo por su sensibilidad a la piracinamida por lo que la existencia de fallos al diferenciar estas especies, puede provocar confusión en la epidemiología de la tuberculosis bovina en los países en que concurren ambas especies.

La gran similitud en la presentación clínica, el tratamiento y el pronóstico de las infecciones por *M. tuberculosis* y *M. bovis* en el hombre ha provocado fallos en los sistemas de identificación utilizados para diferenciar entre ellas en buena parte de los laboratorios del mundo (Habib y Warring, 1966; Rothstein, 1970; Collins y Grange, 1983). Sin embargo, es importante establecer sistemas para la identificación de ambas especies por 2 razones:

1º) Las cepas de *M. bovis* son naturalmente resistentes a la piracinamida y pueden mostrar resistencias primarias a la isoniazida, por ello en los casos producidos por estas cepas se requieren ajustes en el régimen de tratamiento (Kataria, 1969).

2º) El hallazgo de *M. bovis* en el hombre posibilita la realización de estudios epidemiológicos, investigando los posibles contactos del paciente tanto con humanos como con animales. Estas investigaciones permiten la detección temprana de tuberculosis en animales (ganado principalmente), lo cual supone un considerable ahorro en el desarrollo de las campañas de saneamiento de la enfermedad (es de destacar que en varias ocasiones se han producido brotes explosivos de tuberculosis transmitida desde el hombre al ganado).

Como se puede observar, las especies del complejo *M. tuberculosis* están estrechamente relacionadas entre sí y son capaces de causar problemas patológicos tanto en bóvidos como en humanos. El primer paso para conocer la importancia real de las infecciones por *M. bovis* en humanos sería la realización de estudios epidemiológicos detallados sobre la forma y la magnitud de la transmisión de la infección del ganado afectado al hombre, y para tal fin hay una necesidad urgente de desarrollar una prueba rápida y simple para diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

El objetivo del presente trabajo ha sido diseñar, optimizar, y evaluar en un número suficiente de cepas micobacterianas, una PCR múltiple para la diferenciación de estas especies. Además se ha estudiado mediante PCR el espectro de hospedadores de la secuencia IS6110 y de los genes MPB70 y ARNr 16S en una amplia variedad de especies micobacterianas de diferentes orígenes animales y localizaciones geográficas. Por último se ha evaluado la utilidad de un test de inmunoperoxidasa para la detección del antígeno MPB70 en cepas de M. bovis, comparándose con los resultados obtenidos con la detección de los marcadores genéticos descritos.

III.2 MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1 Cepas bacterianas utilizadas en el estudio

Se estudiaron un total de 339 cepas procedentes de aislamientos clínicos y de colecciones de cultivo, pertenecientes a 31 especies diferentes que abarcan a gran parte del género *Mycobacterium*. La identificación de las cepas clínicas fue llevada a cabo en los centros de origen mediante pruebas bioquímicas convencionales; además fue confirmada por el Mycobacterium Reference Laboratory, State Health Laboratory Services, Perth, Western Australia. Las especies incluidas en este trabajo fueron:

III.2.1.1 Micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*:

A) Cepas de la especie *M. tuberculosis*:

- * *M. tuberculosis* H37Rv (NCTC 7416).
- * 77 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de casos clínicos humanos, procedentes del Mycobacterium Reference Laboratory, (Perth, Western Australia).
- * 4 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de casos clínicos humanos, procedentes del Mycobacterium Reference Laboratory, (Melbourne, Victoria).
- * 4 cepas de *M. tuberculosis* carentes de la secuencia IS6110 y 3 cepas de *M. tuberculosis* susceptibles al TCH, todas ellas aisladas de casos clínicos humanos y procedentes del Mycobacterium Reference Laboratory (Brisbane, Queensland).
- * 1 cepa de *M. tuberculosis* aislada de un caso clínico humano, procedente del Hospital Ramón y Cajal (Madrid).
- * 1 cepa de *M. tuberculosis* aislada de un perro, procedente del Departamento de Patología Animal I (Facultad de Veterinaria, Madrid)

B) Cepas de la especie *M. bovis*:

- * *M. bovis* AN5 cedido por el CSIRO (Melbourne, Victoria).
- * 59 cepas de *M. bovis* aisladas a partir de casos clínicos bovinos, procedentes del Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (Perth, W.A.).

* 30 cepas de *M. bovis* aisladas a partir de casos clínicos bovinos, procedentes del Departamento de Patología Animal I (Facultad de Veterinaria, Madrid).

* 9 cepas de *M. bovis* aisladas en Canadá a partir de casos clínicos bovinos.

* 1 cepas de *M. bovis* aislada en Irán a partir de un caso clínico bovino.

* 15 cepas de *M. bovis* aisladas a partir de casos clínicos caprinos, procedentes del Departamento de Patología Animal I (Facultad de Veterinaria, Madrid).

* 1 cepa de *M. bovis* aisladas a partir de un ciervo y 2 cepas aisladas a partir de gatos, procedentes del Departamento de Patología Animal I (Facultad de Veterinaria, Madrid).

* 43 cepas de *M. bovis* aisladas a partir de casos clínicos humanos, procedentes de distintos laboratorios de referencia del continente australiano.

C) Cepas de *M. bovis* BCG:

* *M. bovis* BCG TMC 1029

* 13 cepas de *M. bovis* BCG procedentes de los Estados Unidos de América.

* 3 cepas de *M. bovis* BCG procedentes de Australia.

D) Cepas de *M. africanum*:

* *M. africanum* TMC 3, 12, 37 y 54.

* 7 cepas de *M. africanum* aisladas de casos clínicos, procedentes del Mycobacterium Reference Laboratory (Brisbane, Queensland).

E) Cepas de *M. microti*:

* *M. microti* NCTC 08710.

* 2 cepas de *M. microti* aisladas a partir de roedores en el Reino Unido.

* 2 cepas australianas y 1 cepa inglesa de *M. microti* aisladas a partir de hiracoideos (*Dendrohyrax*).

* 1 cepas australianas de *M. microti* aislada de suricatas (*Suricata suricatta*).

F) 16 cepas de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* ("seal bacillus") aisladas de focas australianas y 1 cepa aislada de un entrenador de focas, procedentes

del Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (Perth, W.A.).

III.2.1.2 Micobacterias pertenecientes al complejo *M. avium intracellulare scrofulaceum* (MAIS):

A) Cepas de *M. avium*:

* 2 cepas de *M. avium* aisladas de casos clínicos bovinos, procedentes del Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (Perth, W.A.).

* 1 cepa de *M. avium* aislada de un caso clínico bovino, procedente del Servicio de Investigación y Mejora Agraria (SIMA, Derio, País Vasco).

* 1 cepa de *M. avium* aislada de un caso clínico humano procedente de la Facultad de Medicina, Córdoba.

B) *M. intracellulare* ATCC 13950.

C) *M. scrofulaceum* ATCC 19981.

III.2.1.3 Micobacterias atípicas:

M. aurum ATCC 23366, *M. chelonae* ATCC 19977, *M. chitae* ATCC 19627, *M. duvalii* NCTC 358, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. fortuitum* NCTC 3631, *M. gadium* ATCC 27726, *M. gastris* ATCC 15754, 2 cepas de *M. genavense* aisladas a partir de un canario y un loro, *M. gilvum* NCTC 10742, *M. gordonae* ATCC 14470, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. marinum* ATCC 927, *M. neoaurum* ATCC 25795, *M. nonchromogenicum* ATCC 19503, *M. parafortuitum* ATCC 19686, *M. phlei* ATCC 11758, *M. terrae* ATCC 15755, *M. thermoresistibile* ATCC 19527, *M. triviale* ATCC 23292, *M. ulcerans* ATCC 19423, *M. vaccae* ATCC 15483, *M. xenopi* NCTC 10042, *M. xenopi* ATCC 19276, 4 cepas de *M. xenopi* aisladas de casos clínicos humanos procedentes del State Health Laboratory Services (Perth, W.A.).

Todas las cepas estudiadas forman parte de la colección de cultivos del Australian Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (Perth, W.A.).

En la **Tabla 1** se resume la identidad y procedencia de las diferentes cepas empleadas.

TABLA 1. CEPAS DE MICOBACTERIAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.

ESPECIE	HOSPEDADOR	CEPAS	ORIGEN O DESCRIPCIÓN
<i>M. tuberculosis</i>	Ref.	1	NCTC ^a 7416
<i>M. tuberculosis</i>	Humanos	89	Australia (88) España (1)
<i>M. tuberculosis</i>	Perro	1	España
<i>M. bovis</i>	Ref.	1	AN5 ^b
<i>M. bovis</i>	Vacas	99	Australia (59) España (30) Canadá (9) Irán (1)
<i>M. bovis</i>	Cabras	15	España
<i>M. bovis</i>	Ciervo	1	España
<i>M. bovis</i>	Gatos	2	España
<i>M. bovis</i>	Humanos	43	Australia
<i>M. bovis</i> BCG	Ref.	1	TMC ^c 1029
<i>M. bovis</i> BCG	Humanos	16	U.S.A. (13) Australia (3)
<i>M. africanum</i>	Ref.	4	TMC 3, 12, 37 y 54
<i>M. africanum</i>	Humanos	7	Australia
<i>M. microti</i>	Ref.	1	NCTC 08710
<i>M. microti</i>	Roedores	2	Reino Unido
<i>M. microti</i>	Hyrax	3	Reino Unido (1) Australia (2)
<i>M. microti</i>	Suricata	1	Suecia
<i>M. tuberculosis</i> complex	Focas	16	Australia
<i>M. tuberculosis</i> complex	Cuidador focas	1	Australia
<i>M. avium</i>	Vacas	3	Australia (2) España (1)
<i>M. avium</i>	Humanos	1	España

<i>M. intracellulare</i>	Ref.	1	ATCC ^d 13950
<i>M. scrofulaceum</i>	Ref.	1	ATCC 19981
<i>M. chelonae</i>	Ref.	1	ATCC 19977
<i>M. chitae</i>	Ref.	1	ATCC 19627
<i>M. duvalii</i>	Ref.	1	NCTC 358
<i>M. flavescens</i>	Ref.	1	ATCC 14474
<i>M. fortuitum</i>	Ref.	1	NCTC 3631
<i>M. gadium</i>	Ref.	1	ATCC 27726
<i>M. gastri</i>	Ref.	1	ATCC 15754
<i>M. genavense</i>	Canario	1	España
	Loro	1	España
<i>M. gilvum</i>	Ref.	1	NCTC 10742
<i>M. gordonae</i>	Ref.	1	ATCC 14470
<i>M. kansasii</i>	Ref.	1	ATCC 12478
<i>M. marinum</i>	Ref.	1	ATCC 927
<i>M. neoaurum</i>	Ref.	1	ATCC 25795
<i>M. nonchromogenicum</i>	Ref.	1	ATCC 19503
<i>M. parafortuitum</i>	Ref.	1	ATCC 19686
<i>M. phlei</i>	Ref.	1	ATCC 11758
<i>M. terrae</i>	Ref.	1	ATCC 15755
<i>M. thermoresistibile</i>	Ref.	1	ATCC 19627
<i>M. triviale</i>	Ref.	1	ATCC 23292
<i>M. ulcerans</i>	Ref.	1	ATCC 19423
<i>M. vaccae</i>	Ref.	1	ATCC 15483
<i>M. xenopi</i>	Ref.	2	NCTC 10042 ATCC 19276
<i>M. xenopi</i>	Humanos	4	Australia

^aNational Collection of Type Cultures.

^bWeybridge, United Kingdom.

^cTrudeau Mycobacterial Collection, National Institutes of Health, Bethesda, Md.

^dAmerican Type Culture Collection, Rockville, Md.

III.2.2 Cultivo de las cepas bacterianas

Todas las cepas de micobacterias, excepto *M. genavense*, fueron subcultivadas en los medios de cultivo Stonebrink (Stonebrink, 1958), Löwenstein-Jensen con piruvato sódico (fórmula consenso de la Unión Internacional contra la Tuberculosis, 1954) y E8 (Cousins et al., 1991). *M. genavense* fue cultivado en medio Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan) enriquecido con Bacto Middlebrook OADC Enrichment w/WR 1339 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Los cultivos se incubaron a 36°C, con la excepción de *M. ulcerans* y *M. marinum* que fueron incubados a 30°C, hasta la obtención de crecimiento suficiente.

La composición y forma de preparación de los medios utilizados fue la siguiente:

a) STONEBRINK:

Composición en sales

Piruvato sódico	5 g
Dihidrógeno ortofosfato de potasio	2 g
Agua destilada	300 ml
Hidrógeno fosfato de sodio hasta obtener un pH de 6.5	

Composición en colorantes

Cristal violeta	100 mg
Verde malaquita	800 mg
Agua destilada	100 ml

Base de huevo

Huevos completos (20 unidades)	800 ml
--------------------------------------	--------

Para preparar el medio, se mezclaron y disolvieron las sales indicadas, se ajustó el pH a 6,5 con NaH_2PO_4 y se vertió en una botella de 2 litros de capacidad. Seguidamente se prepararon y disolvieron la mezcla de colorantes en una botella de 100 ml. Ambas soluciones se esterizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente.

Por otro lado, se lavó la superficie de los huevos con agua jabonosa, se enjuagaron y secaron, para después colocarlos en un recipiente adecuado y cubrirlos con alcohol al 75 % durante 30 minutos. Después de secarlos sobre algodón estéril en una cabina de seguridad biológica de clase II y bajo luz ultravioleta, se rompieron en un frasco estéril y se homogeneizaron.

Por último, se mezclaron las 3 fracciones y el medio así preparado, se dispensó en tubos apropiados, colocándolos en posición inclinada durante 1 hora a 80°C; seguidamente fueron enfriados a temperatura ambiente e incubados a 37°C durante 48 horas para facilitar la absorción del exceso de humedad.

b) LÖWENSTEIN-JENSEN:

Composición en sales

Dihidrógeno fosfato de potasio	30 g
Sulfato de magnesio	3 g
Citrato de magnesio	7,5 g
L-asparagina	45 g
Piruvato sódico	40 g
Agua destilada	7500 ml

La mezcla de sales se disolvió en el volumen indicado y se dispensó en cantidades de 1500 ml. La solución así preparada fue autoclavada a 121°C durante 15 minutos y se mantuvo a 4°C.

Para la preparación del medio completo, a cada 1500 ml de la solución salina anterior se le añadieron:

Huevos enteros homogeneizados	2500 ml
Solución acuosa al 2 % de verde malaquita	50 ml
Ácido nalidíxico	0,14 g

Después de mezclar los componentes adecuadamente, se dispensó en tubos apropiados y se procedió como se indicó en el medio anterior.

c) E8:

Composición en sales

TB Caldo base sin Tween 80 (Difco)	11,5 g
Agua destilada	900 ml
Agar	15 g

Los ingredientes se disolvieron mediante agitación y calentamiento; al preparado resultante se le añadió 100 ml de extracto de yema de huevo, se dispensó en tubos adecuados, se autoclavó a 121°C durante 15 minutos y se dejó enfriar en posición inclinada.

Preparación del extracto de yema de huevo:

Yema de huevo	100 g
Tween 80	60 g
Carbón activado	10 g
Agua destilada	940 ml

Los componentes se mezclaron y autoclavaron a 121°C durante 15 minutos, para después ser filtrados en cabina de seguridad biológica de clase II usando material estéril y dispensados en alicuotas de 100 ml.

Composición del Tb caldo base (Difco):

Bacto extracto de levadura	2 g
Proteosa peptona nº 3	2 g
Bacto casitona	2 g
Hidrógeno fosfato de sodio	2.5 g
Fosfato potásico	1 g
Citrato sódico	1,5 g
Sulfato magnésico	0,6 g

d) MIDDLEBROOK 7H11:*Ingredientes por litro:*

Digerido pancreático de caseína	1 g
Sulfato amónico	0,5 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Fosfato disódico	1,5 g
Citrato sódico	0,4 g
Sulfato magnésico	0,05 g
Ácido L-glutámico	0,5 g
Citrato amónico férrico	0,04 g
Piridoxina	0,001 g
Biotina	0,0005 g
Verde malaquita	0,001 g
Agar	15 g

Para su preparación se pesan 4,7 g de la mezcla deshidratada anterior y se suspenden en 900 ml de agua ultrapura, se esteriliza durante 15 minutos a 121°C y se enfría hasta 55°C, temperatura a la cual se añaden 100 ml de Bacto Middlebrook OADC Enrichment w/WR 1339 en condiciones asépticas, para después dispensarlo en tubos.

III.2.3 Preparación de las muestras para la PCR

Para cada cepa las amplificaciones se llevaron a cabo en dos tipos diferentes de muestras: suspensiones bacterianas tratadas por calor, y ADN extraído de las células micobacterianas.

III.2.3.1 Preparación de las suspensiones bacterianas inactivadas

Para cada cepa se preparó una suspensión bacteriana con una densidad equivalente al nº 5 de la escala de *McFarland*, mezclando varias colonias con 0.5 ml de agua estéril en una botella *bijou* que contenía perlas de vidrio.

Una dilución 1/10 en agua purificada estéril de la suspensión así preparada, fue sometida a un tratamiento térmico (en baño de agua) de 94°C durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se congelaron a -20°C hasta su amplificación.

III.2.3.2 Extracción del ADN

A partir de un subcultivo fresco de cada cepa se sembraron 10 placas del medio sólido con base de agar E8, las placas sembradas se incubaron a la temperatura adecuada (37 o 32°C), durante 3-4 semanas, en presencia de atmósfera de CO₂ al 5 %.

El crecimiento conseguido en las placas se recogió en 20 ml de PBS (tampón fosfato) estéril, se inactivó mediante incubación a 75°C durante 40 minutos, se lavó con PBS estéril y se concentró mediante centrifugación. Para la extracción se partió de aproximadamente 300 mg de colonias (peso húmedo) y se siguió una modificación del método del CTAB [bromuro de cetil trimetil amonio (Wilson, 1988)] como se indica a continuación:

Las células fueron resuspendidas en 700 µl de agua estéril e incubadas durante 3 horas a 37°C tras añadir 100 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml). Se procedió a continuación a la lisis de las células mediante la adición de 100 µl de SDS (laurilsulfato de sodio) al 10 % y a la digestión de los restos proteicos de la muestra, para lo cual ésta se incubó durante una noche a 50°C con 100 µl de una solución de

proteínasa K (1 mg/ml).

Después de la digestión, la muestra se dividió en 2 alícuotas de unos 500 µl y con cada uno de ellos se procedió del siguiente modo:

Se añadieron 100 µl de una solución 5M de NaCl y 80 µl de una solución de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB al 10 %, 0,7 M NaCl) precalentada a 65°C, se mezcló fuertemente en un agitador y se incubó durante 10 minutos a 65°C. El objeto del tratamiento con CTAB es eliminar los restos de paredes celulares, proteínas desnaturalizadas y polisacáridos, mientras que los ácidos nucleicos continúan en solución [para lo cual es muy importante que la concentración de sales en la muestra nunca baje del 0,5 M; ya que por debajo de esta concentración, los ácidos nucleicos se unen al CTAB y precipitan (Murray y Thompson, 1980)].

A continuación se realizó una extracción con cloroformo/alcohol isoamílico para eliminar los compuestos CTAB-proteína-polisacárido; para ello se añadieron 0,6 ml de una mezcla cloroformo/isoamílico (24:1), se mezcló en un agitador durante 10 segundos y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 6500 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf). Después de la centrifugación se recogieron y mezclaron las fases superiores acuosas de ambos tubos.

Seguidamente se procedió a la precipitación del ADN con isopropanol a -20°C, para lo cual se añadió a la muestra un volumen equivalente de isopropanol, se mezcló mediante la inversión repetida del tubo y se mantuvo a -20°C hasta la visualización de hebras algodonosas. Para la recuperación del ADN precipitado se centrifugó durante 10 minutos a 6500 rpm en la microcentrífuga (Eppendorf), desechándose el sobrenadante.

El ADN así obtenido se lavó 2 veces con etanol al 70 % y se desecó en una estufa a 37°C, para evaporar los restos alcohólicos. Posteriormente se disolvió en 200 µl de tampón TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

En cada lote de extracciones se incluyó un control negativo y positivo de extracción para detectar contaminaciones cruzadas o posibles errores en la metodología empleada.

La concentración y la calidad del ADN obtenidos se analizó mediante medida

en espectrofotómetro de la densidad óptica a longitudes de onda de 260 y 280 nm, y mediante la prueba comercial GIBCO BRL FastCheck.

III.2.3.3 Medida espectrofotométrica de la concentración del ADN.

Este método es usado para estimar la concentración de ADN mediante la medida en un espectrofotómetro de la absorción de radiación ultravioleta a distintas longitudes de onda, para ello es necesario el uso de cubetas de cuarzo. Para este proceso se utilizó un espectro GENEQUANT (Pharmacia) y el método utilizado fue el siguiente:

Se mezclaron cuidadosamente 5 μ l de la muestra problema con 995 μ l de agua, y la mezcla se transfirió a una cubeta de cuarzo para espectrofotómetro.

Se procedió a ajustar el blanco del aparato con 1 ml del mismo agua utilizada para hacer la dilución del ADN.

Se colocó la cubeta con la muestra en el aparato y se procedió a la lectura de la densidad óptica (D.O.) a una longitud de onda de 260 nm. Para el ADN de cadena doble, 1 unidad de D.O. corresponde a la concentración de 50 μ g/ml; de manera que la concentración de la muestra problema en μ g/ μ l, puede calcularse fácilmente multiplicando por 10 la medida de la D.O. obtenida.

Para comprobar la pureza de la muestra se realizó una segunda lectura a una longitud de onda de 280 nm, y se determinó el cociente entre la D.O. a 260 nm y la D.O. a 280 nm. Si este cociente es de aproximadamente 2, la absorción se debe principalmente a ácidos nucleicos; si el cociente es menor de 1,6, es indicativo de que en la muestra existen proteínas y se recomienda reextraer la misma.

III.2.3.4 Cuantificación del ADN genómico mediante la prueba comercial GIBCO BRL FastCheck

Este sistema está diseñado para la determinación rápida de la concentración de ADN y permite una aproximación rápida y precisa a la misma. Se basa en la utilización de un complejo fosfatasa alcalina que se une específicamente a los ácidos

nucléicos y que puede ser posteriormente detectado mediante una prueba colorimétrica. Para la realización de esta prueba se siguió el protocolo recomendado por el fabricante como se resume a continuación:

Transferir alícuotas de los reactivos a tubos de microcentrifuga de 2 ml como se indica:

- Tubo 1 1,5 ml FastCheck Buffer A
- Tubo 2 1,5 ml FastCheck Buffer B,
1 µl Reactivo FastCheck.
- Tubo 3 1,5 ml FastCheck Buffer B
- Tubo 4 1,5 ml FastCheck Buffer C
- Tubo 5 1,5 ml FastCheck Buffer C,
6.5 µl de solución NBT y 5 µl de solución BCIP.

Estas soluciones son estables durante 8 horas a temperatura ambiente y pueden ser usadas para procesar 3 tiras con muestras.

En las tiras portadoras del ADN, en puntos separados, se colocan las diferentes muestras a razón de 1 µl por cada una y de 3 muestras por tira. Se deben incluir un control positivo de ADN de concentración conocida y un control negativo con agua.

El ADN se fija a la membrana de la tira portadora mediante secado en corriente de aire caliente y exposición a luz ultravioleta durante 1 ciclo estándar en un XL-1000 W Cross-Linker (Spectronics Co.)

Insertar la tira en el tubo 1 lentamente y dejar durante 5 minutos. Transferir la tira al tubo 2 y mantener durante 10 minutos.

Retirar la tira y lavar con agua, colocarla en el tubo 3 y agitar durante 1 minuto. Transferirla al tubo 4 y agitar durante 1 minuto.

Transferir al tubo 5 e incubar durante exactamente 4 minutos, lavar con agua y secar.

La intensidad de la señal obtenida se compara con la escala de patrones que se incluyen en la prueba.

Las muestras deben ser tratadas con ARNasa después de ser fijadas a la membrana de la tira portadora, para ello la tira se sumerge en una solución de esta enzima a una concentración de 5 µg/ml y se incuba durante 20-30 minutos a 37°C.

III.2.4 Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados en un sintetizador de oligos *Pharmacia Gen Assembler Plus* y purificados en un gel de poliacrilamida al 20 % conteniendo urea a la concentración de 7M. Los oligos fueron visualizados bajo luz ultravioleta y separados de restos salinos mediante columnas NAP-10 (Pharmacia). La síntesis y purificación fue realizada por la empresa Biotech International Ltd. (Bentley, W.A.).

Oligonucleótidos **PT1** y **PT2** que corresponden a los nucleótidos del 9 al 25 y del 385 al 401 de la secuencia del fragmento genómico *mtp40* definido como especie-específico para *M. tuberculosis* (Del Portillo et al., 1991).

Los oligos **1081-L** y **1081-9** que corresponden con las posiciones 333 a 352 y 551 a 570 de la secuencia de inserción *IS1081* (Collins et al., 1991).

Oligonucleótidos **INS-1** e **INS-2** (Hermans et al., 1990b) que corresponden a las posiciones 631 a 650 y 856 a 875 de la secuencia de inserción *IS986 (IS6110)*.

Oligonucleótidos **TB1-F** y **TB1-R** (Cousins et al., 1991) que corresponden a las posiciones 276 a 296 y 628 a 648 del gen (Radford et al, 1988) que codifica para el antígeno MPB70 específico de *M. bovis* (Wood et al, 1988).

Oligonucleótidos **MYCGEN-F** y **MYCGEN-R** (Böddinghaus et al., 1990)) que corresponden a las posiciones 16 a 35 y 1.027 a 1.046 del gen que codifica para el ARNr 16S.

En la **tabla 2** se muestran las secuencias de los diferentes oligonucleótidos y los tamaños esperados de los productos de las reacciones de amplificación.

TABLA 2. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA Y TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS DE PCR PARA LAS PAREJAS DE INICIADORES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.

Iniciador	Secuencia (5'----3')	Producto (pb)
PT-1	CAA CGC GCC GTC GGT GG	396 ^a
PT-2	CCC CCC ACG GCA CCG C	
1081-L	TCG CGT GAT CCT TCG AAA CG	238 ^b
1081-9	GCC GTT GCG CTG ATT GGA CC	
INS-1	CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC	245 ^c
INS-2	GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA	
TB1-F	GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA	372 ^d
TB1-R	AGC ACG CTG TCA ATC ATG TA	
MYCGEN-F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1.030 ^e
MYCGEN-R	TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA	

^aPT-1 y PT-2 generan un producto de amplificación de 396 pb.

^b1081-L y 1081-9 generan un producto de amplificación de 238 pb.

^cINS-1 e INS-2 generan un producto de amplificación de 245 pb.

^dTB1-F y TB1-R generan un producto de amplificación de 372 pb.

^eMYCGEN-F y MYCGEN-R generan un producto de amplificación de 1.030 pb.

III.2.5 Amplificación del ADN mediante PCR.

El objetivo de este trabajo fue el diseño de un **PCR Múltiple** destinado a la identificación rápida de aislados de la especie *M. tuberculosis*, utilizando por una parte los iniciadores para *mtp40* e *IS6110* y por otra los iniciadores para *mtp40* e *IS1081*. Además se estudió por PCR la especificidad de hospedador para los genes *MPB70* y *ARNr 16S*.

Se realizó una titulación meticulosa de cada componente de la reacción de PCR (enzima, $MgCl_2$ e iniciadores), utilizando como dianas en cada titulación ADN de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, y agua estéril como control negativo. Además se probaron oligonucleótidos procedentes de diversos orígenes.

Las reacciones de amplificación se efectuaron en un volumen total de 25 μ l conteniendo:

5 μ l de **tampón de polimerización 5x**: Tris-HCl 335 mM, pH 8,8 a 25°C, $(NH_4)_2SO_4$ 83 mM, dNTP 1 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 30 M, y 1 mg/ml de gelatina

Thermus thermophilus (Tth) plus polimerasa (Biotech International, Bentley, W.A.): como se expone en resultados, página 123.

$MgCl_2$: como se expone en resultados, página 122.

oligonucleótidos iniciadores de la reacción: como se indica en resultados, tabla 3.

agua ultrapura estéril hasta completar 20 μ l

5 μ l de la **muestra** a amplificar.

Las mezclas de reacción fueron cubiertas con 50 µl de aceite de parafina estéril (SIGMA) para impedir su evaporación durante los ciclos de amplificación.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Corbett FTS-1 (Bioquest International, Bentley, W.A.). Las amplificaciones se realizaron utilizando ciclos sucesivos a temperaturas de 94°C (desnaturalización), 65°C (emparejamiento) y 72°C (extensión). Las reacciones fueron sometidas a la temperatura de desnaturalización durante 10 minutos en el primer ciclo y durante 30 segundos en los 34 ciclos siguientes. El tiempo para el emparejamiento fue de 2 minutos en todos los ciclos y para la extensión fue de 3 minutos en los 34 primeros ciclos y 10 minutos en el último ciclo.

Para el análisis de cada cepa se utilizó tanto ADN purificado (extraído y purificado como se describió previamente), como una suspensión bacteriana inactivada (10 minutos a 94°C). Cuando la muestra era de ADN, se inoculaban 5 µl de una dilución 10 ng/µl; cuando la muestra era una suspensión inactivada, se inoculaban 5 µl de una dilución 1/10 preparada como se explicó previamente.

Cada lote de tubos así preparado fue cuidadosamente probado con controles positivo y negativo. Así mismo, se incluyeron sendos controles en cada amplificación realizada con el fin de detectar posibles contaminaciones cruzadas y/o anomalías en el funcionamiento del termociclador.

III.2.6 Análisis de los productos de amplificación

Una vez concluida la amplificación se separó una alícuota de 5 μ l de la mezcla de reacción y se mezcló con un volumen igual de tampón de carga 2x (azul de bromofenol al 0,08 %, Xileno-cianol al 0,08 % y glicerol al 10 % en agua). Esta mezcla fue sometida a electroforesis a una diferencia de potencial de 100 voltios durante 40 minutos (proporcionado por una fuente de voltaje variable BIO-RAD), en un gel de agarosa (BIO-RAD) al 2 %, utilizando como tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas BIO-RAD de diferentes capacidades.

Los geles de agarosa (polímero lineal compuesto por D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa) se hicieron fundiendo en un microondas una solución de agarosa en TAE 1x, vertiéndolo en un molde y dejándolo solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificada, la agarosa forma una matriz cuya densidad depende de la concentración de agarosa en disolución; cuando se aplica un campo eléctrico a través del gel, el ADN (que a pH neutro está cargado negativamente) migra hacia el ánodo (polo positivo). La migración depende de varios parámetros como son tamaño y conformación del ADN que va a migrar, concentración de agarosa y voltaje proporcionado (Maniatis et al., 1989). La migración de las moléculas de ADN es inversamente proporcional al logaritmo decimal del número de pares de bases.

En cada gel, en las calles situadas en los extremos, se incluyó como marcador de peso molecular 1 μ l de 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia Biotech), con el fin de calcular el tamaño de los productos de la amplificación tras su separación electroforética.

Después de la electroforesis, los geles se tiñeron por inmersión durante 20-30 minutos en una solución de bromuro de etidio al 0,5 μ g/ml, y las bandas fueron visualizadas y fotografiadas bajo luz ultravioleta en un transiluminador de media longitud de onda.

III.2.7 Prueba de la inmunoperoxidasa

Para la realización de esta técnica se partía de un extracto antigénico crudo: a partir de cada cepa se preparaba una suspensión de opacidad equivalente al número 7 de la escala de McFarland, para ello se usaron botellas *bijou* con perlas de vidrio para disgregar los agregados de colonias. Estas suspensiones eran seguidamente autoclavadas (125°C durante 20 minutos).

El soporte de las reacciones era una membrana de nitrocelulosa de 0,45 micrones de tamaño de poro (Schleicher and Schuell, Dassel, Alemania) y las incubaciones se realizaron en placas de Petri. Antes de comenzar, la membrana de nitrocelulosa se cortaba a la medida adecuada (40 mm²), se marcaba con una cuadrícula (de 1 cm), se humedecía con TBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM y 0,1 % de tiomersal, pH 7,5) y se mantenía a temperatura ambiente hasta que se secase. Las muestras se colocaban en el papel de nitrocelulosa a razón de 2 µl por cuadrícula, incluyendo un control positivo (*M. bovis* AN5) y un control negativo (*M. tuberculosis* NCTC 7416) en las dos primeras cuadrículas, la membrana se dejaba a temperatura ambiente hasta que se secasen las muestras. Seguidamente se cubría con solución bloqueante (leche descremada en polvo al 4 % en TBS) y se incubaba en agitación durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se eliminaba la solución de bloqueo y se preparaba una solución 1/2.000 a partir del anticuerpo monoclonal 4C3/17 (1,9 mg/ml) en TBS con la que se cubría la membrana y se incubaba en agitación durante 1 hora. Este anticuerpo es un monoclonal producido en ratón para MPB70 (Wood et al., 1988) y es comercializado por Agen, Biochemicals, Queensland, Australia. Después de esta incubación se eliminaba el monoclonal y se lavaba 2 veces con TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, 0,05 % Tween-20 y 0,1 % de tiomersal) en agitación durante 5 minutos cada lavado. A continuación la membrana se incubaba con una dilución 1/200 en TBS de un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (*affinity purified horse radish peroxidase conjugated goat antimouse IgG*, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Alemania) durante 1 hora en agitación. Posteriormente se eliminaba el conjugado y se enjuagaba 2 veces con TTBS como se indicó en el paso anterior, por último se añadía la solución del sustrato (60 mg de 4-cloro-1-naftol se

disolvían en 20 ml de metanol a 4°C y esta disolución se mezclaba con 100 ml de TBS, conteniendo 60 μ l de H₂O₂ al 30 %) hasta el desarrollo de un color púrpura intenso en el control positivo. Todas las incubaciones de este protocolo se realizaron a temperatura ambiente.

III.3 RESULTADOS

III.3.1 Titulación y cálculo de la concentración óptima de los componentes de la PCR.

III.3.1.1 Titulación de la concentración de MgCl₂.

En las **figuras 1 y 2** se muestra el efecto de la concentración de MgCl₂ en la amplificación de los ADN dianas. La **figura 1** representa una titulación para el MgCl₂ en el intervalo de concentraciones de 1 a 4 mM usando como iniciadores de la PCR a los oligonucleótidos PT1 y PT2 y como dianas, ADN de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y agua ultrapura (MQ) estéril.

La **figura 2** muestra una titulación para el MgCl₂ en el intervalo de concentraciones de 1 a 3 mM usando como iniciadores de la PCR a los oligonucleótidos PT1-R, PT2-F, 1081-L y 1081-9 y como dianas, ADN de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Los resultados obtenidos con estas titulaciones indican que un aumento en la concentración de MgCl₂ (incremento de la fuerza iónica del tampón de polimerización) propicia el emparejamiento inespecífico de los iniciadores, resultando en la aparición de productos de amplificación inespecíficos. Los mejores resultados se obtuvieron con una concentración **0,5 mM de MgCl₂**, con la cual no se generaron productos de amplificación con ninguna diana excepto con *M. tuberculosis*.

La **figuras 3 a y b** muestran el resultado de un experimento en el que se probaron temperaturas crecientes de emparejamiento (63, 65 y 68°C) para intentar hacer desaparecer una banda inespecífica amplificada a partir del genoma de *M. bovis*; viéndose que para este fin, era más eficaz la reducción de la concentración de MgCl₂ que el aumento de la temperatura de emparejamiento.

III.3.1.2 Titulación de la *Thermus thermophilus* ADN polimerasa.

Se realizó una titulación de la Tth plus polimerasa (Biotech International, Bentley, W.A.), en el intervalo de 0,5 a 2 unidades / reacción y no se encontraron diferencias significativas en la especificidad de los resultados obtenidos, por lo que se concluyó con la utilización de **0,5 Unidades de enzima / reacción**.

III.3.1.3 Titulaciones de los oligonucleótidos cebadores de la reacción. Diseño y evaluación de una PCR Múltiple para la identificación de *M. tuberculosis*.

Una vez optimizadas las condiciones en cuanto a temperatura de emparejamiento y concentraciones de $MgCl_2$ y enzima, se procedió a la titulación de los diferentes oligonucleótidos y sus combinaciones como se expone seguidamente:

La **figura 4** muestra el resultado de la titulación de los iniciadores PT1-R y PT2-F en el intervalo de 20 a 200 ng/reacción utilizando como dianas ADN de *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Este experimento demuestra que la concentración óptima para estos iniciadores, en solitario, está entre **50 y 100 ng/reacción**.

Las condiciones de funcionamiento para la pareja de iniciadores INS-1/INS-2, en solitario, fueron establecidas por Hermans et al. en 1990.

Las condiciones de amplificación para los genes MPB70 y ARNr 16S en un PCR múltiple fueron establecidas por Wilton y Cousins en 1992.

Las **figuras 5 y 6** representan la titulación de los iniciadores PT1-R/PT2-F e INS-1/INS-2 utilizados conjuntamente en un sólo tubo (PCR múltiple) y probados con 2 dianas de *M. tuberculosis*. De ambos experimentos se sacó como conclusión, que en esta reacción se encuentra favorecida la amplificación del fragmento de 245 pb (iniciadores INS-1/INS-2), en relación con la del fragmento de 396 pb (iniciadores PT1-R/PT2-F). Es decir existe cierta competencia entre la amplificación de ambas dianas, lo cual hace que, para asegurar la estabilidad de las dos amplificaciones, sea

necesario aumentar la concentración de los oligonucleótidos PT y disminuir la de los INS. Las condiciones óptimas de funcionamiento se consiguieron con la utilización de **100 ng/reacción de los oligos PT y 30 ng/reacción de los oligos INS**. Aun así, al probar extensivamente los tubos preparados en estas condiciones, se constató que en determinadas ocasiones, la amplificación del fragmento mayor tenía un escaso rendimiento; propiciando la aparición de resultados falsos negativos y por consiguiente errores en la identificación de las cepas. Por todo ello se decidió diseñar un nuevo PCR múltiple utilizando los iniciadores 1081 para *IS1081*, también específicos del complejo *M. tuberculosis*.

Se procedió a la titulación conjunta de los iniciadores PT y 1081 (**figura 7**) utilizando como dianas un control positivo (*M. tuberculosis*), un control negativo, *M. bovis* y ADN de otras 3 cepas de *M. tuberculosis* que, en experimentos anteriores, fueron problemáticas al ser ensayadas con el PCR múltiple PT/INS. En este caso se comprobó que la amplificación que se encontraba favorecida era la del fragmento mayor (396 pb, iniciadores PT1-R/PT2-F), y se encontró que las condiciones óptimas de funcionamiento se consiguen al utilizar **150 ng/reacción de los iniciadores PT y 60 ng/reacción de los iniciadores 1081**.

Todas las cepas fueron probadas con los iniciadores PT en una reacción simple y con los iniciadores PT/1081 en un PCR múltiple y no se observaron fenómenos de competencia entre ambas amplificaciones, demostrándose de esta forma la fiabilidad de los resultados del PCR múltiple. La utilización de los 4 iniciadores en un sólo tubo permite verificar la pertenencia al complejo *M. tuberculosis* y la presencia del fragmento *mtp40* en una sola reacción, lo que supone un ahorro importante en reactivos y material.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de los ADN mediante la prueba comercial fueron bastante aproximados a los obtenidos mediante lectura en espectrofotómetro, lo cual demuestra que éste método puede ser una alternativa eficaz en aquellos casos en los que no se disponga de medios para espectrofotometría.

Los resultados de las titulaciones de las diferentes combinaciones de iniciadores se resumen en la **tabla 3**.

TABLA 3. TITULACIÓN DE DIFERENTES COMBINACIONES DE INICIADORES.

Combinaciones de iniciadores en una reacción de PCR.	Concentración óptima (ng/reacción)
INS-1	125 ng
INS-2	125 ng
PT1-F	88 ng
PT1-R	88 ng
PT1-F	100 ng
PT1-R	100 ng
INS-1	30 ng
INS-2	30 ng
PT1-F	150 ng
PT1-R	150 ng
1081-L	60 ng
1081-9	60 ng
TB1-F	21 ng
TB1-R	21 ng
MYCGEN-F	28 ng
MYCGEN-R	28 ng

III.3.2 Estudio por PCR del espectro de hospedadores de las secuencias IS6110, IS1081, MPB70 y *mtp40* en las cepas de micobacterias.

Todas las cepas fueron testadas con el PCR múltiple desarrollado para *mtp40*/IS1081, con un PCR múltiple descrito para los genes MPB70/ARNr 16S y con un PCR para IS6110. Aquellas cepas que presentaron resultados diferentes a los esperados fueron retestadas 4 veces partiendo de diferentes subcultivos con el fin de eliminar fallos en el método utilizado. En todas las reacciones de amplificación se incluyó un control positivo y negativo con el fin de detectar contaminaciones cruzadas. En todos los casos se testaron en paralelo suspensiones bacterianas inactivadas y DNA (20 ng/reacción). No se encontraron diferencias en los resultados obtenidos al amplificar ambos tipos de muestras, lo cual representa una gran ventaja ya que permite la aplicación directa de la prueba sin necesidad de extraer y purificar los ADN de las cepas.

El fragmento de 396-pb específico para *mtp40* se obtuvo al amplificar el genoma de 87 de las 91 (95,6 %) cepas pertenecientes a la especie *M. tuberculosis*, 9 (81,8 %) de las 11 cepas de *M. africanum* y de las 17 (100 %) cepas aisladas de focas. Sólo en 4 de las 91 cepas de *M. tuberculosis* y 2 de las 11 cepas de *M. africanum* estudiadas, no se obtuvo el producto esperado; la identificación de estos aislados fue confirmada en dos ocasiones por pruebas bioquímicas convencionales. Con ninguna otra cepa se observó el producto de amplificación de *mtp40*.

Como era de esperar, el fragmento de 238-pb específico para IS1081 se encontró al amplificar el genoma de las 304 cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* y no apareció en ninguna otra especie estudiada.

La **figura 8** muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, después de la electroforesis de los productos obtenidos tras la amplificación mediante el PCR múltiple PT/1081, de ADN procedente de 2 cepas de *M. tuberculosis*, 2 cepas de *M. africanum*, 2 cepas de *M. bovis*, 2 cepas de *M. microti*, 2 cepas de *Mycobacterium spp.*

aislados de focas, y *M. kansasii*. Las dos últimas calles corresponden a los controles positivo y negativo de la amplificación.

Además de las secuencias anteriores, en todas las cepas se estudió mediante PCR la presencia/ausencia de la secuencia IS6110 y de los genes MPB70/ARNr 16S.

El fragmento de 1.030-pb específico de género fue amplificado a partir del genoma de los 339 aislados micobacterianos y en todas las cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se comprobó la presencia del fragmento de 372-pb específico para el gen MPB70.

La presencia de IS6110 fue investigada en las 339 cepas del estudio y se confirmó en 300 de las 304 cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*, en una cepa de *M. ulcerans* y en una cepa de *M. gilvum*. Las cepas del complejo *M. tuberculosis* en las que no se detectó la secuencia fueron 4 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes vietnamitas.

III.3.3 Resultados de la aplicación de la prueba de la inmunoperoxidasa para detectar el antígeno MPB70.

Esta prueba se realizó en 223 cepas, todas excepto una de las cepas identificadas como *M. bovis* y las 17 cepas de *M. bovis* BCG probadas, fueron positivas con la prueba de inmunoperoxidasa para detectar el antígeno MPB70. Todas las cepas de *M. microti* y todas las cepas aisladas de focas fueron negativas a la misma. Por último 1 cepa de *M. tuberculosis* y una cepa de *M. africanum* resultaron positivas a esta prueba.

Los resultados obtenidos tras el análisis de las 339 cepas mediante PCR para las dianas *mtp40*, *IS1081*, *MPB70*, *ARNr 16S* e *IS6110*, así como los resultados del test de inmunoperoxidasa se resumen en la **Tabla 4**.

TABLA 4. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DE PCR A 339 CEPAS MICOBACTERIANAS PARA DETECTAR LOS ELEMENTOS *mtp40*, *IS1081*, ARNr 16S, MPB70 E *IS6110* Y DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA (IP) PARA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO MPB70.

<i>Mycobacterium</i> spp.	PCR positivas / N° testadas					IP positivas / N° testadas
	<i>mtp40</i>	<i>IS1081</i>	ARNr 16S	MPB70	<i>IS6110</i>	
<i>M. tuberculosis</i>	87/91	91/91	91/91	91/91	87/91	1/36
<i>M. africanum</i>	9/11	11/11	11/11	11/11	11/11	1/11
<i>M. tuberculosis complex (focas)</i>	17/17	17/17	17/17	17/17	17/17	0/17
<i>M. bovis</i>	0/161	161/161	161/161	161/161	161/161	110/111
<i>M. bovis BCG</i>	0/17	17/17	17/17	17/17	17/17	17/17
<i>M. microti</i>	0/7	7/7	7/7	7/7	7/7	0/7
<i>M. spp</i>	0/35	0/35	35/35	0/35	2/35	0/24
Total	115/339	304/339	339/339	304/339	302/339	129/223

III.4 DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue desarrollar una reacción de PCR en un sólo tubo que fuese capaz de detectar la presencia del elemento IS1081 (específico para microorganismos del complejo *M. tuberculosis*), e identificar la especie *M. tuberculosis* detectando la presencia de la secuencia *mtp40*.

Aunque *mtp40* fue originalmente descrito como especie-específico para *M. tuberculosis* (Del Portillo et al., 1991) y los resultados de un reciente estudio en un número limitado de cepas confirman esta teoría (Sinclair et al., 1995), en nuestro estudio hemos comprobado que esta secuencia aparece también en *M. africanum* y cepas aisladas de pinnípedos.

La presencia del elemento en 9 de las 11 cepas de *M. africanum* estudiadas, pone de manifiesto la controversia existente en la clasificación de estos aislados. La especie *M. africanum* está constituida por un grupo muy heterogéneo de cepas con características fenotípicas comunes a *M. bovis* o a *M. africanum* dependiendo de su origen geográfico (David et al., 1978).

Las cepas de focas fueron originalmente identificadas, mediante pruebas bioquímicas y pruebas de sensibilidad a antibióticos, como *M. bovis* (Cousins et al., 1993a y b). Sin embargo estas cepas, a diferencia de lo que ocurre con *M. bovis*, no presentaron cantidades detectables de MPB70 cuando fueron analizadas con una prueba de inmunoperoxidasa (Wood et al., 1988, Veerman et al., 1990). Tras el análisis de su genoma por REA y RFLP, todas las cepas aisladas de focas, formaron un conjunto genético perfectamente diferenciado del formado por las cepas de *M. bovis* aisladas de bóvidos y parecían estar más relacionadas con *M. tuberculosis* que con *M. bovis* (Cousins et al., 1993a y b). Debido a las diferencias significativas entre ambas, se cree que pueda tratarse de una nueva especie (Cousins et al., 1990, 1993a y b). La presencia del elemento *mtp40* en estas cepas confirma el parecido de las mismas con *M. tuberculosis*.

J.D.A. van Embdem (comunicación personal) ha comunicado recientemente la existencia de cepas de *M. bovis* aisladas de pacientes humanos portadoras de la secuencia *mtp40*, sin embargo en este estudio ninguna de las 42 cepas humanas de

M. bovis mostraron la presencia de este elemento.

La identificación de las 4 cepas de *M. tuberculosis* y las 2 cepas de *M. africanum* en las que no se encontró el elemento *mtp40* fue reconfirmada por pruebas bioquímicas. Dos de las cepas de *M. tuberculosis* fueron sensibles (variedad asiática) y dos resistentes (variedad clásica) a la TCH. Una de las cepas de *M. africanum* fue confirmada como tipo I y la otra como tipo II.

Collins et al. en 1993 estudiaron el rango de hospedadores para la secuencia IS1081, y encontraron que sólo se encuentra presente en los miembros del complejo *M. tuberculosis* y en la cepa TMC 1470 (Trudeau Collection, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) de *M. xenopi*. En nuestro estudio se incluye el análisis de 4 aislados clínicos y 2 cepas tipo de *M. xenopi* ninguna de las cuales presentó el producto de amplificación esperado para IS1081.

Recientemente varios autores (Van Soolingen et al, 1993; Yuen et al., 1993) han encontrado cepas de *M. tuberculosis* carentes de la secuencia IS6110, estos aislados suelen encontrarse con mayor frecuencia en zonas del sudeste asiático y de la India. En nuestro estudio están incluidas 4 cepas de *M. tuberculosis* aisladas de pacientes vietnamitas que no presentaron la secuencia IS6110. Sin embargo, hasta el momento, no se ha notificado la existencia de ninguna cepa sin la secuencia IS1081, lo cual sugiere que IS1081 es una buena opción para comprobar la pertenencia de una micobacteria al complejo *M. tuberculosis*.

Nunca se había notificado la presencia de la secuencia IS6110 en cepas micobacterianas fuera del complejo *M. tuberculosis*, hasta que en un reciente trabajo (Kent et al., 1995) se demostró homología entre IS6110 y 6 especies de micobacterias mediante una técnica de *nested* PCR. En este trabajo hemos detectado un producto de amplificación compatible con IS6110 en 1 cepa de *M. ulcerans* y 1 cepa de *M. gilvum*. Estos nuevos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de un estudio extensivo del espectro de hospedadores de esta secuencia con el fin de prevenir resultados falsos (tanto positivos como negativos) en la identificación por PCR de los microorganismos del complejo *M. tuberculosis*.

Se ha encontrado que la prueba de inmunoperoxidasa es un método simple,

fiable y específico para la identificación de la especie *M. bovis*. La única cepa de *M. bovis* que dio un resultado negativo en esta prueba fue aislada de un paciente humano nacido en Singapur. Cuando se repitió su identificación bioquímica, se encontró que esta cepa tenía características intermedias entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*, aunque se acercaba más a esta última. En esta cepa no se encontró la secuencia *mtp40*, lo cual es más indicativo de *M. bovis*.

Mediante el PCR múltiple *mtp40/IS1081*, la mayoría de las cepas de *M. africanum* se agruparon junto a *M. tuberculosis*, obteniéndose un resultado positivo en la prueba para los patógenos humanos. Sin embargo, *M. bovis* y *M. microti*, los patógenos animales tradicionales daban un resultado negativo para *mtp40*. La excepción a esta regla fueron las cepas de focas, las cuales se agruparon con los patógenos humanos. Como conclusión podría extraerse que en el momento presente no existe un único marcador genético para la identificación de especies dentro del complejo *M. tuberculosis* y sugerimos que el PCR múltiple descrito en este trabajo podría usarse como una herramienta en combinación con otras pruebas (inmunoperoxidasa, pruebas bioquímicas) para la identificación de las especies de este complejo.

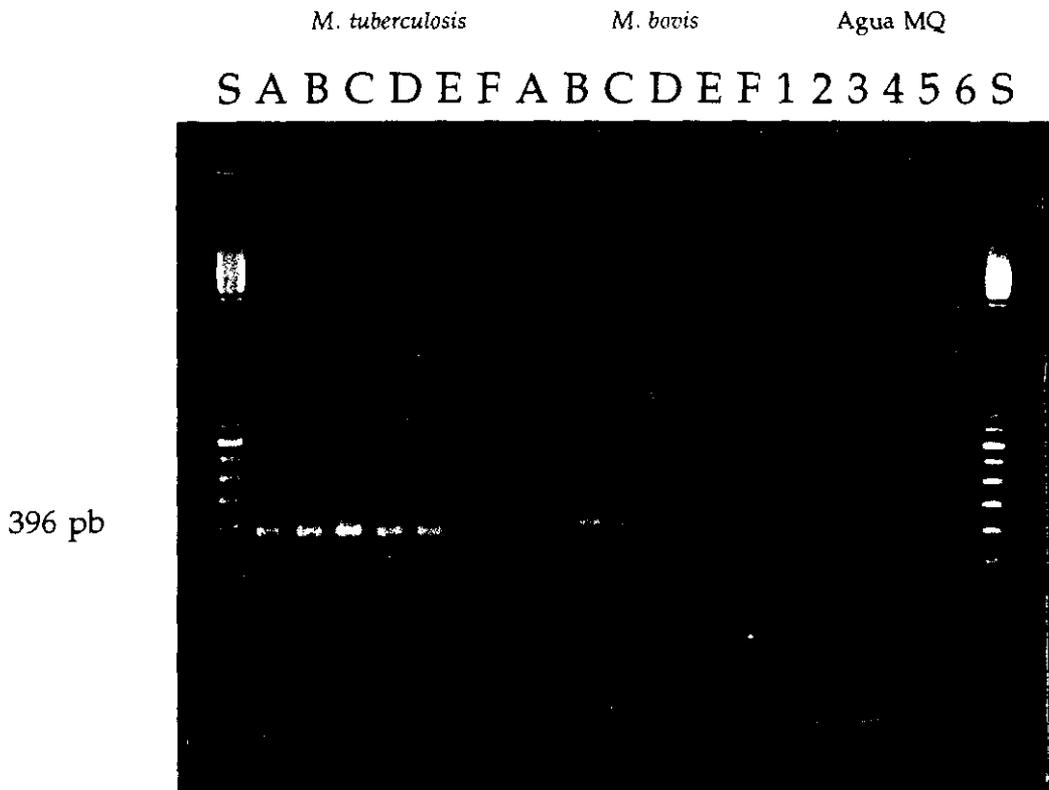


FIG. 1. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la amplificación mediante PCR de diferentes dianas (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y Agua MQ) con los iniciadores PT1-R y PT2-F. Calles S, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles A a F, amplificación de 50 ng de ADN purificado utilizando concentraciones crecientes de $MgCl_2$ (1, 1,5, 2, 2,5, 3 y 4mM respectivamente), una banda de 396 pb indica la presencia del elemento mtp40 en el genoma. Calles 1 a 6, amplificación de 5 μ l de agua MQ estéril utilizando concentraciones crecientes de $MgCl_2$ (1, 1,5, 2, 2,5, 3 y 4mM respectivamente).

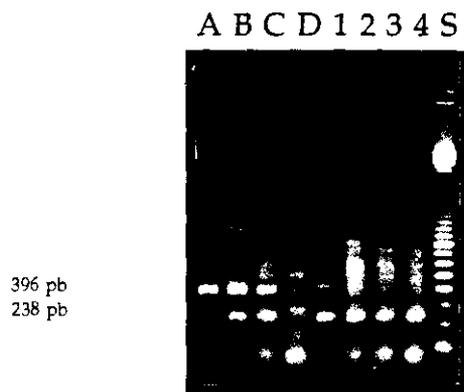


FIG. 2. Efecto de la concentración de $MgCl_2$ en la amplificación mediante PCR de diferentes dianas, con los iniciadores PT1-R/PT2-F y 1081-L/1081-9. Calle S, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles A a D, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* utilizando concentraciones crecientes de $MgCl_2$ (1, 1,5, 2 y 3 mM respectivamente). Calles 1 a 4, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. bovis* utilizando concentraciones crecientes de $MgCl_2$ (1, 1,5, 2 y 3 mM respectivamente). Una banda de 396 pb y de 238 pb indican la presencia del elemento *mtp40* y de la secuencia *IS1081* respectivamente en el genoma.

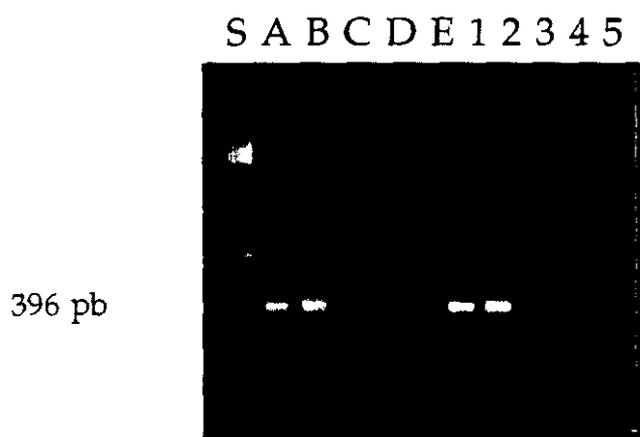


FIG. 3a. Efecto del incremento de la temperatura de emparejamiento en la amplificación mediante PCR de diferentes dianas, con los iniciadores **PT1-R/PT2-F**. Calle **S**, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles **A** a **D**, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* respectivamente. Calle **E**, amplificación de 5 μ l de agua MQ como control negativo. Las condiciones de la reacción fueron 1 mM de $MgCl_2$ y 63°C de temperatura de emparejamiento. Calles **1** a **4**, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* respectivamente. Calle **5**, amplificación de 5 μ l de agua MQ como control negativo. Las condiciones de la reacción fueron 1 mM de $MgCl_2$ y 65°C de temperatura de emparejamiento. Una banda de 396 pb indica la presencia del elemento *mtp40* en el genoma.

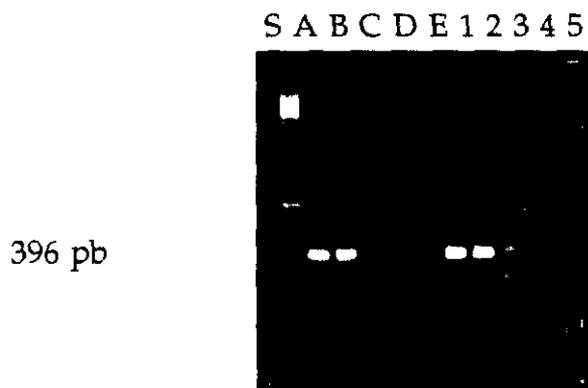


FIG. 3b. Efecto comparativo del incremento de la temperatura de emparejamiento y de la disminución en la concentración de $MgCl_2$ en la amplificación mediante PCR de diferentes dianas con los iniciadores PT1-R/PT2-F. Calle S, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles A a D, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* respectivamente. Calle E, amplificación de 5 μ l de agua MQ como control negativo. Las condiciones de la reacción fueron 0,5 mM de $MgCl_2$ y 65°C de temperatura de emparejamiento. Calles 1 a 4, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* respectivamente. Calle 5, amplificación de 5 μ l de agua MQ como control negativo. Las condiciones de la reacción fueron 1 mM de $MgCl_2$ y 68°C de temperatura de emparejamiento. Una banda de 396 pb indica la presencia del elemento *mtp40* en el genoma.



FIG. 4. Efecto del incremento de la concentración de los iniciadores PT1-R/PT2-F en la amplificación mediante PCR de diferentes dianas. Calles S, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles A a D, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar concentraciones de 20, 25, 50, 100 y 200 ng de cada iniciador PT / reacción respectivamente. Calles 1 a 5 amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. bovis* al utilizar concentraciones de 20, 25, 50, 100 y 200 ng de cada iniciador PT / reacción respectivamente. Las condiciones de la reacción fueron 0,5 mM de $MgCl_2$ y 65°C de temperatura de emparejamiento. Una banda de 396 pb indica la presencia del elemento *mtp40* en el genoma.

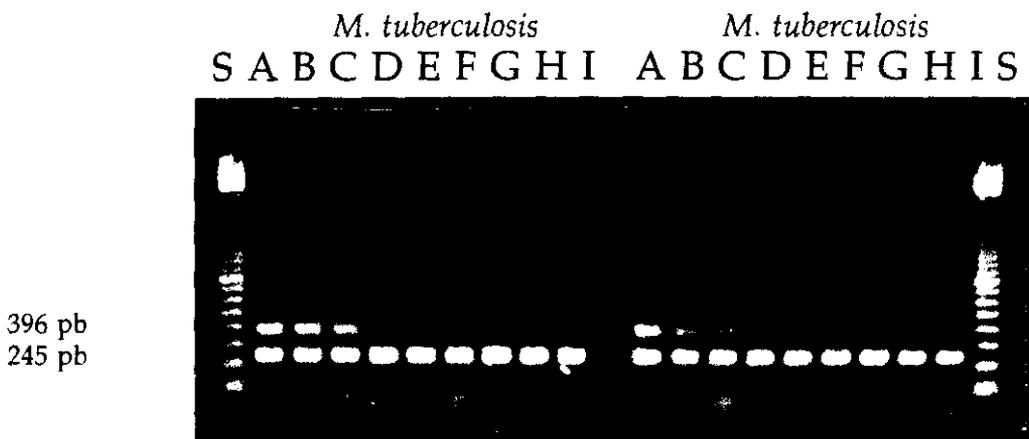


FIG. 5. Titulación conjunta de los iniciadores **PT1-R/PT2-F** e **INS-1/INS-2** en la amplificación mediante PCR de ADN perteneciente a 2 cepas de *M. tuberculosis*. Calles **S**, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles **A, B** y **C**, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de **50 ng de cada iniciador INS / reacción**. Calles **D, E** y **F** amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de **75 ng de cada iniciador INS / reacción**. Calles **G, H** e **I** amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de **100 ng de cada iniciador INS / reacción**. Calles **A, D** y **G** amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de **100 ng de cada iniciador PT / reacción**. Calles **B, E** y **H** amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de **150 ng de cada iniciador PT / reacción**. Calles **B, I** y **G** amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de **200 ng de cada iniciador PT / reacción**. Las condiciones de la reacción fueron 0,5 mM de MgCl₂ y 65°C de temperatura de emparejamiento. Una banda de 396 pb y de 245 pb indican la presencia del elemento *mtp40* y de la secuencia *IS6110* respectivamente en el genoma.

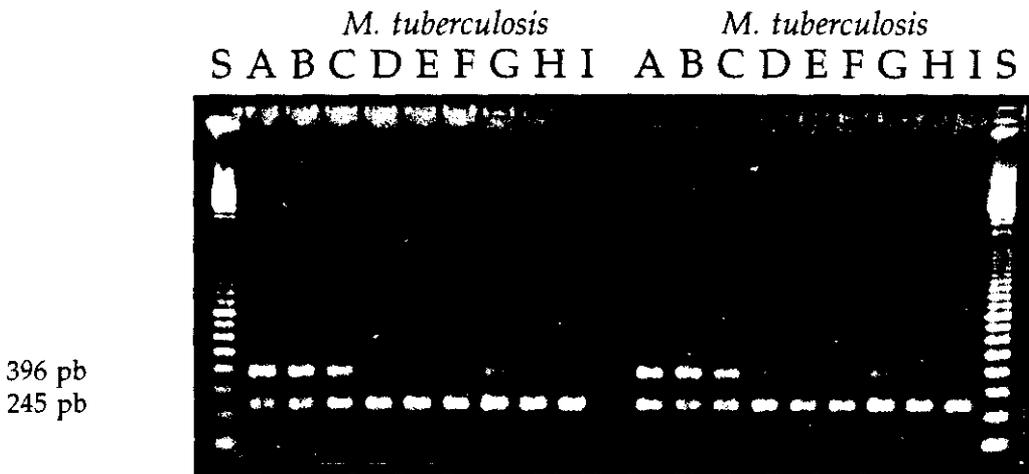


FIG. 6. Titulación conjunta de los iniciadores PT1-R/PT2-F e INS-1/INS-2 en la amplificación mediante PCR de ADN perteneciente a 2 cepas de *M. tuberculosis*. Calles S, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles A, B y C, amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de 30 ng de cada iniciador INS / reacción. Calles D, E y F amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de 40 ng de cada iniciador INS / reacción. Calles G, H e I amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de 50 ng de cada iniciador INS / reacción. Calles A, D y G amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de 100 ng de cada iniciador PT / reacción. Calles B, E y H amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de 150 ng de cada iniciador PT / reacción. Calles B, I y G amplificación de 50 ng de ADN purificado de *M. tuberculosis* al utilizar una concentración de 200 ng de cada iniciador PT / reacción. Las condiciones de la reacción fueron 0,5 mM de MgCl₂ y 65°C de temperatura de emparejamiento. Una banda de 396 pb y de 245 pb indican la presencia del elemento *mtp40* y de la secuencia *IS6110* respectivamente en el genoma.

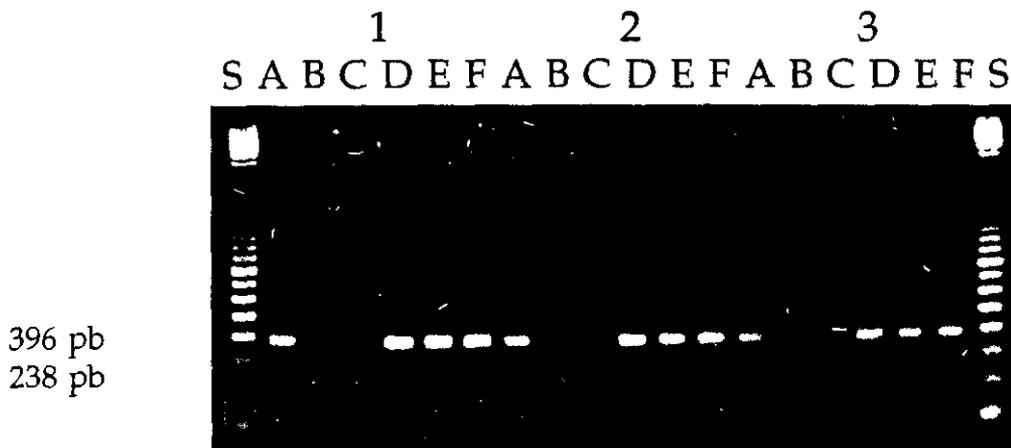


FIG. 7. Titulación conjunta de los iniciadores **PT1-R/PT2-F** y **1081-L/1081-9** en la amplificación mediante PCR de ADN perteneciente a: **A**, *M. tuberculosis*; **B**, agua MQ; **C**, *M. bovis*; **D**, **E** y **F**, *M. tuberculosis*. Calle **S**, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular para el ADN. Calles **A**, **B**, **C**, **D**, **E** y **F**, (1), **A**, **B**, **C**, **D**, **E** y **F**, (2) y **A**, **B**, **C**, **D**, **E** y **F**, (3), amplificación de 50 ng de ADN purificado de las distintas dianas al utilizar una concentración de 30, 40 y 50 ng de cada iniciador 1081 / reacción respectivamente. Para todas ellas se utilizó una concentración de 150 ng de cada iniciador PT / reacción. Las condiciones de la reacción fueron 0,5 mM de MgCl₂ y 65°C de temperatura de emparejamiento. Una banda de 396 pb y de 238 pb indican la presencia del elemento *mtp40* y de la secuencia *IS1081* respectivamente en el genoma.



FIG. 8. Amplificación mediante PCR, con 150 ng de los iniciadores PT1-R/PT2-F y 60 ng de los iniciadores 1081-L/1081-9, de ADNs pertenecientes a: A y B, *M. tuberculosis*; C y D, *M. africanum*; E y F, *M. bovis*; G y H, *M. microti*; I y J, bacilo de focas; K, *M. kansasii*. Calle S, 100 Base-Pair Ladder (Pharmacia) utilizado como control de tamaño molecular. Calles + y -, controles positivo y negativo de la reacción. Las condiciones para la amplificación fueron 0,5 mM de MgCl₂ y 65°C de temperatura de emparejamiento. Una banda de 396 pb y de 238 pb indican la presencia del elemento *mtp40* y de la secuencia *IS1081* respectivamente en el genoma.

CAPITULO III

***TIPIFICACIÓN DE AISLADOS DE M. bovis MEDIANTE
ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS.***

IV.1	OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO	143
IV.2	MATERIAL Y MÉTODOS	
IV.2.1	Cepas de <i>Mycobacterium bovis</i> analizadas	144
IV.2.2	Descripción de las granjas incluidas en el estudio	147
IV.2.2.1	Granjas de la Comunidad Autónoma de Castilla y León	147
IV.2.2.2	Granjas de la Comunidad Autónoma de Cataluña	149
IV.2.2.3	Granjas de otras Comunidades Autónomas	152
IV.2.3	Extracción del ADN	153
IV.2.4	Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	155
IV.2.4.1	Digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción <i>PvuII</i>	155
IV.2.4.2	Digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción <i>AluI</i>	157
IV.2.4.3	Marcadores de tamaño molecular	158
IV.2.4.4	Electroforesis de las muestras de ADN digerido	159
IV.2.4.5	<i>Southern blotting</i>	160
IV.2.4.6	Sondas oligonucleótidos utilizadas en este estudio	162
IV.2.4.6.1	Sonda para la rama izquierda de IS6110 (IS6110 LHS)	162
IV.2.4.6.2	Sonda para la secuencia DR (repetición directa)	162
IV.2.4.6.3	Sonda para la secuencia PGRS (repetición polimórfica con alto contenido G+C)	163
IV.2.4.7	Sondas de ADN de doble cadena utilizadas en el estudio	165

IV.2.4.7.1	Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL)- <i>PvuII</i>	165
IV.2.4.7.2	PhiX174- <i>HaeIII</i> (GIBCO BRL)	165
IV.2.4.7.3	Sonda para la rama derecha de IS6110 (IS6110 RHS)	165
IV.2.4.7.4	Sonda para IS1081	166
IV.2.4.7.5	Sonda para <i>mtp40</i>	166
IV.2.4.8	Hibridación de las membranas	170
IV.2.4.9	Detección de la sonda hibridada	172
IV.2.4.10	Análisis de las imágenes	173

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con IS6110 (RHS y LHS)	176
IV.3.2	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con la sonda para la secuencia DR	181
IV.3.3	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con la sonda para la secuencia PGRS	186
IV.3.4	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con el uso de las sondas para IS1081 y <i>mtp40</i>	191
IV.3.5	Caracterización del ADN de cepas de <i>M. bovis</i> con el uso conjunto de las sondas para las secuencias IS6110, DR y PGRS	192
IV.4	DISCUSIÓN	195

IV.1 OBJETO E INTERÉS DEL TRABAJO

M. bovis es aún uno de los agentes causantes de enfermedades infecciosas más importante en la industria ganadera de muchos países (incluyendo España). Debido a que es capaz de infectar a una gran variedad de especies, tanto domésticas como salvajes e incluso al hombre, hay una gran necesidad de definir los principales reservorios y las rutas de transmisión entre ellos y el ganado.

Una de las herramientas más poderosas para el estudio de la epidemiología de las micobacterias patógenas es la diferenciación de cepas. Actualmente y para tal fin, se están utilizando técnicas genéticas de tipificación, las cuales se basan en diferencias genéticas (polimorfismos del ADN) entre los aislados.

La técnica más utilizada hasta el momento es el *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) del ADN genómico, también llamado *Restriction Endonuclease Analysis* (REA). Esta técnica consiste en poner de manifiesto una serie de fragmentos polimórficos de restricción mediante el uso de sondas específicas dirigidas a determinados elementos.

En las cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se han identificado 3 diferentes elementos genéticos que contribuyen a la diferenciación entre cepas y que pueden ser útiles en estudios epidemiológicos: la secuencia de inserción **IS6110** (Thierry et al., 1990) y las secuencias cortas repetitivas **DR (Direct Repeat)** (Hermans et al., 1991) y **PGRS (Polimorphic GC Rich Repeat)** (Ross et al., 1992).

La técnica de RFLP ha sido y está siendo utilizada de una manera rutinaria en estudios epidemiológicos de tuberculosis humana producida por *M. tuberculosis*. Sin embargo, hasta el momento, sólo se ha realizado un limitado número de estudios de epidemiología molecular de *M. bovis*.

El objeto de este estudio ha sido evaluar la aplicación del RFLP con sondas para los elementos antes indicados, en la caracterización de cepas españolas de *M. bovis* de diferentes procedencias geográficas y animales. Los resultados obtenidos han sido de gran interés para establecer las bases para la creación de un banco de datos epidemiológico que en un futuro próximo permita la realización de trazados epidemiológicos de los brotes de infección por *M. bovis* en nuestro país.

IV.2 MATERIAL Y METODOS

IV.2.1 Cepas de *M. bovis* analizadas

En este estudio se examinaron 148 cepas de *M. bovis* que fueron aisladas en el Laboratorio de micobacterias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de Madrid entre los años 1991 y 1994. La identificación de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales, sondas de ADN AccuProbe (Gene Probe) para el complejo *M. tuberculosis*, y PCR para detectar los elementos IS6110 (Hermans et al., 1990b), IS1081/*mtp40* (Liébana et al., 1996) y ARNr16s/MPB70 (Wilton y Cousins, 1992).

Estas cepas proceden de aislamientos realizados a partir de tejidos animales de distintas especies: bovinos (97), caprinos (30) y ovinos (1) de un total de 36 granjas diferentes. Además se incluyeron en el estudio 15 cepas de *M. bovis* aisladas de humanos, 1 cepa aislada de un caso clínico de un gato doméstico y 4 cepas aisladas a partir de jabalíes.

Las cepas bovinas proceden de 5 áreas geográficas españolas: Castilla y León (granjas números b-1 al b-13), Comunidad Catalana (granjas números b-14 al b-24), Comunidad Autónoma de Madrid (granja número b-25), Cantabria (granja número b-26) y Castilla la Mancha (granja número b-27).

Las cepas caprinas proceden de la Comunidad Catalana (granjas números c-1 al c-6) y de la Comunidad Autónoma de Madrid (granjas números c-7 y c-8). La cepa ovina procede de la Comunidad Catalana (granja o-1).

La cepa felina procede de un caso clínico en un gato doméstico de la Comunidad Autónoma de Madrid, las cepas de jabalíes fueron aisladas a partir de animales del parque nacional de Doñana, y las cepas humanas fueron aisladas en distintos hospitales de la ciudad de Madrid y estuvieron involucradas en un brote de tuberculosis en enfermos de SIDA. Estas últimas cepas presentaron multiresistencia a todos los antibióticos conocidos para el tratamiento de la tuberculosis y ocasionaron la muerte de todos los pacientes contagiados (Gómez-Mampaso, comunicación

personal).

En la **Tabla 1** se muestra la distribución de las cepas en las distintas granjas y su localización geográfica.

Como cepas de referencia para los estudios de tipificación se usaron *M. tuberculosis* Mt.14323 y *M. bovis* BCG 3 ambas cedidas por el RIVM (National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Holanda).

Todas las cepas se aislaron en medios de Coletsos (bioMérieux) y Löwenstein-Jensen (bioMérieux) a una temperatura de 37°C hasta la obtención de un número suficiente de colonias.

TABLA 1. Distribución de cepas en granjas y especies.

Rebaño (Area)	Nº de cepas	Origen
b-1 (Castilla y León)	1	bovino
b-2 (Castilla y León)	12	bovino
b-3 (Castilla y León)	1	bovino
b-4 (Castilla y León)	3	bovino
b-5 (Castilla y León)	2	bovino
b-6 (Castilla y León)	1	bovino
b-7 (Castilla y León)	2	bovino
b-8 (Castilla y León)	1	bovino
b-9 (Castilla y León)	4	bovino
b-10 (Castilla y León)	3	bovino
b-11 (Castilla y León)	3	bovino
b-12 (Castilla y León)	2	bovino
b-13 (Castilla y León)	4	bovino
b-14 (Cataluña)	1	bovino
b-15 (Cataluña)	1	bovino
b-16 (Cataluña)	3	bovino
b-17 (Cataluña)	1	bovino
b-18 (Cataluña)	1	bovino
b-19 (Cataluña)	1	bovino
b-20 (Cataluña)	1	bovino
b-21 (Cataluña)	2	bovino
b-22 (Cataluña)	20	bovino
b-23 (Cataluña)	4	bovino
b-24 (Cataluña)	20	bovino
b-25 (Cantabria)	1	bovino
b-26 (Guadalajara)	1	bovino
b-27 (Madrid)	1	bovino
c-1 (Cataluña)	6	caprino
c-2 (Cataluña)	12	caprino
c-3 (Cataluña)	1	caprino
c-4 (Cataluña)	2	caprino
c-5 (Cataluña)	2	caprino
c-6 (Cataluña)	1	caprino
c-7 (Madrid)	5	caprino
c-7 (Madrid)	1	caprino
o-1 (Cataluña)	1	ovino
Hosp. Ramón y Cajal	15	humanos
Madrid	1	felina
Doñana	4	jabalies

IV.2.2 Descripción de las granjas incluidas en el estudio.

IV.2.2.1 Granjas de la Comunidad Autónoma de Castilla y León

* **granja b-1 ("León 1")**: situada en La Cuesta (sección agraria comarcal de La Bañeza). Se trata de una explotación con un contingente de animales estable de unas 15 cabezas (8-10 hembras adultas en producción) de aptitud cárnica (producción y engorde de terneros). Su situación higiosanitaria es muy precaria: los animales están estabulados, las condiciones de ventilación e iluminación son deficientes y los suelos y paredes están muy sucios. La presentación de la tuberculosis es enzoótica desde 1992, el posible papel en la transmisión de la enfermedad es poco importante ya que se trata de una explotación aislada de montaña y los animales salen directamente a matadero.

* **granja b-2 ("León 21")**: localizada en Valdemora (S.A.C. de Valencia de Don Juan). Es una explotación destinada a la producción de leche y venta de terneros con un contingente estable de unas 60 cabezas (40 hembras en producción) de raza frisona. La situación higiosanitaria es deficiente, los animales se encuentran en libertad en un parque exterior con suelo de cemento. La enfermedad apareció de forma explosiva entre 1993 y 1994, realizándose un vacío sanitario de la explotación. El posible papel en la transmisión de la enfermedad es poco importante ya que la venta de terneros era para muerte.

* **granja b-3 ("León 51")**: situada en San Félix de la Valdería (S.A.C. de La Bañeza). Se trata de una explotación para producción de leche y venta de terneros con un contingente estable de unos 20 animales (12 hembras en producción) de raza frisona. Los animales se encuentran en deplorables condiciones higiosanitarias y la enfermedad apareció en 1994 en un brote que afectó a un 20 % de los animales, desapareciendo en 1995. El papel en la transmisión de la enfermedad es poco importante ya que la venta de terneros era para muerte.

* **granja b-4 ("León 56")**: localizada en Val de San Román (S.A.C. de Astorga). Es una explotación para producción de leche y venta de terneros con un contingente estable de unos 25 animales (18 hembras en producción) de raza frisona. La

condiciones higiosanitarias son deficientes y la tuberculosis ha tenido un carácter enzootico desde 1990. El papel en la transmisión de la enfermedad es poco importante ya que la venta de terneros era para muerte.

* **granja b-5 ("León 7")**: situada en Calzada de la Valdería (S.A.C. de La Bañeza). Explotación para producción de leche y venta de terneros con un contingente estable de unos 10 animales (5 hembras en producción) de raza frisona. Condiciones de explotación muy deficientes y enfermedad de carácter enzootico desde 1992. El papel en la transmisión de la enfermedad es poco importante ya que la venta de terneros era para muerte.

* **granja b-6 ("León 14")**: localizada en Santa María de la Isla (S.C.A. de La Bañeza). Explotación para producción de leche con un contingente estable de unos 70 animales (40 hembras en producción) de raza frisona selecta. Condiciones higiosanitarias adecuadas, la enfermedad apareció en 1993 por introducción de ganado no saneado. El papel transmisor de esta granja es importante ya que vende animales de alta calidad genética a otras explotaciones.

* **granja b-7 ("León 19")**: situada en Cebrones del Río (S.A.C. de La Bañeza). Explotación destinada a la producción láctea y a la venta de terneros con un contingente estable de unos 40 animales (25 hembras en producción) de raza frisona. Deficientes condiciones de explotación y problema presente de forma enzootica desde 1992. El papel transmisor de esta granja es importante ya que vende terneras a otras explotaciones.

* **granja b-8 ("León 27")**: emplazada en San Cristóbal de la Polantera (S.A.C. de La Bañeza), censo de explotación muy reducido (4 cabezas) con animales frisonas para producción de leche. Enfermedad de carácter enzootico desde 1992, sin importancia en la transmisión de la misma a otras explotaciones.

* **granja b-9 ("León 38")**: situada en Quintana de Rueda (S.A.C. de León), localidad caracterizada por un gran número de establos con presencia de tuberculosis. Explotación destinada a la producción láctea y a la venta de terneros con un contingente estable de unos 15 animales (10 hembras en producción) de raza frisona. Deficientes condiciones de explotación y problema presente de forma enzootica desde 1992. El papel transmisor de esta granja es poco importante ya que no vende

terneras a otras explotaciones y las dedica a reposición o a su venta para muerte. Sin embargo, esta granja compró animales de diversa procedencia en los últimos años.

* **granja b-10 ("León 41-Ponferrada")**: localizada en Mansilla Mayor (S.A.C. de León). Granja con un contingente muy variable dedicada a la recría de terneras frisonas para venta en vida, malas condiciones higiosanitarias y tuberculosis con carácter enzooótico tanto en terneras como en animales adultos. El papel transmisor de esta granja es importante ya que vende terneras a otras explotaciones.

* **granja b-11 ("León 29")**: situada en Val de San Lorenzo (S.A.C. de Astorga). Granja con un contingente muy variable (compra animales de las más variadas procedencias) dedicada al engorde de terneros para su venta para carne, malas condiciones higiosanitarias y tuberculosis con carácter enzooótico. El papel en la transmisión de la enfermedad es poco importante ya que la venta de terneros era para muerte.

* **granja b-12 ("León 37")**: emplazada en Quintana de Rueda (S.A.C. de León). Explotación destinada a la producción láctea y a la venta de terneros con un contingente estable de unos 15 animales (10 hembras en producción) de raza frisona. Deficientes condiciones de explotación y problema presente de forma enzooótica. Papel en la transmisión de la enfermedad poco importante.

* **granja b-13 ("León 54")**: situada en San Román de la Vega (S.A.C. de Astorga). Explotación destinada a la producción láctea y a la venta de terneros con un contingente estable de ganado frisón selecto. Condiciones de explotación correctas, la tuberculosis se introdujo por la compra de ganado sin controlar en 1991 y desde entonces mantiene un carácter enzooótico.

IV.2.2.2 Granjas de la Comunidad Autónoma de Cataluña.

* **granja b-14 ("133.AD")**: situada en la comarca de Borredà. Explotación de 30 cabezas de raza frisona destinadas a la producción de leche, buen estado higiosanitario.

* **granja b-15 ("653.BD")**: localizada en St. Agustí de Lluçanès. Es una explotación familiar de 21 cabezas (adultas) de raza frisona y destinadas a la

producción de leche. Condiciones de explotación mediocres, se realizó un vacío sanitario después de constatarse que todo el ganado de la cuadra era tuberculina positivo.

* **granja b-16 ("215.CG")**: situada en Folgueroles. Explotación familiar de unas 12 cabezas de vacuno frisón destinado a la producción de leche. En las últimas dos tuberculinizaciones no ha tenido animales positivos.

* **granja b-17 ("405.AB")**: emplazada en Malla. Se trata de una explotación con unas 102 cabezas de ganado frisón destinado a producción de leche. Presentó un problema de tuberculosis enzoótica entre los años 1986-89, a partir del año 1991 sacrificó adecuadamente a todo el ganado positivo a tuberculina y repuso animales de explotaciones libres de tuberculosis. Actualmente está libre de la enfermedad.

* **granja b-18 ("583.AG")**: situada en Prats de Lluçanès. Es una explotación familiar de 17 animales destinada a la producción de leche y terneros. Se realizó un vacío sanitario después de constatarse que todo el ganado de la cuadra era tuberculina positivo.

* **granja b-19 ("Salvi")**: localizada en Mollet del Valles. Explotación de 15 animales de aptitud lactopoyética. Deficientes condiciones de explotación.

* **granja b-20 ("661.BC")**: situada en St. Boi de Lluçanès. Es una explotación familiar de unos 20 animales, entre 1991 y 1993 se sacrificó adecuadamente todo el ganado positivo a IDTB. Actualmente repone a partir de explotaciones libres de la enfermedad y en el último control no presentó ningún animal positivo.

* **granja b-21 ("397.AV")**: emplazada en Lluçà. Granja familiar de unos 20 animales que sacrificó a todo su contingente en 1992.

* **granja b-22 ("Verge")**: situada en Penelles. Explotación de unos 400 animales de raza frisona y aptitud lactopoyética, entre 1992 y 1993 aparecieron un elevado número de animales positivos que se sacrificaron, en 1994 se realizó un vaciado sanitario por un problema de brucelosis. Hoy en día la granja ha repuesto sus animales con ganado selecto procedente de Holanda, Dinamarca y Alemania.

* **granja b-23 ("Teruel")**: situada en Vic, pocos datos sobre esta explotación ya que los animales de la misma se muestrearon sólo por el hecho de que se sacrificaron en el matadero el mismo día en que se estaba inspeccionando otros animales. Sólo se

conoce que estos animales eran tuberculina positivos.

* **granja b-24 ("Agusti")**: localizada en Llivia. Explotación de unas 300 cabezas de ganado frisón selecto. Problema de aparición explosiva que llevó a la realización de un vaciado sanitario.

* **granja c-1 ("Barna 1")**: situada en la comarca del Vallés Oriental, en la localidad de St. Pere de Vilamajor. Explotación creada en 1987 con animales de raza murciano-granadina procedentes de Murcia, Granada y Málaga, destinada a la producción de leche y quesos. Actualmente las hembras proceden de la reposición de la propia granja, pero los machos siguen procediendo del sur de España.

* **granja c-2 ("Barna 2")**: emplazada en la comarca del Vallés Oriental, en la localidad de Cànoves, características similares a la anterior.

* **granja c-3 ("Barna 3")**: situada en la comarca del Vallès Oriental, en la localidad de Les Franqueses del Vallès. Animales de raza malagueña, los machos son de selección genética y están tatuados. Es una práctica común el intercambio de animales entre estas 3 explotaciones.

* **granja c-4 ("Barna 4")**: situada en la comarca del Baix Camp, en la localidad de l'Albiol. Explotación familiar con bajo número de animales de procedencia desconocida.

* **granja c-5 ("Barna 5")**: situada en Artese de Segre (Lleida), características comunes con las granjas c-1, c-2 y c-3.

* **granja c-6 ("Barna 6")**: situada en el Baix Penedes, en la localidad de l'Arboc. Se trata de una pequeña explotación con un contingente variable y con escasos datos sobre su procedencia. Pastos compartidos con ganado ovino de la misma localidad.

* **granja o-1 ("ovino")**: granja de ovino situada en en el Baix Penedes, en la localidad de l'Arboc.

IV.2.2.3 Granjas de otras Comunidades Autónomas

* **granja b-25 ("Santander")**: situada en Santander (Cantabria), explotación con 300 cabezas de vacuno frisón destinada a la producción de leche. La enfermedad apareció en forma de brote explosivo.

* **granja b-26 ("Guadalajara")**: situada en Campillo de Ranas (Guadalajara), explotación de 70 cabezas en régimen extensivo y destinadas a la producción de carne. La tuberculosis apareció un forma de brote agudo.

* **granja b-27 ("Madrid 1")**: situada en Colmenar Viejo (Madrid), explotación de 70 cabezas de ganado frisón destinado a la producción de leche.

* **granja c-7 ("Colmenar")**: situada en Buitrago, es una granja de unos 100 animales selectos de raza Cabra del Guadarrama. En los últimos dos años ha presentado un problema crónico de tuberculosis con elevados índices de positividad.

* **granja c-8 ("Madrid 2")**: situada en Fuencarral, se trata de una granja escuela en la que sólo existía un animal que fue comprado en la granja c-7.

IV.2.3 Extracción del ADN

Una vez identificadas y constatada la pureza de las cepas mediante examen de la morfología de las colonias y tinción de Ziehl-Neelsen, se procedió a su subcultivo en 25 ml del medio líquido **Middlebrook 7H9 broth** (Difco, Detroit, Michigan) suplementado con **Middlebrook OADC enrichment w/WR 1339** (Difco, Detroit, Michigan), piruvato sódico (4 g/l) e hidrolizado pancreático de caseína (1 g/l) (Difco, Detroit, Michigan). Las cepas se mantuvieron a 37°C con agitación ocasional, hasta la obtención de un sedimento de cultivo suficiente para la extracción del ADN.

El sedimento de los cultivos se recogió mediante centrifugación del tubo de cultivo a 6000 r.p.m. durante 30 minutos (centrífuga SIGMA 3-10). Tras retirar el sobrenadante mediante decantación, el sedimento obtenido se pasó a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.

Las células fueron resuspendidas en 350 µl de agua estéril e incubadas durante 3 horas a 37°C tras añadir 50 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml) (SIGMA). Se procedió a continuación a la lisis de las células mediante la adición de 50 µl de SDS (laurilsulfato de sodio) al 10 % y a la digestión de los restos proteicos de la muestra, para lo cual ésta se incubó durante una noche a 50°C con 50 µl de una solución de proteinasa K (1 mg/ml) (SIGMA).

Después de la digestión, se añadieron 100 µl de una solución 5M de NaCl y 80 µl de una solución de CTAB/NaCl (CTAB al 10 %, NaCl 0,7 M) precalentada a 65°C, se mezcló fuertemente en un agitador y se incubó durante 10 minutos a 65°C.

A continuación se realizó una extracción añadiendo 0,6 ml de una mezcla cloroformo/isoamílico (24:1), se mezcló en un agitador durante 10 segundos y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 minutos a 6500 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf). Se recogió cuidadosamente la fase acuosa superior y se procedió a la precipitación del ADN con isopropanol a -20°C, para lo cual se añadió a la muestra un volumen equivalente de isopropanol, se mezcló mediante la inversión repetida del tubo y se mantuvo a -20°C hasta la visualización de hebras algodonosas. Para la recuperación del ADN precipitado se centrifugó durante 10 minutos a 6500

rpm en la microcentrífuga (Eppendorf 415-C), desechándose el sobrenadante.

El ADN así obtenido se lavó 2 veces con etanol al 70 % y se desecó en una estufa a 37°C, para evaporar los restos alcohólicos. Posteriormente se disolvió en 30 µl de tampón TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y se mantuvo a 4°C hasta su utilización.

En cada lote de extracciones se incluyó un control negativo y positivo de extracción para detectar contaminaciones cruzadas y/o posibles errores en la metodología empleada.

La concentración y la calidad de los ADN obtenidos se analizó mediante electroforesis de la mezcla de 1 µl del ADN extraído más 3 µl H₂O ultrapura estéril y 1 µl de **tampón para muestra de ADN con ARNasa 5x (SB 5x)** [50 % glicerol (peso/volumen), 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,05 % azul de bromofenol, 30 µg/ml de ARNasa (Boehringer Mannheim)], en un gel de agarosa (BIORAD) al 0,8% durante 1 hora a 80 voltios (proporcionado por una fuente de voltaje variable de BIORAD) y utilizando como tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA). Después se procedió a la tinción del gel con bromuro de etidio (30 minutos en inmersión en una solución al 0,5 µg/ml), y a fotografiarlo bajo luz ultravioleta. La concentración aproximada del ADN se estimó mediante comparación con una escala patrón (Van Soolingen et al., 1992b).

IV.2.4 *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)*

IV.2.4.1 Digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción *PvuII*

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias cortas de nucleótidos y digieren el ADN de cadena doble en lugares específicos, generando de este modo fragmentos menores de ADN.

La enzima *PvuII*, obtenida de *Proteus vulgaris* reconoce la secuencia **CAG CTG** y digiere el ADN específicamente entre esos dos tripletes de bases. La secuencia de inserción IS6110 posee un único sitio de restricción para *PvuII* localizado en la posición 464 pb de su secuencia (Thierry et al., 1990), los elementos IS1081 (Collins y Stephens, 1991) y *mtp40* (Parra et al., 1991) no poseen ningún sitio de restricción para *PvuII* en su secuencia.

Aproximadamente 4 µg de las muestras de ADN de *M. bovis* y 4 µg de ADN genómico de cada una de las cepas de referencia Mt.14323 y BCG3 se digirieron con *PvuII* (Boehringer Mannheim). Las digestiones se llevaron a cabo en grupos de 30 muestras (28 ADN de *M. bovis* y 2 ADN de los controles Mt. 14323 y BCG3). La digestión se realizó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml en un volumen final de 20 µl con los siguientes componentes la reacción:

* 4 µg de ADN.

* 2 µl de **tampón de incubación 10x** [100 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM ditioeritritol (DTE)].

* 0,5 µl de *PvuII* (40 U/µl).

* H₂O ultrapura estéril hasta un volumen final de 20 µl.

Los constituyentes de la reacción se mezclaron cuidadosamente y se centrifugaron a 12.000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf 415-C). Posteriormente la mezcla se incubó a 37°C en baño de agua durante al menos 4 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se pasaba a añadir a los 20 µl de cada muestra digerida 5 µl de **tampón para muestra de ADN con ARNasa y con marcador interno de peso molecular 5x (SR 5x)** [SB 5x, 0,5 ng/µl PhiX174/*HaeIII*

fragments (GIBCO BRL), 1 ng/ μ l Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL) digerido con *PvuII*].

Para la preparación del Supercoiled DNA ladder/*PvuII* se procedió como se indica a continuación:

Se precipitan 50 μ l del Supercoiled DNA ladder a 250 ng/ μ l (GIBCO BRL) añadiendo: 150 μ l de TE 1x (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8), 500 μ l de etanol absoluto y 25 μ l de NaCl 5M. La mezcla se incuba a -20°C durante 30 minutos y se centrifuga a 12.000 rpm durante 15 minutos en microcentrífuga, para posteriormente retirar el sobrenadante y dejar secar el precipitado en estufa a 37°C. Una vez seco, el precipitado se resuspende en 58 μ l de TE 0,1x. A continuación se procede a la digestión del ADN añadiendo 5 μ l de la enzima *PvuII* (40 U/ μ l, Boehringer Mannheim) y 7 μ l del tampón de incubación 10x e incubando la reacción durante 12 horas a 37°C. Seguidamente la mezcla se fenoliza añadiendo 330 μ l de TE 1x y 400 μ l de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcla por inversión del tubo varias veces hasta que se forma una emulsión y se centrifuga a 12.000 rpm durante 15 segundos en microcentrífuga. La fase acuosa superior se recoge cuidadosamente y se transfiere a un nuevo tubo, el ADN se precipita ahora añadiendo 1 ml de etanol absoluto e incubando a -20°C durante 30 minutos. Para recoger el ADN precipitado se procede a centrifugar a 12.000 rpm durante 15 minutos en microcentrífuga, después de retirar el sobrenadante y de secar el precipitado, éste se resuspende en 40 μ l de TE 1x. La concentración final del marcador es equiparable a la original (250 ng/ μ l).

Para comprobar que las muestras de ADN han sido correctamente digeridas con *PvuII*, se procede a cargar 5 de los 25 μ l de cada una de las mezclas ADN digerido/SR 5x en un gel de agarosa al 1% (gel de comprobación) y se someten a electroforesis con tampón TAE durante 15 minutos a 100 voltios. Después de teñir el gel con bromuro de etidio y fotografiarlo bajo luz ultravioleta, podemos comprobar si la digestión se ha completado en todas las muestras y podemos estimar la cantidad relativa de ADN digerido que tenemos en cada una de ellas. Esto nos permite decidir que cantidad de la muestra digerida vamos a someter a la electroforesis (debe ser de

aproximadamente 2 µg) y reajustar la cantidad de ADN para la digestión con *AluI* en caso de que en alguna de las muestras la estimación de la cantidad de ADN que hemos digerido con *PvuII* no fuese correcta. Hay que resaltar que es importante que la cantidad de ADN utilizada para la digestión en cada muestra sea lo más homogénea posible en todas ellas, así como la cantidad de ADN digerido que se someta a la electroforesis.

IV.2.4.2 Digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción *AluI*

La endonucleasa *AluI*, obtenida de *Arthrobacter luteus*, reconoce la secuencia **AG CT** y digiere el ADN específicamente entre ambos pares de bases.

Aproximadamente 4 µg de las muestras de ADN de *M. bovis* y 4 µg de ADN genómico de cada una de las cepas de referencia Mt.14323 y BCG3 se digirieron con *AluI* (Boehringer Mannheim). Las digestiones se llevaron a cabo en grupos de 30 muestras (28 ADN de *M. bovis* y 2 ADN de los controles Mt. 14323 y BCG3). La digestión se realizó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml en un volumen final de 20 µl con los siguientes componentes la reacción:

* 4 µg de ADN.

* 2 µl de **tampón de incubación 10x** [100 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 10 mM ditioneol (DTE)].

2 µl de *AluI* (10 U/µl).

* H₂O ultrapura estéril hasta un volumen final de 20 µl.

Los constituyentes de la reacción se mezclaron cuidadosamente y se centrifugaron a 12.000 rpm en una microcentrífuga. Posteriormente la mezcla se incubó a 37°C en baño de agua durante al menos 4 horas.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedía a inactivar la endonucleasa *AluI* mediante tratamiento térmico a 65°C durante 15 minutos (su inactivación impide que la enzima actúe sobre el marcador interno de peso molecular), para posteriormente añadir a los 20 µl de cada muestra digerida 5 µl del SR 5x.

IV.2.4.3 Marcadores de tamaño molecular

La utilización de marcadores internos de peso molecular es de enorme importancia para incrementar la fiabilidad del análisis por ordenador de los patrones de bandas obtenidos en los RFLP, y para permitir la comparación de resultados entre distintos geles y el intercambio de datos entre laboratorios. En la metodología empleada en este estudio se han utilizado 2 tipos distintos de marcadores:

a) ADN de *M. tuberculosis* Mt. 14323 y *M. bovis* BCG3. Estos ADN se digieren junto al resto de las muestras y se cargan siempre en los pocillos número 1 y 30 respectivamente de cada gel, de forma que después de la hibridación con las diferentes sondas, podamos contar con unos controles que servirán para verificar que la digestión y la hibridación han sido correctas. Además estos patrones, al ser conocidos de antemano e iguales para todos los geles, nos ayudan a comprobar que la normalización de los geles durante el análisis por ordenador es correcta.

b) Una mezcla de Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL)-*PvuII* y PhiX174-*HaeIII* (GIBCO BRL) que se añade a cada muestra de ADN digerida y que sirve como un marcador interno de tamaño molecular. Para visualizar este marcador, las membranas de nylon una vez hibridadas con las sondas específicas correspondientes, se rehibridan con una mezcla de Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL)-*PvuII* y PhiX174-*HaeIII* (GIBCO BRL).

El uso de este marcador interno permite una estimación precisa del tamaño molecular de los fragmentos de restricción del ADN que han hibridado con una sonda determinada. Para ello sólo hay que superponer los autoradiogramas obtenidos con la sonda específica y con la sonda para el marcador de peso molecular. Estos marcadores son críticos cuando es necesario realizar el análisis por ordenador de un gran número de cepas.

Todos los componentes del ADN del Supercoiled DNA ladder (11 plásmidos con tamaños entre 2 y 16 kb) están superenrollados, al digerirlo con *PvuII* todos los

fragmentos pasan de ser circulares a ser lineares, excepto el más pequeño de ellos (2,067 kb) que no posee un sitio de restricción para *PvuII*. En este último aproximadamente un 30 % del producto pasa a ser circular abierto y se comporta en la electroforesis de forma muy parecida a como lo haría un fragmento lineal de igual tamaño (2 kb), el resto del fragmento que aún está superenrollado tiene una movilidad similar a la de un fragmento lineal de 1,25 kb.

Los fragmentos que se visualizan para este marcador tienen los siguientes tamaños:

Supercoiled DNA ladder-*PvuII*: 16.210, 14.174, 12.138, 10.098, 8.066, 7.048, 6.030, 5.012, 3.990, 2.972, 2.067 y 1.250 kb.

PhiX174-*HaeIII*: 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 234, 194, 118 y 72 pb.

IV.2.4.4 Electroforesis de las muestras de ADN digerido.

Digestión con *PvuII*:

Para cada grupo de 30 muestras digeridas con *PvuII* se carga y se corre un sólo gel (**Gel A**) como se indica a continuación:

Una vez comprobada la digestión se procede a cargar en un gel de agarosa al 1 % (se utilizan cubetas de BIORAD tamaño grande para geles de 225 ml) el volumen de las muestras que se ha estimado a partir del gel de comprobación. Si la decisión original de la cantidad de ADN utilizada en la digestión fue correcta, todas las muestras presentarán un aspecto similar (**Figura 1**) y como media será suficiente con cargar 12 de los 20 µl de los que disponemos (lo que corresponde a unos 2 µg de ADN digerido). En aquellos casos en los que se advierta menor cantidad de ADN digerido o una digestión de mala calidad se debe incrementar la cantidad de ADN que se carga para esa muestra (hasta 20 µl si fuese necesario), además en estos casos se debe reajustar el volumen de ADN que se empleará para la digestión con *AluI*.

Las condiciones de la electroforesis son de 45 voltios durante 16 horas con recirculación del tampón (TAE 1x) y refrigeración a 14°C (*Chiller* BIORAD).

Digestión con *AluI*:

Para cada grupo de 30 muestras digeridas con *AluI* se cargan y se corren dos geles como se indica a continuación:

Gel B: en un gel de agarosa al 1 % (se utilizan cubetas de BIORAD tamaño grande para geles de 225 ml), se cargan 12 de los 25 μ l de los que disponemos. Las condiciones de la electroforesis son de 45 voltios durante 28 horas con recirculación del tampón (TAE 1x) y refrigeración a 14°C (*Chiller* BIORAD).

Gel C: en un gel de agarosa al 1,5 % (se utilizan cubetas de BIORAD tamaño grande para geles de 225 ml), se cargan los restantes 13 μ l. Las condiciones de la electroforesis son de 45 voltios durante 16 horas con recirculación del tampón (TAE 1x) y refrigeración a 14°C (*Chiller* BIORAD).

En cada gel (tanto de *PvuII* como de *AluI*) los pocillos números 1 y 30 se reservan para los controles *M. tuberculosis* Mt.14323 y *M. bovis* BCG3, y las 28 muestras se colocan en los pocillos números 2 a 29. En el esquema utilizado llamamos pocillo número 1 al de la esquina superior derecha y pocillo número 30 al de la esquina superior izquierda.

IV.2.4.5 *Southern blotting*

Mediante esta técnica se persigue la transferencia de los fragmentos de ADN electroforéticamente separados a membranas de nylon que actuarán como soporte de las hibridaciones posteriores.

Los ADN digeridos y separados mediante la electroforesis se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim) mediante el uso de un aparato de *blotting* por vacío (Pharmacia LKB Biotechnology).

Las membranas se prepararon de la siguiente forma:

1) Se corta una *Nylon Membrane, positively charred* (Boehringer Mannheim) con forma de rectángulo de un tamaño 20 x 15 cm.

2) Se marca el borde superior derecho mediante un pequeño corte.

3) Se rotula con el código de la membrana utilizando para ello un bolígrafo ordinario (al lado del corte y lo más cerca posible del borde). Con el fin de que el código pueda evidenciarse en el autoradiograma, se aplicaba por encima del mismo y con la ayuda de un pincel la llamada **mezcla para marcado (MM)** (12,5 ml TE 1x, 1 ml SR 5x, 500 µl de ADN de *M. tuberculosis* Mt.14323 a 10 ng/µl, 4 µl PhiX174-*Hae*III a 500 ng/µl, 10 µl Supercoiled DNA ladder a 250 ng/µl y 1,5 ml NaOH 4 M); una vez aplicada se secaba con la ayuda de un secador de aire caliente.

4) Se aplica 1 µl de la **mezcla para puntos de referencia (SRM)** (35 µl de ADN de *M. tuberculosis* Mt.14323 a 1 ng/µl, 5 µl de NaOH 4 M y 10 µl de SR 5x) a cada una de las esquinas de la membrana y seguidamente se seca con un secador de aire caliente. Estos 4 puntos nos proporcionarán 4 referencias para poder superponer los autoradiogramas con precisión.

5) La membrana así preparada se moja en agua MQ estéril, quedando así lista para su utilización.

Todos los componentes del aparato de *blotting* por vacío deben enjuagarse con agua MQ antes de su uso, el equipo de transferencia se montaba como se indica a continuación:

1) El soporte poroso se coloca sobre la carcasa del aparato con la cara brillante y lisa hacia arriba.

2) La membrana se coloca encima del soporte con la ayuda de una pinzas (Millipore) de forma que la esquina marcada y el código queden en el extremo superior derecho.

3) Colocar la junta de plástico alrededor de la membrana de forma que se superponga 0,5 cm en todos sus márgenes.

4) Colocar el gel a transferir sobre la membrana:

* Geles A y C: se coloca el margen superior del gel (línea de los pocillos) sobre el lado izquierdo del rectángulo de la membrana de forma que el pocillo número 1 quede cerca de la esquina superior izquierda y que el pocillo número 30 quede cerca de la esquina inferior izquierda de la membrana. La línea de los pocillos debe quedar fuera del área de la membrana.

* Gel B: en este caso los fragmentos de ADN que nos interesan son los de menor peso molecular, y por ello se coloca el margen inferior del gel sobre el lado derecho del rectángulo de la membrana de forma que el extremo final de la calle número 1 quede cerca de la esquina superior derecha y que el extremo final de la calle número 30 quede cerca de la esquina inferior derecha de la membrana.

Los geles deben depositarse sobre la membrana deslizando en un sólo movimiento.

5) Colocar la tapa del aparato, conectar la bomba de vacío y cubrir el gel completamente con NaOH 0,4 M.

El nivel de vacío (40 mbar) era proporcionado por una bomba de vacío variable (Pharmacia LKB Biotechnology) y la transferencia se mantenía durante 1 hora con el gel siempre cubierto por NaOH 0,4 M. Una vez transcurrido ese tiempo las membranas se enjuagaban en SSC 2x (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M) para eliminar el NaOH y se dejaban secar al aire sobre un papel Whatman 3 MM. Una vez seca el ADN se fijaba a la membrana mediante tratamiento térmico de 120°C durante 25 minutos. Las membranas así preparadas se guardaban a -20°C entre 2 papeles Whatman 3 MM y selladas en bolsas de plástico hasta su utilización.

IV.2.4.6 Sondas oligonucleótidos utilizadas en este estudio

IV.2.4.6.1 Sonda para la rama izquierda de IS6110 (IS6110 LHS):

Se trata de un oligonucleótido de 31 bases que corresponden a la posiciones 1 a 31 del extremo de la secuencia situado a la izquierda del sitio de restricción para *PvuII* (posición 464 de IS6110). Su secuencia es: 5' CGA TGA ACC GCC CCG GCA TGT CCG GAG ACT C 3'.

IV.2.4.6.2 Sonda para la secuencia DR (repetición directa):

Se trata de un oligonucleótido de 36 bases derivado de la secuencia consenso encontrada para los fragmentos DR que flanquean a IS6110. Su secuencia es: 5' GTC GTC AGA CCC AAA ACC CCG AGA GGG GAC GGA AAC 3'.

IV.2.4.6.3 Sonda para la secuencia PGRS (repetición polimórfica con alto contenido G+C):

Se trata de un oligonucleótido de 24 bases derivado de la secuencia consenso para los elementos repetitivos PGRS. Su secuencia es: 5' CCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG 3'.

Estos oligos fueron sintetizados en un sintetizador Pharmacia Gen Assembler Plus y purificados en un gel de poliacrilamida al 20 % conteniendo urea a una concentración de 7 M. Los oligos se visualizaron bajo luz ultravioleta, y se limpiaron de restos salinos mediante columnas NAP-10 (Pharmacia). La síntesis y purificación fue llevada a cabo por la empresa Biotech International Ltd. (Bentley, W.A.).

Las sondas oligo se marcaron no radioactivamente en el extremo 3'-OH terminal con 2'-deoxiuridina-5'-trifosfato-11-digoxigenina (DIG-11-dUTP) utilizando el **DIG oligonucleotide Tailing Kit (Boehringer Mannheim)**. Este método de marcado se basa en la utilización de una enzima terminal-transferasa que incorpora deoxinucleótidos trifosfato (dNTP) al extremo 3' terminal de un oligonucleótido; de forma que si se utiliza una mezcla de DIG-11-dUTP y dATP, la terminal-transferasa sintetizará una *cola* de unos 40-50 nucleótidos de los que varios estarán marcados con digoxigenina. Para ello se incubaba la siguiente mezcla de reacción durante 2 horas a 37°C:

- * 4 µl de tampón de reacción (cacodilato de potasio 1 M, Tris-HCl 125 mM, 1,25 mg/ml de albúmina sérica bovina; pH 6,6 a 25°C).
- * 4 µl de CoCl₂ 25 mM.
- * 1 µl de **alkali-labile DIG-11-dUTP** 1 mM.
- * 200 ng del oligonucleótido (IS6110 LHS, DR, PGRS, oligo control)
- * 1 µl de dATP 10 mM.
- * 1 µl de terminal-transferasa a 50 U/µl.
- * agua ultrapura estéril hasta un volumen total de 20 µl.

En cada reacción se incluía un tubo de reacción con un oligo control no marcado del kit. Una vez concluida la incubación la reacción se paraba añadiendo 1

μl de EDTA 200 mM y 1 μl de glicógeno a 20 mg/ml.

A continuación se procedía a estimar el rendimiento de la reacción de marcado como se expone:

1) Se hacen 5 diluciones seriadas 1:50 (de la 1:50 a la 1:31.250) en tampón TE 1x de los oligonucleótidos (sondas y oligo control sin marcar) que hemos marcado y del oligonucleótido control marcado con DIG-11-dUTP incluido en el kit.

2) Se marca una cuadrícula con un lápiz en una membrana de nylon cargada positivamente y se rotulan las filas con el código de los oligos y las columnas con el de las diluciones. Seguidamente, para cada oligo, se coloca 1 μl de cada dilución en su cuadrícula correspondiente. Los oligos se fijan a la membrana mediante tratamiento térmico de 120°C durante 25 minutos.

3) La membrana se lava en **Tampón 1** (ácido maleico 100 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5 a 20°C) durante 1 minuto.

4) La membrana se incuba en **Tampón 2** {solución madre de reactivo bloqueante [**Blocking Reagent** (Boehringer Mannheim) al 10 % (peso/volumen) en Tampón 1] diluida 1:10 en Tampón 1} durante 30 minutos. Se utiliza aproximadamente 1 ml de Tampón 2 por cada 1 cm² de membrana.

5) Para la detección inmunológica de los oligonucleótidos marcados se utiliza un anticuerpo anti-digoxigenina producido en oveja y conjugado con fosfatasa alcalina [**Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments** (Boehringer Mannheim)]. El anti-DIG-AP (75 mU/ml) se diluye 1:5.000 en Tampón 2 y la membrana se incuba con el anticuerpo diluido durante 30 minutos (es importante que esté cubierta totalmente).

6) La membrana se lava 2 veces durante 15 minutos cada una utilizando Tampón 1 para eliminar el anticuerpo que quede libre.

7) La membrana se incuba en **Tampón 3** (Tris-HCl 100 mM pH 9,5 a 20°C, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) durante 2 minutos. Esta incubación activa a la fosfatasa alcalina.

8) Se prepara la solución sustrato para la detección colorimétrica de la fosfatasa alcalina mezclando 0,1 ml de Tampón 3 con 4,5 μl de **NBT solution** [sal de nitroazul-tetraazolio a 75 mg/ml en dimetilformaamida al 70 % (volumen/volumen)

(Boehringer Mannheim)] y con 3,5 µl de **X-phosphate solution** (sal de toluidinio de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato a 50 mg/ml en dimetilformamida al 100 %, Boehringer Mannheim), los volúmenes indicados son por cada 1 cm² de membrana.

La membrana se incuba con la solución de sustratos en oscuridad y en reposo hasta que se desarrolle el color (hasta 16 horas). Una vez que se alcanza la intensidad de color deseada, la membrana se enjuaga en Tampón 3, se sella en una bolsa de plástico y se fotocopia. De esta forma se puede comparar la intensidad de los controles con la de las sondas marcadas, pudiéndose de este modo estimar que cantidad de sonda ha resultado efectivamente marcada.

Para las sondas IS6110 LHS y DR se encontró que la concentración que daba resultados óptimos en la hibridación era de 2,5 picomoles de sonda marcada/ml de fluido de hibridación.

Para la sonda PGRS la concentración óptima para la sonda era de 1 picomol de sonda marcada/ml fluido de hibridación.

IV.2.4.7 Sondas de ADN de doble cadena utilizadas en el estudio.

IV.2.4.7.1 Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL)-PvuII:

Para la digestión de los fragmentos con PvuII se procedió como se indicó con antelación. El tamaño de los fragmentos obtenidos es 16.210, 14.174, 12.138, 10.098, 8.066, 7.048, 6.030, 5.012, 3.990, 2.972, 2.067 y 1.250 kb.

IV.2.4.7.2 PhiX174-HaeIII (GIBCO BRL):

El tamaño de los fragmentos es el siguiente: 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 234, 194, 118 y 72 pb.

IV.2.4.7.3 Sonda para la rama derecha de IS6110 (IS6110 RHS):

Se trata de un fragmento de ADN de 245 pb localizado a la derecha del sitio de restricción para PvuII (posición 464 pb) entre las posiciones 631 y 875 pb de la secuencia IS6110.

Esta sonda se sintetizó por PCR utilizando las siguientes condiciones de reacción:

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l conteniendo:

- * 10 μ l de tampón de polimerización 5x [Tris-HCl 335 mM pH 8,8 a 25°C, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 83 mM, dNTPs 1mM, 2,25 % de Triton X-10 y 1 mg/ml de gelatina (Biotech International)].
- * 0,25 μ l de *Thermus thermophilus* (Tth) polimerasa a 5,5 U/ μ l (Biotech International).
- * 2 mM de MgCl_2 .
- * 100 ng de cada uno de los iniciadores INS-1 e INS-2 (Hermans et al., 1990b).
- * agua ultrapura estéril hasta completar 48 μ l.
- * 2 μ l de ADN de *M. bovis* BCG3 a 10 ng/ μ l.

IV.2.4.7.4 Sonda para IS1081:

Se trata de un fragmento de 236 pb localizado entre las posiciones 333 y 570 pb de la secuencia IS1081. Esta sonda se sintetizó por PCR utilizando las siguientes condiciones de reacción:

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l conteniendo:

- * 10 μ l de tampón de polimerización 5x [Tris-HCl 335 mM pH 8,8 a 25°C, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 83 mM, dNTPs 1mM, 2,25 % de Triton X-10 y 1 mg/ml de gelatina (Biotech International)].
- * 0,25 μ l de *Thermus thermophilus* (Tth) polimerasa a 5,5 U/ μ l (Biotech International).
- * 2 mM de MgCl_2 .
- * 100 ng de cada uno de los iniciadores 1081-L y 1081-9 (Collins y Stephens, 1991).
- * agua ultrapura estéril hasta completar 48 μ l.
- * 2 μ l de ADN de *M. bovis* BCG3 a 10 ng/ μ l.

IV.2.4.7.5 Sonda para mtp40:

Se trata de un fragmento de 396 pb localizado entre las posiciones 9 a 401 de

la secuencia *mtp40*. Esta sonda se sintetizó por PCR utilizando las siguientes condiciones de reacción:

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l conteniendo:

- * 10 μ l de tampón de polimerización 5x [Tris-HCl 335 mM pH 8,8 a 25°C, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 83 mM, dNTPs 1mM, 2,25 % de Triton X-10 y 1 mg/ml de gelatina (Biotech International)].
- * 0,25 μ l de *Thermus thermophilus* (Tth) polimerasa a 5,5 U/ μ l (Biotech International).
- * 0,5 mM de MgCl_2 .
- * 176 ng de cada uno de los iniciadores PT1 y PT2 (Del Portillo et al., 1991).
- * agua ultrapura estéril hasta completar 48 μ l.
- * 2 μ l de ADN de *M. tuberculosis* Mt. 14323 a 10 ng/ μ l.

Todas las mezclas de PCR se cubrieron con 50 μ l de aceite de parafina estéril (SIGMA) para impedir su evaporación durante los ciclos de amplificación. Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador Corbett FTS-1 (Bioquest International). Las amplificaciones se realizaron utilizando ciclos sucesivos a temperaturas de 94°C (desnaturalización), 65°C (emparejamiento) y 72°C (extensión). Para IS6110 e IS1081, las reacciones fueron sometidas a la temperatura de desnaturalización durante 10 minutos en el primer ciclo y durante 1 minuto en los 34 ciclos siguientes, el tiempo para el emparejamiento fue de 1 minuto en todos los ciclos y para la extensión fue de 2 minutos en los 34 primeros ciclos y 10 minutos en el último ciclo. Para *mtp40* las reacciones fueron sometidas a la temperatura de desnaturalización durante 10 minutos en el primer ciclo y durante 30 segundos en los 34 ciclos siguientes, el tiempo para el emparejamiento fue de 2 minutos en todos los ciclos y para la extensión fue de 3 minutos en los 34 primeros ciclos y 10 minutos en el último ciclo.

Para comprobar que el tamaño de los fragmentos sintetizados mediante PCR era el correcto, se separó un alícuota de 5 μ l y se mezcló con un volumen idéntico de tampón de carga 2x (azul de bromofenol al 0,08 %, xileno-cianol al 0.08 % y glicerol al 10 % en agua) y la mezcla se sometió a electroforesis a una diferencia de potencial

de 100 v durante 40 minutos en un gel de agarosa al 2 % utilizando como tampón TAE 1x. Como marcador de peso molecular se utilizó 100 Base-Pair ladder (Pharmacia).

Antes de proceder a su marcado las sondas sintetizadas por PCR se purificaron mediante un **QIAquick PCR Purification Kit** (QIAGEN) como se indica a continuación:

1) Se mezclan 100 μ l del producto de PCR (son necesarios 2 tubos de PCR) con 500 μ l del **Tampón PB**.

2) Se coloca una columna **QIAquick spin column** en un tubo de 2 ml y se carga la muestra.

3) Se centrifuga durante 1 minuto a 12.000 rpm, se retira la fracción eluida del tubo y se vuelve a colocar la columna sobre él.

5) Añadir a la muestra en la columna 0,75 ml de **Tampón PE** y centrifugar durante 1 minuto a la misma velocidad, desechar la fracción eluida y centrifugar la columna de nuevo durante 1 minuto. Retirar la columna seca y colocarla sobre un nuevo tubo.

6) Eluir el ADN de la columna añadiendo 50 μ l de agua ultrapura estéril y centrifugando durante 1 minuto a 12.000 rpm.

Una vez purificadas se estimó la concentración de las sondas mediante medida de la D.O. a 260 nm en espectrofotómetro (GENEQUANT, Pharmacia) como se indicó previamente.

Todas las sondas de ADN de doble cadena se marcaron no radioactivamente con DIG-11-dUTP utilizando el *kit* de marcado **DIG-High Prime** (Boehringer Mannheim) mediante la técnica de marcado por unión aleatoria de iniciadores (*Random primed DNA labeling*, Feinberg y Vogelstein, 1984). Esta técnica se basa en la hibridación de oligonucleótidos iniciadores de cualquier secuencia posible al ADN desnaturalizado que se quiere marcar, y la síntesis posterior de la cadena complementaria de ADN a partir de los extremos 3'OH de los iniciadores gracias a la actuación de una enzima *Klenow*. Si la mezcla de reacción contiene dNTPs y DIG-11-dUTP en una proporción adecuada la enzima incorporará residuos marcados con

digoxigenina (aproximadamente 1 de cada 20) a la cadena de nueva síntesis.

Para el marcado se procedió como se indica:

1) Se mezclaron 300 ng del ADN [IS6110 RHS, IS1081, *mtp* 40, Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL)-*Pvu*II o PhiX174-*Hae*III (GIBCO BRL)] a marcar con agua ultrapura estéril en un volumen total de 16 μ l.

2) Seguidamente se desnaturalizó el ADN diana mediante tratamiento térmico (100°C 10 minutos en baño de agua) y enfriamiento rápido hasta 4°C.

3) Se añaden 4 μ l de la mezcla **DIG-High Prime labeling mixture 5x** [160 μ l de la mezcla de iniciadores, 1 U/ μ l de la enzima Klenow, dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, 0,65 mM dTTP, DIG-11-dUTP alkali-labile 0,35 mM y tampón de reacción estabilizado 5x en glicerol al 50 % (volumen/volumen)], se mezcla cuidadosamente y se incuba a 37°C durante 20 horas.

4) Se para la reacción añadiendo 2 μ l de EDTA 0,2 M pH 8 y calentando el tubo a 65°C durante 10 minutos.

En cada lote de reacciones de marcado se incluía un tubo de reacción con un oligo control no marcado del *kit*

A continuación se procedía a estimar el rendimiento de la reacción de marcado como se expone:

1) Se hace 1 dilución 1:20 y 5 diluciones seriadas 1:10 a partir de ella (de la 1:200 a la 1:2.000.000) en tampón para diluir ADN (50 μ g/ml ADN de esperma de salmón en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) de los ADN (sondas y ADN control sin marcar) que hemos marcado y del ADN control marcado con DIG-11-dUTP incluido en el kit.

2) Se marca una cuadrícula con un lápiz en una membrana de nylon cargada positivamente y se rotulan las filas con el código de los ADN y las columnas con el de las diluciones. Seguidamente, para cada ADN, se coloca 1 μ l de cada dilución en su cuadrícula correspondiente. Los ADN se fijan a la membrana mediante tratamiento térmico de 120°C durante 25 minutos.

A partir de aquí se procede siguiendo el mismo protocolo que se indicó para

estimar el rendimiento del marcado de las sondas oligonucleótidos.

Para IS6110 RHS, IS1081 y *mtp40* la concentración de sonda marcada que dio mejores resultados fue de 20 ng sonda/ml de fluido de hibridación. La sonda para los marcadores internos de peso molecular es una mezcla de las sondas Supercoiled DNA ladder (GIBCO BRL)-*PvuII* y PhiX174-*HaeIII* (GIBCO BRL) a una concentración de 20 y 15 ng/ml de fluido de hibridación respectivamente.

IV.2.4.8 Hibridación de las membranas.

Las membranas preparadas se enjuagan en SSC 2x (NaCl 0,3 mol/l, citrato sódico 30 mM, pH 7), se enrollan con la cara que tiene el ADN hacia dentro, se introducen en los tubos de hibridación (HYBAID) precalentados a 65°C (en un mismo tubo pueden hibridarse 2 membranas con la misma sonda) y se desenrollan cuidando que no queden burbujas de aire entre la pared del tubo y la superficie de las membranas.

Para cada 2 membranas de 20x15 cm² se añaden 20 ml de fluido de hibridación [SSC 5x, N-laurilsarcosina al 0,1 %, dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,02 % y Blocking Reagent (Boehringer Mannheim) al 1 %] precalentados a 65°C. En el caso de las sondas oligonucleótidos y con el objeto de prevenir hibridaciones inespecíficas entre las "colas" de los oligos y secuencias complementarias en el ADN diana, al fluido de prehibridación se le debe añadir poly (A) (Boehringer Mannheim) y poly (dA) (Boehringer Mannheim) a concentraciones de 0,1 mg/ml y 5 µg/ml de fluido de hibridación respectivamente. Para todas las sondas la prehibridación se mantenía durante un tiempo mínimo de 4 horas a 65°C en un horno de hibridación giratorio (HYBAID).

Transcurrido el tiempo de prehibridación se retira el fluido de los tubos y se añaden 20 ml de fluido de hibridación nuevo precalentado a 65°C con la sonda correspondiente a la concentración adecuada (como se indicó previamente). Las sondas de ADN de cadena doble antes de añadirse al fluido de hibridación deben desnaturalizarse mediante tratamiento térmico (100°C 10 minutos en baño de agua)

y enfriamiento rápido hasta 4°C. Para las sondas oligonucleótidos es necesario añadir poly(A) y poly(dA) a las mismas concentraciones utilizadas en la prehibridación. Para todas las sondas la hibridación se mantenía un mínimo de 16 horas a 65°C en un horno de hibridación giratorio (HYBAID). Una vez terminada la hibridación el fluido que contiene la sonda se guardaba congelado a -20°C y reutilizaba en experimentos posteriores hasta que la intensidad de la señal obtenida disminuía.

Después de hibridarse, las membranas se sometían a 2 lavados de 5 minutos cada uno en **solución de lavado 2x** (SSC 2x, SDS 0,1 %) a temperatura ambiente, y a otros 2 lavados de 15 minutos cada uno en **solución de lavado 0,1x** (SSC 0,1x, SDS 0,1 %) a 65°C. Los lavados se realizaban en bandejas de plástico, el volumen utilizado era de 75 ml de solución por cada membrana de 20x15 cm² y se mantenían en agitación en un agitador (*Rocking platform*, Pharmacia). El objeto de estos lavados era eliminar el exceso de sonda que no se había unido y que de otro modo originaría ruido de fondo en la detección.

La secuencia que se siguió para la hibridación de las membranas fue la siguiente:

* **Membrana A:** procede de la transferencia del Gel A (gel *PvuII*) y se hibridaba con las siguientes sondas en el orden que se indica:

- IS6110 RHS
- Sonda para los marcadores internos
- IS6110 LHS
- IS1081
- *mtp40*

* **Membrana B:** procede del Gel B (gel *AluI* 1 % de agarosa) y se hibridaba con las siguientes sondas en el orden que se indica:

- PGRS
- Sonda para los marcadores internos

* **Membrana C:** procede del Gel C (gel *AluI* 1,5 % de agarosa) y se hibridaba con las siguientes sondas en el orden que se indica:

- DR
- Sonda para los marcadores internos

Una membrana hibridada y detectada con una sonda, puede deshibridarse y quedar preparada para una nueva hibridación, para ello se sigue el siguiente protocolo (los lavados se hacían en bandeja de plástico y en agitación):

- 1) Realizar 2 lavados de 5 minutos cada uno con agua MQ estéril.
- 2) Realizar 2 lavados de 20 minutos cada uno en *Stripping solution* (NaOH 0,2 M, SDS 0,1 %) a 37°C.
- 3) Enjuagar la membrana en SSC 2x y guardar sellada en bolsa de plástico a 4°C hasta su utilización.

IV.2.4.9 Detección de la sonda hibridada.

La presencia de las sondas marcadas con digoxigenina se detectó mediante el **alkaline phosphatase conjugated antibody DNA detection kit** (Boehringer Mannheim) siguiendo el protocolo que se indica a continuación (todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, en bandejas de plástico y en agitación, los volúmenes indicados son por membrana de 20x15 cm²):

- 1) Equilibrar la membrana en 75 ml de **Tampón 1** durante 1 minuto.
- 2) Bloquear la membrana con 75 ml de **Tampón 2** durante 1 hora.
- 3) Preparar una dilución 1:10.000 del **Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments** (Boehringer Mannheim) (75 mU/ml) en **Tampón 2** e incubar la membrana con 25 ml de esta dilución durante 30 minutos.
- 4) Someter la membrana a 2 lavados de 15 minutos cada uno con 75 ml de **Tampón 1 con Tween20 al 0,3 %**, para eliminar el exceso de anticuerpo.
- 5) Equilibrar la membrana con 75 ml de **Tampón 3** durante 2 minutos
- 6) Se prepara una solución del sustrato para la detección por quimioluminiscencia de la fosfatasa alcalina mezclando 5 ml de **Tampón 3** con 50 μ l

del sustrato Fenil fosfato de disodio 3-(4-metoxispiro[1,2-dioxetato-3,2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decano}-4-yl) o **CSPD** (Boehringer Mannheim) y la membrana se incubaba con ella durante 5 minutos procurando el máximo contacto con el sustrato.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, y sin permitir que la membrana se seque, ésta se sella en una bolsa de plástico procurando que no queden burbujas de aire y se incubaba durante 20 minutos a 37°C para que la reacción enzima/sustrato alcance la fase de estado. La emisión de señal continúa hasta 2 días después de la incubación con el sustrato.

Para detección de la señal de quimioluminiscencia, la membrana se exponía a una película para radiografías (Hyperfilm-ECL, Amersham) durante períodos de tiempo comprendidos entre 2 y 120 minutos, dependiendo de la sonda utilizada. La película radiográfica se procesó utilizando revelador y fijador Kodak.

Una vez conseguida la imagen, la membrana se deshibridaba con el protocolo indicado con anterioridad quedando lista para sucesivas hibridaciones.

IV.2.4.10 Análisis de las imágenes

Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa **GelCompar Versión 3.1** (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) para análisis comparativo de patrones de electroforesis. Las imágenes fueron escaneadas y convertidas por el programa (*Conversion program*, GCCONV). Cada autoradiograma fue normalizado (*Normalization program*, GCNORM) mediante la superposición de los patrones de tamaño molecular, lo cual permite la comparación (*Main program*, GCMAIN) de los patrones obtenidos para muestras pertenecientes a geles diferentes.

Para la normalización de las imágenes IS6110 RHS se utilizaron como referencia 13 de los marcadores de peso molecular que son:

14.174, 12.138, 10.098, 8.066, 7.048, 6.030, 5.012, 3.990, 2.972, 1.250, 1.078, 872 y 603 pb.

Para la normalización de las imágenes DR se utilizaron como referencia los

siguientes 6 marcadores de peso molecular:

2.972, 2.067, 1.250, 1.078, 872 y 603 pb.

Para la normalización de las imágenes PGRS se utilizaron como referencia los siguientes marcadores de peso molecular:

7.048, 6.030, 5.012, 3.990, 2.972 y 1.250 pb.

Las imágenes *IS6110 LHS*, *IS1081* y *mtp40* se compararon visualmente.

Para el análisis general de los resultados se utilizaron las siguientes especificaciones:

*** IS6110 RHS**

Para el establecimiento de grupos de cepas basados en los patrones de bandas se utilizó el coeficiente de *Jaccard* (S_j): este coeficiente se calcula basándose en el número y las posiciones de las bandas, de manera que para cada pareja de calles se el número de bandas en común entre ambas calles se divide entre el número total de bandas en las dos calles.

$$S_j = N_{ab} / (N_a + N_b - N_{ab})$$

N_{ab} , número de bandas comunes en las calles a y b.

N_a , número total de bandas en la calle a.

N_b , número total de bandas en la calle b.

El porcentaje de **tolerancia** utilizado para el análisis fue de **1,2 %**. La tolerancia es el parámetro que mide la diferencia de tamaño que debe existir entre 2 bandas de calles distintas para que sean consideradas como diferentes (una tolerancia de un 1% de una escala de 500 puntos significa que si la diferencia entre 2 bandas es menor de 5 puntos se considera que ambas tienen el mismo tamaño).

No se utilizó la opción de **optimización** (es independiente del grado de tolerancia y se encarga de alinear de una manera más perfecta las bandas que están ligeramente desviadas en altura entre diferentes calles).

*** DR**

Las condiciones utilizadas fueron: coeficiente de *Jaccard* (S_j), tolerancia del 1%

y con optimización.

*** PGRS**

Las condiciones utilizadas fueron: coeficiente de *Jaccard* (S_j), tolerancia del 1% y sin optimización.

La visualización de los grupos se hizo mediante 2 sistemas:

1) Dendrogramas

utilizando el algoritmo de **UPGMA**. Con este método la posición de la rama que une a dos unidades taxonómicas operacionales (OTUs) es la que determina el nivel de correlación entre las OTUs. Las ramas se dibujan en líneas perpendiculares.

2) Árboles

utilizando el método **NJ** (*Neighbour Joining method*). Con este método, la correlación entre 2 OTUs se halla sumando la longitud total (en la dirección horizontal) de todas las ramas que han de seguirse para llegar desde una a otra OTU. Las ramas se dibujan en líneas curvas.

IV.3 RESULTADOS

IV.3.1 Caracterización del ADN de cepas de *M. bovis* con IS6110 (RHS y LHS).

Se llevó a cabo la tipificación del ADN por RFLP con las sondas marcadas IS6110 RHS y LHS en 148 cepas de *M. bovis*. Las cepas procedían de ganado bovino (97), caprino (30) y ovino (1), gato doméstico (1), jabalíes (4) y humanos (15).

Se encontraron 29 tipos distintos de patrones de RFLP generados con IS6110, y el número de copias de este elemento varió entre 1 y 12. Ochenta y nueve (60,2 %) de las cepas estudiadas mostraron múltiples copias de IS6110 y 59 (39,8 %) tuvieron una sola copia del elemento. Cincuenta y cuatro (tipo 1A) de las 59 cepas unicopia mostraron el elemento IS6110 en un fragmento de restricción por *PvuII* de 1.9-kb (se trata del mismo fragmento en el que la cepa de referencia *M. bovis* BCG 3 lleva esta secuencia). La hibridación con la sonda IS6110 LHS en las cepas del tipo 1A demostró un mayor polimorfismo entre las mismas y permitió la separación de estos aislados en 4 subgrupos más (tipos 1Aa, b, c y d).

Veintidós de los 29 patrones de RFLP con IS6110 se encontraron específicamente en cepas aisladas de granjas determinadas y no se repitieron en ninguna otra propiedad incluida en el estudio.

Cepas de ganado bovino. Las 97 cepas bovinas de *M. bovis* procedían de 5 regiones españolas diferentes. Para cada granja, y entre las cepas aisladas a partir de reactores bovinos durante el transcurso de una prueba de campo para la evaluación de la prueba de gamma-interferón (Domingo et al., 1995), se eligió al azar un número representativo de cepas.

Mediante la hibridación del ADN de todas las cepas con la sonda IS6110 RHS y la posterior hibridación con el oligonucleótido IS6110 sólo en las cepas del tipo 1A, se encontraron 23 patrones de RFLP diferentes (Tabla 2). Independientemente del origen geográfico de las cepas, se encontraron aislados (43 de 97) con múltiples copias (de 2 a 12) de la secuencia IS6110, las restantes 54 cepas (55.7%) pertenecieron al

grupo de los unicopia (tipos 1Aa, b, c y d, 1B, 1C y 1D). En la mayoría (49 de 54) de las cepas unicopia la secuencia de inserción se presentaba en el fragmento de restricción por *PvuII* de 1.9-kb (tipo 1A).

En cepas procedentes de varias granjas se encontraron tipos particulares de RFLP no repetidos en ningún otro rebaño estudiado, estos tipos fueron:

tipo 1B (granja b-23), 1C (granja b-3), 1D y 4B (granja b-11),
2B (granja b-24), 2A, 3A, 3B y 3C (granja b-22), 4A y 5D (granja b-21),
5B (granja b-1), 5C (granja b-14), 6D (granja b-27), 7A (granja b-2),
7B (granja b-15), 11A (granja b-12) y tipo 12A (granja b-4).

El tipo de RFLP que se repitió con más frecuencia (tipo 1Aa) fue encontrado en 32 cepas distribuidas por granjas como se expone a continuación: granja b-7 (2 cepas), b-8 (1), b-12 (1), b-13 (3), b-17 (1), b-20 (1), b-22 (1), b-23 (1), b-24 (19), b-25 (1) y granja b-26 (9 cepas).

El tipo 1Ab apareció en las granjas b-6 (1 cepa), b-9 (4), b-11 (1), b-13 (1), b-18 (1) y granja b-19 (1 cepa).

Por último, el tipo 1Ac se dió en las granjas b-5 (2 cepas) y b-10 (3 cepas), y el tipo 1Ad en las granjas b-16 (3 cepas) y b-25 (1 cepa).

TABLA 2. Distribución de cepas en las granjas bovinas y tipos de RFLP con IS6110 RHS y LHS^a

Rebaño (Área)	Nº de cepas	tipo ^b de RFLP	
		IS6110 RHS	IS6110 LHS
b-1 (Castilla y León)	1	5B ^c	-
b-2 (Castilla y León)	12	7A	-
b-3 (Castilla y León)	1	1C	-
b-4 (Castilla y León)	3	12A	-
b-5 (Castilla y León)	2	1A	1Ac
b-6 (Castilla y León)	1	1A	1Ab
b-7 (Castilla y León)	2	1A	1Aa
b-8 (Castilla y León)	1	1A	1Aa
b-9 (Castilla y León)	4	1A	1Ab
b-10 (Castilla y León)	3	1A	1Ac
b-11 (Castilla y León)	1	1D	-
	1	4B	-
	1	1A	1Ab
b-12 (Castilla y León)	1	11A	-
	1	1A	1Aa
b-13 (Castilla y León)	3	1A	1Aa
	1	1A	1Ab
b-14 (Cataluña)	1	5C	-
b-15 (Cataluña)	1	7B	-
b-16 (Cataluña)	3	1A	1Ad
b-17 (Cataluña)	1	1A	1Aa
b-18 (Cataluña)	1	1A	1Ab
b-19 (Cataluña)	1	1A	1Ab
b-20 (Cataluña)	1	1A	1Aa
b-21 (Cataluña)	1	4A	-
	1	5D	-
b-22 (Cataluña)	14	2A	-
	3	3A	-
	1	3B	-
	1	3C	-
	1	1A	1Aa
b-23 (Cataluña)	3	1B	-
	1	1A	1Aa
b-24 (Cataluña)	1	2B	-
	19	1A	1Aa
b-25 (Cantabria)	1	1A	1Ad
b-26 (Guadalajara)	1	1A	1Aa
b-27 (Madrid)	1	6D	-

^aLa hibridación con IS6110 LHS se realizó sólo en las cepas del tipo 1A.

^bEl número de tipo en el RFLP representa el número de copias de la secuencia IS6110 en un aislado.

^cLos tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

Cepas aisladas de cabras y ovejas. Las cepas caprinas fueron aisladas en 2 regiones españolas (Cataluña y Madrid). En cada uno de los rebaños se sometieron a examen por RFLP todas las cepas aisladas a partir de animales positivos a la prueba de liberación de gamma interferón.

En las 30 cepas de origen caprino y en la cepa ovina incluidas en el estudio se encontraron entre 5 y 8 copias de IS6110, y se distinguieron 5 tipos diferentes de RFLP con IS6110 RHS (Tabla 3). Los tipos 5A y 8A fueron específicos de las granjas c-5 y c-4 respectivamente; el tipo 6A se encontró en las granjas c-6 y o-1; el tipo 6B apareció en las granjas c-1, c-2 y c-3; y por último el tipo 6C fue encontrado en las granjas c-7 y c-8.

En estos aislados todos los patrones de RFLP mostraron 4 bandas en común cuyos tamaños moleculares fueron de: 2, 1.7, 1.4 y 1.3 kb. Cuando se llevó a cabo el análisis por ordenador de estas cepas conjuntamente con las cepas bovinas, humanas, felinas y de jabalíes, se observó que las cepas caprinas forman un conjunto homogéneo y perfectamente separado del formado por el resto de las cepas.

TABLA 3. Distribución de cepas en los rebaños caprinos y ovino y tipos de RFLP con IS6110 RHS.

Granja (Área)	Nº de cepas	Tipo ^a de RFLP
c-1 (Cataluña)	6	6B
c-2 (Cataluña)	12	6B
c-3 (Cataluña)	1	6B
c-4 (Cataluña)	2	8A^b
c-5 (Cataluña)	2	5A
c-6 (Cataluña)	1	6A
c-7 (Madrid)	5	6C
c-8 (Madrid)	1	6C
o-1 (Cataluña)	1	6A

^aEl número de tipo en el RFLP representa el número de copias de la secuencia IS6110 en un aislado.

^bLos tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

Cepas de *M. bovis* aisladas de humanos. Se trata de 15 cepas aisladas de un brote de multiresistencia aparecido en Madrid. Mediante RFLP con IS6110 RHS se demostró la existencia de 2 tipos diferentes de cepas, tipos 2C (13 cepas) y 3D (2 cepas), estos patrones no aparecieron repetidos en ningún otro aislado estudiado.

Cepa felina. Esta cepa procede de un caso clínico de tuberculosis en un gato doméstico de la ciudad de Madrid y tras su análisis por RFLP se vio que pertenecía al tipo común 1Aa.

Cepas aisladas de jabalíes. Estas 4 cepas proceden de animales del Parque Nacional de Doñana, todos ellos fueron unicopia y mostraron el mismo tipo de RFLP 1Ab.

La **Figura 2a** muestra un autoradiograma de una típica hibridación con la sonda IS6110 RHS. Como se observa la superposición de los patrones de peso molecular permite calcular el tamaño exacto de cada una de las bandas. La **Figura 2b** es un dendograma obtenido tras el análisis de la imagen anterior con el programa GELCOMPAR. En la **Figura 6** se muestra un dendograma general con todos los tipos de RFLP generados mediante la sonda IS6110 RHS, para el conjunto de las cepas de *M. bovis* descritas. En ambos dendogramas la escala superior indica el porcentaje de semejanza entre unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

IV.3.2 Caracterización del ADN de cepas de *M. bovis* con la sonda para la secuencia DR.

La tipificación del ADN por RFLP con la sonda marcada para el elemento repetitivo DR se realizó en 143 cepas de *M. bovis*. Las cepas procedían de ganado bovino (93), caprino (30) y ovino (1), gato doméstico (1), jabalíes (3) y humanos (15).

Se encontraron 18 tipos distintos de patrones de RFLP generados con DR. Para el análisis no se tuvieron en cuenta las bandas de bajo peso molecular (menores de 550 pb) debido a que la resolución de estas bandas no era muy clara y resultaban similares en todos los aislados, sólo se hizo una excepción en el caso de las cepas caprinas que se caracterizaban por ausencia de bandas de elevado peso molecular (mayores de 603 pb) y presencia de bandas **nítidas** de bajo tamaño molecular.

Ocho de los 18 patrones de RFLP obtenidos con DR, se encontraron específicamente en cepas aisladas de granjas determinadas, y no se repitieron en ninguna otra propiedad o cepa procedente de otra especie animal incluida en el estudio. El resto de los patrones aparecieron repetidos en 2 o más granjas.

Cepas de ganado bovino. Las 93 cepas bovinas de *M. bovis* fueron las mismas sometidas al estudio con IS6110 salvo 4 muestras (1 de la granja b-20, y 3 de la granja b-23) de las que no se pudieron obtener resultados satisfactorios. Mediante la hibridación del ADN de todas las cepas con la sonda DR se encontraron 13 patrones de RFLP diferentes (**Tabla 4**).

En cepas procedentes de varias granjas se encontraron tipos particulares de RFLP no repetidos en ningún otro rebaño estudiado, estos tipos fueron: tipo DR-2 (granja b-1), DR-5 y DR-14 (granja b-11), DR-9 (granja b-25), DR-11 (granja b-9) y DR-13 (granja b-3).

El tipo de RFLP que se repitió con más frecuencia (tipo DR-3) fue encontrado en 36 cepas distribuidas en 11 granjas como se expone a continuación: granja b-4 (3 cepas), b-7 (2), b-8 (1), b-12 (1), b-13 (3), b-17 (1), b-18 (1), b-19 (1), b-21 (2), b-22 (1)

y granja b-24 (20 cepas).

Los restantes tipos (DR-1, DR-4, DR-7, DR-8, DR-10 y DR-12) se repitieron en varias granjas o en cepas procedentes de distintas especies animales como se indica en la Tabla 4.

TABLA 4. Distribución de cepas en las granjas bovinas y tipos de RFLP con DR

Rebaño (Área)	Nº de cepas	Tipo de RFLP
b-1 (Castilla y León)	1	DR-2'
b-2 (Castilla y León)	12	DR-4
b-3 (Castilla y León)	1	DR-13
b-4 (Castilla y León)	3	DR-3
b-5 (Castilla y León)	2	DR-8
b-6 (Castilla y León)	1	DR-1
b-7 (Castilla y León)	2	DR-3
b-8 (Castilla y León)	1	DR-3
b-9 (Castilla y León)	2	DR-1
	1	DR-7
	1	DR-11
b-10 (Castilla y León)	3	DR-8
b-11 (Castilla y León)	1	DR-1
	1	DR-5
	1	DR-14
b-12 (Castilla y León)	1	DR-3
	1	DR-4
b-13 (Castilla y León)	1	DR-1
	3	DR-3
b-14 (Cataluña)	1	DR-10
b-15 (Cataluña)	1	DR-8
b-16 (Cataluña)	3	DR-8
b-17 (Cataluña)	1	DR-3
b-18 (Cataluña)	1	DR-3
b-19 (Cataluña)	1	DR-3
b-20 (Cataluña)	1	—
b-21 (Cataluña)	2	DR-3
b-22 (Cataluña)	18	DR-10
	1	DR-3
	1	DR-12
b-23 (Cataluña)	3	—
	1	DR-12
b-24 (Cataluña)	20	DR-3
b-25 (Cantabria)	1	DR-9
b-26 (Guadalajara)	1	DR-12
b-27 (Madrid)	1	DR-10

*Los tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

Cepas aisladas de cabras y ovejas. Las cepas caprinas estudiadas con DR fueron exactamente las mismas que fueron descritas para IS6110. Se distinguieron 4 tipos diferentes de RFLP con la sonda DR (Tabla 5). El tipo DR-15 se encontró en las granjas c-4, c-6 y o-1; el DR-16 apareció en las granjas c-1, c-2 y c-3; el tipo DR-17 fue encontrado en las granjas c-7 y c-8; y por último el tipo DR-18 fue específico de la granja c-5.

En estos aislados todos los patrones de RFLP mostraron en común la ausencia de bandas de elevado peso molecular (mayores de 603 pb) y presencia de bandas nítidas de bajo tamaño molecular. Cuando se llevó a cabo el análisis por ordenador de estas cepas conjuntamente con las cepas de otros orígenes animales, se observó que las cepas caprinas forman un conjunto homogéneo y perfectamente separado del formado por el resto.

TABLA 5. Distribución de cepas en los rebaños caprinos y ovino y tipos de RFLP con DR.

Granja (Área)	Nº de cepas	Tipo de RFLP
c-1 (Cataluña)	6	DR-16
c-2 (Cataluña)	12	DR-16
c-3 (Cataluña)	1	DR-16
c-4 (Cataluña)	2	DR-15
c-5 (Cataluña)	2	DR-18^a
c-6 (Cataluña)	1	DR-15
c-7 (Madrid)	5	DR-17
c-8 (Madrid)	1	DR-17
o-1 (Cataluña)	1	DR-15

^aLos tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

Cepas de *M. bovis* aisladas de humanos. Mediante RFLP con DR se demostró la existencia de 2 tipos diferentes de cepas, tipos DR-6 (2 cepas) y DR-8 (13 cepas), el patrón DR-6 no se repitió en ninguna otra cepa, sin embargo el patrón DR-8 es un patrón común presente en varias granjas bovinas.

Cepa felina. Tras su análisis por RFLP esta cepa se encuadró en el tipo común DR-1.

Cepas aisladas de jabalíes. Sólo se obtuvieron resultados en 3 de las 4 cepas y todas ellas mostraron el mismo tipo de RFLP (DR-7) sólo compartido con un animal de la granja b-9.

La **Figura 3a** muestra una típica hibridación con la sonda DR. Como se observa la superposición de los patrones de peso molecular permite calcular el tamaño exacto de cada una de las bandas. La **Figura 3b** es un dendograma obtenido tras el análisis de la imagen anterior con el programa GELCOMPAR. En la **Figura 7** se muestra un dendograma general con todos los tipos de RFLP generados mediante la sonda DR, para el conjunto de las cepas de *M. bovis* descritas. En ambos dendogramas la escala superior indica el porcentaje de semejanza entre unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

IV.3.3 Caracterización del ADN de cepas de *M. bovis* con la sonda para la secuencia PGRS.

La tipificación del ADN por RFLP con la sonda marcada para el elemento repetitivo PGRS se realizó en 144 cepas de *M. bovis*. Las cepas procedían de ganado bovino (94), caprino (30) y ovino (1), gato doméstico (1), jabalíes (3) y humanos (15).

Se encontraron 29 tipos distintos de patrones de RFLP generados con PGRS. Para el análisis no se tuvieron en cuenta las bandas de peso molecular menor de 2.400 pb, debido a la presencia de un enorme número de bandas de resolución no muy clara y que resultaban similares en todos los aislados no siendo de gran utilidad en la comparación. Diecinueve de los 29 patrones de RFLP obtenidos con PGRS se encontraron específicamente en cepas aisladas de granjas determinadas y no se repitieron en ninguna otra propiedad o cepa procedente de otra especie animal incluida en el estudio. El resto de los patrones fueron compartidos entre 2 o más granjas, especies animales o brotes de enfermedad (brote en personas).

Cepas de ganado bovino. Las 94 cepas bovinas de *M. bovis* fueron las mismas sometidas al estudio con IS6110 salvo 3 muestras (1 de la granja b-20, y 2 de la granja b-23) de las que no se pudieron obtener resultados satisfactorios. Mediante la hibridación del ADN de todas las cepas con la sonda PGRS se encontraron 24 patrones de RFLP diferentes (Tabla 6).

En cepas originarias de varias granjas se encontraron tipos particulares de RFLP no repetidos en ningún otro rebaño estudiado, estos tipos fueron:

tipo P-1 (granja b-5), p-2 (granja b-12), P-4 (granja b-11),
P-5 y P-6 (granja b-4), P-7 (granja b-10), P-10 (granja b-16),
p-12 (granja b-15), P-14 (granja b-3), P-15 (granja b-7),
P-16 (granja b-11), P-18 P-19 y P-20 (granja b-22), P-21 (granja b-2),
P-22 (granja b-1), P-23 (granja b-8) y tipo P-25 (granja b-12).

Los tipos de RFLP que se repitieron con más frecuencia fueron:

Tipo P-9, encontrado en 23 cepas distribuidas en 4 granjas como se expone a continuación: granja b-19 (1 cepa), b-21 (1), b-23 (1) y granja b-24 (20 cepas).

Tipo P-13b, encontrado en 20 cepas distintas distribuidas en 4 granjas como se indica: granja b-14 (1 cepa), b-22 (17), b-26 (1) y granja b-27 (1 cepa).

Los restantes tipos (P-3, P-13a, P-17 y P-24) se repitieron en varias granjas como se indica en la Tabla 6.

TABLA 6. Distribución de cepas en las granjas bovinas y tipos de RFLP con PGRS

Rebaño (Área)	Nº de cepas	Tipo de RFLP
b-1 (Castilla y León)	1	P-22*
b-2 (Castilla y León)	12	P-21
b-3 (Castilla y León)	1	P-14
b-4 (Castilla y León)	2	P-5
	1	P-6
b-5 (Castilla y León)	2	P-1
b-6 (Castilla y León)	1	P-24
b-7 (Castilla y León)	2	P-15
b-8 (Castilla y León)	1	P-23
b-9 (Castilla y León)	3	P-24
	1	P-13a
b-10 (Castilla y León)	3	P-7
b-11 (Castilla y León)	1	P-4
	1	P-16
	1	P-24
b-12 (Castilla y León)	1	P-2
	1	P-25
b-13 (Castilla y León)	3	P-3
	1	P-17
b-14 (Cataluña)	1	P-13b
b-15 (Cataluña)	1	P-12
b-16 (Cataluña)	3	P-10
b-17 (Cataluña)	1	P-3
b-18 (Cataluña)	1	P-13a
b-19 (Cataluña)	1	P-9
b-20 (Cataluña)	1	---
b-21 (Cataluña)	1	P-9
	1	P-13a
b-22 (Cataluña)	17	P-13b
	1	P-18
	1	P-19
	1	P-20
b-23 (Cataluña)	1	P-9
	1	P-17
	2	---
b-24 (Cataluña)	20	P-9
b-25 (Cantabria)	1	P-3
b-26 (Guadalajara)	1	P-13b
b-27 (Madrid)	1	P-13b

*Los tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

Cepas aisladas de cabras y ovejas. Las cepas caprinas estudiadas con PGRS fueron exactamente las mismas descritas para IS6110. Se distinguieron 3 tipos diferentes de RFLP con la sonda PGRS (Tabla 7). El tipo P-26 se encontró en las granjas c-1, c-2 y c-3; el P27 apareció en las granjas c-5, c-7 y c-8; y por último el tipo P-28 fue encontrado en las granjas c-4, c-6 y o-1.

En estos aislados todos los patrones de RFLP mostraron un alto grado de homogeneidad y tras su análisis por ordenador en conjunto con las cepas de otros orígenes animales, se observó que las cepas caprinas forman un conjunto homogéneo y perfectamente separado del formado por el resto.

TABLA 7. Distribución de cepas en los rebaños caprinos y ovino y tipos de RFLP con PGRS.

Granja (Área)	Nº de cepas	Tipo de RFLP
c-1 (Cataluña)	6	P-26
c-2 (Cataluña)	12	P-26
c-3 (Cataluña)	1	P-26
c-4 (Cataluña)	2	P-28
c-5 (Cataluña)	2	P-27
c-6 (Cataluña)	1	P-28
c-7 (Madrid)	5	P-27
c-8 (Madrid)	1	P-27
o-1 (Cataluña)	1	P-28

Cepas de *M. bovis* aislados de humanos. Al realizar el RFLP con PGRS en las 15 cepas de origen humano, se encontró que todas ellas compartían un tipo común, el patrón P-8, que no se repitió en ninguna otra cepa estudiada.

Cepa felina. Tras su análisis por RFLP se demostró que esta cepa pertenece a un tipo específico (P-11).

Cepas aisladas de jabalíes. Sólo se obtuvieron resultados en 3 de las 4 cepas y todas ellas mostraron el mismo tipo de RFLP (P-13a), compartido con animales de varias granjas.

La **Figura 4a** muestra una típica hibridación con la sonda DR. Como se observa la superposición de los patrones de peso molecular permite calcular el tamaño exacto de cada una de las bandas. La **Figura 4b** es un dendograma obtenido tras el análisis de la imagen anterior con el programa GELCOMPAR. En la **Figura 8** se muestra un dendograma general con todos los tipos de RFLP generados mediante la sonda PGRS, para el conjunto de las cepas de *M. bovis* descritas. En ambos dendogramas la escala superior indica el porcentaje de semejanza entre unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

IV.3.4 Caracterización del ADN de cepas de *M. bovis* con el uso de las sondas para IS1081 y para *mtp40*.

La hibridación de los ADNs de todas las cepas de *M. bovis* con la sonda para IS1081 reveló la existencia de 1 tipo mayoritario con 6 copias de la secuencia (tipo 6A). Sólo mostraron un patrón diferente las 3 cepas de la granja b-10 (tipo 6B). La **Figura 5** muestra una típica hibridación con la sonda IS1081.

Todos los ADN de las cepas estudiadas se hibridaron con el elemento *mtp40* y no se encontró esta secuencia en ninguna de ellas.

IV.3.5 Caracterización del ADN de cepas de *M. bovis* con el uso conjunto de las sondas para las secuencias IS6110, DR y PGRS.

La utilización conjunta de los tres marcadores genéticos permitió la diferenciación de **47 tipos distintos** de RFLP en las **148 cepas** de *M. bovis* incluidas en el estudio. Ninguno de los marcadores utilizados consiguió detectar todos los polimorfismos existentes en las cepas. Todos los patrones obtenidos fueron específicos de granjas determinadas excepto:

- * IS1Ab / DR-1 / P-24: apareció en la granjas b-6 (1 cepa), b-9 (2 cepas) y b-11 (1 cepa).
- * IS1Ab / DR-7 / P-13a: apareció en la granja b-9 (1 cepa) y en las cepas de jabalíes.
- * IS1Aa / DR-3 / P-3: apareció en la granja b-13 (3 cepas) y en la b-17 (1 cepa).
- * IS6B / DR-16 / P-26: apareció en las granjas c-1 (6 cepas), c-2 (12 cepas) y c-3 (1 cepa).
- * IS6A / DR-15 / P-28: apareció en las granjas c-6 (1 cepa) y o-1 (1 cepa).
- * IS6C / DR-17 / P-27: apareció en las granjas c-7 (5 cepas) y c-8 (1 cepa).

En la **Tabla 8** se muestra un resumen de los distintos tipos de RFLP obtenidos con el uso combinado de IS6110 (RHS y LHS), DR y PGRS, así como su distribución en las distintas granjas.

Tabla 8. Tipos de RFLP con IS6110, DR y PGRS

Origen	Nº de cepas	Tipo de RFLP
b-1 (Castilla y León)	1	IS5B ^a / DR-2 / P-22
b-2 (")	12	IS7A / DR-4 / P-21
b-3 (")	1	IS1C / DR-13 / P-14
b-4 (")	2 1	IS12A / DR-3 / P-5 IS12A / DR-3 / P-6
b-5 (")	2	IS1Ac / DR-8 / P-1
b-6 (")	1	IS1Ab / DR-1 / P-24
b-7 (")	2	IS1Aa / DR-3 / P-15
b-8 (")	1	IS1Aa / DR-3 / P-23
b-9 (")	1 2 1	IS1Ab / DR-11 / P-24 IS1Ab / DR-1 / P-24 IS1Ab / DR-7 / P-13a
b-10 (")	3	IS1Ac / DR-8 / P-7
b-11 (")	1 1 1	IS1D / DR-5 / P-4 IS4B / DR-14 / P-16 IS1Ab / DR-1 / P-24
b-12 (")	1 1	IS11A / DR-4 / P-2 IS1Aa / DR-3 / P-25
b-13 (")	3 1	IS1Aa / DR-3 / P-3 IS1Ab / DR-1 / P-17
b-14 (Cataluña)	1	IS5C / DR-10 / P-13b
b-15 (")	1	IS7B / DR-8 / P-12
b-16 (")	3	IS1Ad / DR-8 / P-10
b-17 (")	1	IS1Aa / DR-3 / P-3
b-18 (")	1	IS1Ab / DR-3 / P-13a
b-19 (")	1	IS1Ab / DR-3 / P-9
b-20 (")	1	IS1Aa / --- / ---
b-21 (")	1 1	IS4A / DR-3 / P-13a IS5D / DR-3 / P-9

b-22 (Cataluña)	1	IS3B / DR-10 / P-13b
	1	IS3C / DR-12 / P-13b
	1	IS2A / DR-10 / P-18
	1	IS2A / DR-10 / P-19
	1	IS1Aa / DR-3 / P-20
	3	IS3A / DR-10 / P-13b
b-23 (")	12	IS2B / DR-10 / P-13b
	1	IS1Aa / DR-12 / P-17
	1	IS1B / --- / P-9
b-24 (")	2	IS1B / --- / ---
	1	IS2B / DR-3 / P-9
b-25 (Cantabria)	19	IS1Aa / DR-3 / P-9
	1	IS1Ad / DR-9 / P-3
b-26 (Guadalajara)	1	IS1Aa / DR-12 / P-13b
b-27 (Madrid)	1	IS6D / DR-10 / P-13b
c-1 (Cataluña)	6	IS6B / DR-16 / P-26
c-2 (")	12	IS6B / DR-16 / P-26
c-3 (")	1	IS6B / DR-16 / P-26
c-4 (")	2	IS8A / DR-15 / P-28
c-5 (")	1	IS5A / DR-18 / P-27
c-6 (")	1	IS6A / DR-15 / P-28
c-7 (Madrid)	5	IS6C / DR-17 / P-27
c-8 (Madrid)	1	IS6C / DR-17 / P-27
o-1 (Cataluña)	1	IS6A / DR-15 / P-28
Gato (Madrid)	1	IS1Aa / DR-1 / P-11
Jabalíes (Doñana)	1	IS1Ab / --- / ---
	3	IS1Ab / DR-7 / P-13a
Ramón y Cajal	2	IS3D / DR-6 / P-8
	13	IS2C / DR-8 / P-8

*Los tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

IV.4 DISCUSIÓN

La tuberculosis en el ganado bovino y caprino español es aún una enfermedad importante. Hasta el momento nunca se había llevado a cabo ningún estudio con un número de cepas elevado en nuestro país, y por ello la información disponible sobre la presencia de los diferentes marcadores genéticos en las cepas españolas de *M. bovis* era muy limitada. En este estudio se han examinado 148 cepas mediante RFLP con sondas para los marcadores IS6110, DR, PGRS, IS1081 y *mtp40*.

La secuencia de inserción IS6110 está siendo actualmente utilizada en laboratorios de todo el mundo para estudios de tipificación de aislados de *M. tuberculosis* (Otal et al., 1991; Das et al., 1993; Van Embdem et al., 1993). Varios trabajos (Hermans et al., 1991; Cousins et al., 1993b; Collins et al., 1993; Van Soolingen et al., 1994; Skuce et al., 1994) han comunicado que la presencia de una sola copia de IS6110, normalmente en la región preferente de integración encontrada en el cromosoma de *M. bovis* BCG (Hermans et al., 1991), es una característica típica de las cepas de *M. bovis* aisladas de ganado bovino. Sin embargo recientemente ha sido descrita la existencia de cepas de *M. bovis* con **múltiples copias** de la secuencia IS6110 y estas cepas procedían de animales salvajes, animales de zoo y cabras (Cousins et al., 1993a ; Van Soolingen et al., 1994; Gutiérrez et al., 1995). Un estudio preliminar realizado recientemente en 17 cepas bovinas españolas confirmó la teoría extendida de la especificidad de las cepas unicopia para el ganado bovino (Gutiérrez et al., 1995). Sin embargo, sorprendentemente, en nuestro estudio encontramos que 43 de la 97 cepas bovinas investigadas contenían varias copias de IS6110. La mayoría de las cepas provenían de rebaños sin relación epidemiológica conocida, lo cual concuerda con el elevado número de patrones de RFLP (23) encontrados en estos aislados. La granjas investigadas estaban situadas en 5 áreas diferentes (Castilla-León, Cataluña, Santander, Guadalajara y Madrid) y las cepas multicopia no se han limitado a una región determinada sino que han aparecido en todas las áreas estudiadas.

En 5 de las 54 cepas **unicopia** para IS6110, la secuencia se encontró en un

fragmento específico diferente del lugar típico de integración (tipos IS1b, IS1C e IS1D), estos patrones aparecieron específicamente en 3 granjas determinadas (b-3, b-11 y b-23). Diecinueve de las 49 cepas unicopia restantes (tipo IS1A) fueron aisladas a partir de los animales de la granja b-24, esta granja sufrió un brote agudo de tuberculosis y el origen de la infección es desconocido. Si descontamos estos animales sólo 30 de las 97 cepas bovinas de este estudio son unicopia.

En nuestro estudio se muestra que un elevado porcentaje de las cepas bovinas españolas presentan varias copias de IS6110 y que la realización de un RFLP con este elemento es un método útil y fiable para la caracterización de las mismas. La hibridación con la sonda IS6110 LHS en las cepas del tipo IS1A permitió una separación de los aislados en 4 grupos más. Este resultado indica que, en estas cepas, la sonda para el fragmento situado al lado izquierdo del sitio *PvuII* es fuente de un mayor polimorfismo, lo que está de acuerdo con las observaciones de Collins et al. en 1993. Sin embargo, con el objeto de conseguir una mayor discriminación entre cepas sería necesario la hibridación de estos aislados con sondas para los elementos DR y PGRS.

Es posible que si se continúa investigando extensivamente en cepas de diferentes países se llegue a descubrir si esta situación ocurre sólo en España. La particularidades de los sistemas de explotación de nuestro país, con la existencia de rebaños de un bajo número de cabezas y una presencia importante de razas autóctonas puede haber contribuido a que se mantenga este grupo "particular" de cepas de *M. bovis* entre nuestra población bovina. Además España no es un país exportador de ganado y sin embargo, un número relativamente alto de animales selectos entran en nuestro país cada año, lo cual podría explicar la presencia de esos tipos "comunes" de cepas entre nuestras poblaciones.

Las 29 cepas caprinas y la cepa ovina investigadas contenían entre 5 y 8 copias de la secuencia IS6110 y ninguno de los patrones de RFLP de estas cepas se repitió en las cepas bovinas o de otras especies. Cuando los patrones de RFLP se analizaron junto a los de otros orígenes animales se vio que integraban un grupo completamente

diferenciado del resto (Figura 6). Las cepas de cabra y oveja procedieron de 2 regiones (Cataluña y Madrid) diferentes de las cepas investigadas por Gutiérrez et al. en 1995, pero sin embargo, los patrones obtenidos guardaron un alto grado de similitud con los publicados por estos autores. Este hecho apoya la teoría de que existe un grupo particular de cepas de *M. bovis* genéticamente similares y que son responsables de la tuberculosis caprina en nuestro país.

Las cepas procedentes de las granjas c-1, c-2 y c-3 mostraron el mismo tipo de RFLP (IS6B), estas granjas se encuentran situadas muy próximas entre sí en el mismo área (Comarca de Vallés Oriental) y la práctica de intercambiar animales entre ellas es corriente, por lo que es posible que la infección se haya extendido entre ellas originada por un mismo tipo de cepa. Las granjas c-6 y o-1 (ambas del tipo IS6A) se encuentran en la misma localidad y es muy probable que haya existido contacto entre los animales. En el caso de las granjas de la Comunidad de Madrid (c-7 y c-8), las dos compartieron el mismo tipo de RFLP (IS6C) y posteriormente hemos podido averiguar que la cabra de la granja c-8 fue comprada en la granja c-7. Por último, los tipos IS5A e IS8A fueron específicos de las granjas c-5 y c-4 respectivamente y no se conoce ninguna relación epidemiológica entre estas granjas y las anteriores.

La cepa felina y las cepas de jabalíes pertenecen al tipo común IS1A lo cual parece ser indicativo de transmisión a partir de ganado bovino.

Las cepas humanas mostraron patrones de RFLP específicos y parece ser que en el brote de multiresistencia estuvieron involucradas 2 cepas diferentes. Al no haberse encontrado un patrón similar, el origen de estos brotes es desconocido aunque en el dendograma general (Figura 6) puede observarse que las cepas son más próximas a los tipos bovinos que a los caprinos.

En resumen, hemos demostrado que las cepas de *M. bovis* responsables de la tuberculosis bovina y caprina en España pueden caracterizarse satisfactoriamente mediante RFLP con sondas para IS6110. Además mediante este método, las cepas de origen bovino pueden separarse claramente de aquellas de origen caprino.

Desafortunadamente no pudimos estudiar ningún rebaño mixto con población bovina y caprina y por ello la importancia de la transmisión entre ambas especies es aún desconocida. En la literatura existe una única evidencia molecular de transmisión desde el ganado bovino al caprino en condiciones naturales (Cousins et al., 1993) y en este caso las cepas bovina y caprina fueron idénticas con sólo una copia de IS6110. Es más que probable que ese tipo de transmisión exista en nuestro país y sería necesario determinar su importancia en el contexto de la tuberculosis bovina.

En la **Tabla 9** se resume la concordancia entre los tipos de RFLP obtenidos con las sondas IS6110 (RHS y LHS) y DR. Con las sondas para IS6110 se demostró la existencia de 29 tipos distintos, mientras que con la sonda DR sólo se diferenciaron 18. Sólo en 8 ocasiones se obtuvo el mismo grado de polimorfismo al utilizar IS6110 y DR, en el resto de los casos cada uno de los grupos establecidos con DR representaron varios grupos con IS6110. La excepción fueron las cepas pertenecientes a los tipos IS1Aa, b, c y d, en los que el uso de la sonda para DR permitió detectar un mayor polimorfismo entre cepas del detectado con IS6110 (**Tabla 10**).

Tabla 10. Diferenciación de los tipos IS1A mediante la sonda DR

Tipo de RFLP (IS6110)	Tipo de RFLP (DR)
IS1Aa	DR-1, DR-3, DR-12
IS1Ab	DR-1, DR-3, DR-7, DR-11 ^a
IS1Ac	DR-8
IS1Ad	DR-8, DR-9

^aLos tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

Tabla 9. Relación entre los tipos de RFLP con las sondas IS6110 y DR.

Tipo de RFLP (DR)	Tipo de RFLP (IS6110)
DR-1	IS1Aa, IS1Ab
<u>DR-2</u> ^{ab}	<u>IS5B</u>
DR-3	IS1Aa, IS1Ab, IS2B , IS4A, IS5D, IS12A
DR-4	IS7A, IS11A
<u>DR-5</u>	<u>IS1D</u>
<u>DR-6</u>	<u>IS3D</u>
DR-7	IS1Ab
DR-8	IS1Ac, IS1Ad, IS2C, IS7B
DR-9	IS1Ad
DR-10	IS2A, IS3A, IS3B, IS5C, IS6D
DR-11	IS1Ab
DR-12	IS1Aa, IS3C
<u>DR-13</u>	<u>IS1C</u>
<u>DR-14</u>	<u>IS4B</u>
DR-15	IS6A, IS8A
<u>DR-16</u>	<u>IS6B</u>
<u>DR-17</u>	<u>IS6C</u>
<u>DR-18</u>	<u>IS5A</u>

^aLos tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

^bLos tipos subrayados indican mismo grado de polimorfismo con las dos sondas.

La utilización de la sonda DR en los aislados de las granjas caprinas permitió una menor diferenciación de las cepas respecto a los grupos obtenidos con IS6110. Las propiedades c-1, c-2 y c-3 mostraron el mismo patrón de RFLP con DR (tipo DR-16), estos tres rebaños se encuentran muy próximos geográficamente e intercambian animales entre ellos lo cual explica que la infección esté producida en todos ellos por la misma cepa. Las cepas pertenecientes a las granjas c-4, c-6 y o-1 presentaron el mismo patrón DR (DR-15); las granjas c-6 y o-1 están muy próximas lo cual podría explicar esta coincidencia, sin embargo la granja c-4 no tiene ningún tipo de relación con las otras dos. El tipo DR-17 fue encontrado en las dos granjas de la Comunidad Autónoma de Madrid (c-7 y c-8) y como ya se ha comentado estas granjas tenían relación epidemiológica. Por último el tipo DR-17 sólo se encontró en la granja c-5, aparentemente sin relación con ninguna de las anteriores.

Cuando las cepas caprinas y ovina fueron analizadas en el conjunto del total de cepas estudiadas, se volvió a comprobar el hecho ya demostrado con IS6110, de que los patrones de estas cepas, independientemente de su origen geográfico, guardan un elevado porcentaje de similitud y forman un grupo homogéneo perfectamente diferenciado del integrado por el resto de cepas de otros orígenes (Figura 7).

Las cepas humanas pertenecieron a los tipos DR-6 (2 cepas) y DR-8 (13 cepas), el patrón DR-6 fue específico, sin embargo el patrón DR-8 es uno de los patrones más comunes obtenidos con el uso de DR y por ello no nos permite sacar conclusiones sobre el origen de estas cepas.

Las cepas aisladas de jabalíes compartieron el patrón DR-7 con una cepa bovina de la granja b-9, hasta el momento hemos sido incapaces de encontrar un vínculo epidemiológico directo entre ambos tipos de animales.

Como conclusión cabría señalar que la utilización de la sonda DR permite un grado de diferenciación de las cepas españolas de *M. bovis* mucho menor al conseguido con la sonda IS6110. La utilización de DR sólo presenta una ventaja

evidente en la diferenciación del grupo de cepas tipo IS1A.

En la **Tabla 11** se esquematiza la concordancia entre los tipos de RFLP obtenidos con las sondas PGRS e IS6110 (RHS y LHS). Tanto con la sondas para IS6110 como con la sonda para PGRS se demostró la existencia de 29 tipos distintos, aunque los grupos no coincidieron exactamente.

En 8 ocasiones se obtuvo el mismo grado de polimorfismo al utilizar IS6110 y PGRS. En 6 tipos de IS diferentes (tipos IS1Aa, b, c y d, IS2A e IS12A) el uso de la sonda para PGRS permitió detectar un mayor polimorfismo entre cepas del detectado con IS6110 (**Tabla 12**). Como puede observarse en el dendograma (**Figura 8**), los tipos P-5 y P-6 muestran un patrón de bandas muy similar entre si y sólo se diferencian en la posición de 1 de 9 bandas. En el resto de los casos cada uno de los grupos establecidos con PGRS representaron varios grupos con IS6110.

Tabla 12. Relación entre los tipos de RFLP con las sondas IS6110 y PGRS, en los 6 tipos IS en los que esta última permite un mayor polimorfismo.

Tipo de RFLP (IS6110)	Tipo de RFLP (PGRS)
IS1Aa	P-3, P-9, P-11^a , P-13b, P-15, P-17, P-20
IS1Ab	P-9, P-13a, P-17, P-24
IS1Ac	P-1, P-7
IS1Ad	P-3, P-10
IS2A	P-13b, P-18, P-19
IS12A	P-5, P-6

^aLos tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

Tabla 11. Relación entre los tipos de RFLP con las sondas IS6110 y PGRS.

Tipo de RFLP (PGRS)	Tipo de RFLP (IS6110)
P-1 ^a	IS1Ac
<u>P-2^b</u>	<u>IS11A</u>
P-3	IS1Aa, IS1Ad
<u>P-4</u>	<u>IS1D</u>
P-5	IS12A
P-6	IS12A
P-7	IS1Ac
P-8	IS2C, IS3D
P-9	IS1Aa, IS1Ab, IS1B, IS2B, IS5D
P-10	IS1Ad
P-11	IS1Aa
<u>P-12</u>	<u>IS7B</u>
P-13a	IS1Ab, IS4A
P-13b	IS1Aa, IS2A, IS3A, IS3B, IS3C, IS5C, IS6D
<u>P-14</u>	<u>IS1C</u>
P-15	IS1Aa
<u>P-16</u>	<u>IS4B</u>
P-17	IS1Aa, IS1Ab
P-18	IS2A
P-19	IS2A
P-20	IS1Aa
<u>P-21</u>	<u>IS7A</u>
<u>P-22</u>	<u>IS5B</u>
P-23	IS1Aa
P-24	IS1Ab
P-25	IS1Aa
<u>P-26</u>	<u>IS6B</u>
P-27	IS5A, IS6C
P-28	IS6A, IS8A

^aLos tipos en negrita son aquellos específicos de granja.

^bLos tipos subrayados indican el mismo grado de polimorfismo al utilizar ambas sondas.

El grado de polimorfismo obtenido con la sonda PGRS en las cepas de cabras fue menor que el obtenido con IS6110 o DR, diferenciándose sólo 3 grupos de cepas. El grupo P-26 coincidió con los grupos DR-16 e IS6B incluyendo a los aislados de las granjas c-1, c-2 y c-3, todas ellas relacionadas epidemiológicamente. El grupo P-27 estaba formado por los aislados de las granjas c-5 (Cataluña), c-7 y c-8 (Madrid). Tanto con la sonda IS6110 como con DR, estas cepas mostraron patrones muy relacionados pero claramente diferentes para los dos grupos c-5 y c-7/c-8, sin embargo con PGRS fueron todas idénticas. Por último el grupo P-28 incluía cepas de las granjas c-4, c-6 y o-1, en este caso sólo IS6110 proporcionó el grado de diferenciación suficiente separando los aislados de las granjas relacionadas epidemiológicamente (c-4 y c-6/o-1), y los patrones obtenidos tanto DR como con PGRS fueron idénticos en todo el conjunto de cepas.

Cuando las cepas caprinas y ovina fueron analizadas en el conjunto del total de cepas estudiado se volvió a comprobar el hecho ya demostrado con IS6110 y con DR, de que los patrones de estas cepas, independientemente de su origen geográfico, guardan un elevado porcentaje de similitud y que forman un grupo homogéneo diferente del formado por el resto de cepas de otros orígenes (**Figura 8**).

La utilización de PGRS reveló un único grupo (P-8) para todas las cepas de procedencia humana, aunque no fue capaz de diferenciar a los dos tipos de cepas involucrados en el brote que fueron diferenciados con el uso de IS6110 y DR. La cepa felina perteneció a un tipo específico (P-11), lo cual indica que la fuente de infección de ese gato no se encuentra entre las cepas estudiadas.

Como resumen de los resultados obtenidos y en concordancia con lo demostrado por otros autores (Cousins et al., 1993a y b; Dwyer et al., 1993) puede señalarse que la utilización de la sonda PGRS permite un elevado grado de diferenciación de las cepas españolas de *M. bovis*. La utilización de PGRS representa una ventaja evidente en la diferenciación del grupo de cepas tipo IS1A, incluso en dos ocasiones permitió diferenciar un mayor número de tipos dentro de grupos específicos obtenidos con IS6110. En 8 ocasiones el grado de polimorfismo obtenido

fue el mismo al utilizar PGRS o IS6110 pero sin embargo en el resto de los casos IS6110 permitió diferenciar 2 o más tipos dentro de los grupos establecidos con PGRS.

Los resultados obtenidos con la secuencia IS1081 confirman los ya expresados por varios autores (Collins et al., 1993) de que este elemento es fuente de muy escasa variabilidad entre cepas, y que por tanto no es adecuado para su utilización como marcador epidemiológico.

En resumen, si en el conjunto general de las cepas se realiza el RFLP hibridando con IS6110 RHS se diferencian 26 tipos diferentes; si se hibrida después a los del grupo IS1A con IS6110 LHS, obtendríamos 29 tipos diferentes; si ahora sólo hibridamos con PGRS a los aislados de los tipos IS1Aa, b, c y d, generaríamos 42 tipos distintos de RFLP. Es decir, que de los 47 tipos reales que sabemos que existen **NO** detectaríamos las siguientes diferencias:

1. IS1Ab/D-7/P-13a y IS1Ab/D-3/P-13a
jabalíes (Doñana) b-18 (Cataluña)
b-9 (Castilla y León)
2. IS1Ab/D-1/P-24 y IS1Ab/D-11/P-24
b-6 (Castilla y León) b-9 (Castilla y León)
b-9 (Castilla y León)
b-11 (Castilla y León)
3. IS12A/DR-3/P-5 y IS12A/DR-3/P-6
b-4 (Castilla y León) b-4 (Castilla y León)
4. IS2A/DR-10/P-13b, IS2A/DR-10/P-18, IS2A/DR-10/P-19
b-22 (Cataluña) b-22 (Cataluña) b-22 (Cataluña)

En los casos 1. y 2. las diferencias no se habrían detectado por no haber hibridado los ADNs de las cepas unicopia para IS6110 con la sonda DR.

En los casos 3. y 4. las diferencias no se habrían detectado por haber hibridado con PGRS sólo los ADN de las cepas unicopia para IS6110 y no los de todas las cepas en general.

Se demuestra pues, que para la diferenciación exacta de todas las cepas no basta con la utilización de un marcador simple y que se deben manejar todos los disponibles. Sin embargo las sondas que originaron un mayor polimorfismo entre las cepas fueron IS6110 y PGRS. Las Figuras 6, 7 y 8 muestran 3 dendogramas obtenidos con la comparación de los patrones de RFLP obtenidos de todas las cepas incluidas en el estudio.

A partir de los datos obtenidos en este estudio, es más que probable que exista una relación epidemiológica entre las **cepas bovinas** de las granjas b-6, b-9 y b-11, ya que los patrones obtenidos con el uso de todas las sondas fueron idénticos y compartidos entre esas explotaciones. Una situación similar se observa entre las cepas bovinas de las granjas b-13 y b-17. Sin embargo, pese a los esfuerzos realizados, ha sido imposible establecer una comunicación epidemiológica directa entre los animales de las citadas explotaciones.

En las granjas b-4, b-9, b-11, b-21, b-22, b-23 y b-24 aparecieron simultáneamente varios tipos de cepas diferentes, lo que indica que la enfermedad en estas explotaciones tiene varios orígenes, quizás debido a la compra indiscriminada de animales sin garantías sanitarias o a la reposición con animales supuestamente sanos (por la técnica oficial de diagnóstico) que realmente eran portadores de la enfermedad. En el resto de las propiedades sólo se encontró un tipo de cepa causante del problema, aunque por razones económicas no pudieron estudiarse todas las cepas aisladas de todas las explotaciones.

Con este estudio se ha demostrado también que las 3 cepas de jabalíes estudiadas son idénticas a cepas de la granja b-9. Estos hechos confirman que las cepas de jabalíes proceden de cepas bovinas, aunque ha sido imposible demostrar una relación directa entre los jabalíes y los animales de la granja b-9.

En el caso de los **aislados de origen caprino** el método óptimo para la caracterización es la utilización del elemento IS6110. En nuestro estudio todos los aislados relacionados epidemiológicamente mostraron patrones idénticos, que por otra parte fueron diferentes a los patrones obtenidos para las cepas sin relación conocida.

La sonda DR permitió un grado menor de polimorfismo y por último la utilización de PGRS fue la que menos diferenció estos aislados. Las **figuras 6, 7 y 8** muestran tres dendogramas obtenidos tras el análisis computerizado de los patrones de RFLP de las cepas caprinas y ovina con las sondas IS6110, DR y PGRS. Con el uso de los tres marcadores genéticos se confirma la teoría de que estas cepas podrían constituir una subpoblación diferente de la formada por *M. bovis* de origen bovino. Aunque sería deseable el estudio de un mayor número de cepas, y de rebaños mixtos en los que pudieran encontrarse ambos tipos de animales.

En el caso de las **cepas humanas** involucradas en el brote de multiresistencia, se confirma la existencia de 2 tipos diferentes de cepas. Los patrones no se encontraron repetidos entre el resto de aislados estudiados, por lo que el origen de esta infección nosocomial es aún desconocido. Algo similar ocurre con la cepa felina, que aunque integrada en el conjunto de las cepas de procedencia bovina no se encontró repetida en ningún otro animal.

**CLAVE PARA LA IDENTIFICACION DE GRANJAS EN LOS DENDOGRAMAS DE LAS FIGURAS 2B,
3B, 4B, 6, 7 Y 8.**

Granja b-1	León 1
Granja b-2	León 21
Granja b-3	León 51
Granja b-4	León 56
Granja b-5	León 7
Granja b-6	León 14
Granja b-7	León 19
Granja b-8	León 27
Granja b-9	León 38
Granja b-10	León 41 y Ponferrada
Granja b-11	León 29
Granja b-12	León 37
Granja b-13	León 54
Granja b-14	133.AD
Granja b-15	653.BD
Granja b-16	215.CG
Granja b-17	405.AB
Granja b-18	583.AG
Granja b-19	Salvi
Granja b-20	661.BC
Granja b-21	397.AV
Granja b-22	Verge
Granja b-23	Teruel
Granja b-24	Agusti
Granja b-25	Santander
Granja b-26	Guadalajara
Granja b-27	Madrid 1
Granja c-1	Farm 1 o Barna 1
Granja c-2	Farm 2 o Barna 2
Granja c-3	Farm 3 o Barna 3
Granja c-4	Farm 4 o Barna 4
Granja c-5	Farm 5 o Barna 5
Granja c-6	Farm 6 o Barna 6
Granja c-7	Colmenar
Granja c-8	Madrid 2
Granja o-1	Ovino
Gato	Madrid, Rita
Humanas	H. Ramón y Cajal
Jabalíes	Doñana



Figura 1. Estimación de la concentración y calidad del ADN después de la digestión con *PvuII*. La electroforesis de 5 de los 25 μl del ADN digerido se llevó a cabo como se describió en el texto. Las calles 1 a 30 representan aproximadamente 0,8 μg de ADN micobacteriano digerido con *PvuII*. De todas estas muestras el volumen recomendado para utilizar en la electroforesis es de 12 μl , excepto en las calles 2, 3, 4, 6 y 7, en las cuales la calidad de las digestión es menor y por ello se recomienda cargar un mayor volumen (15-20 μl).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

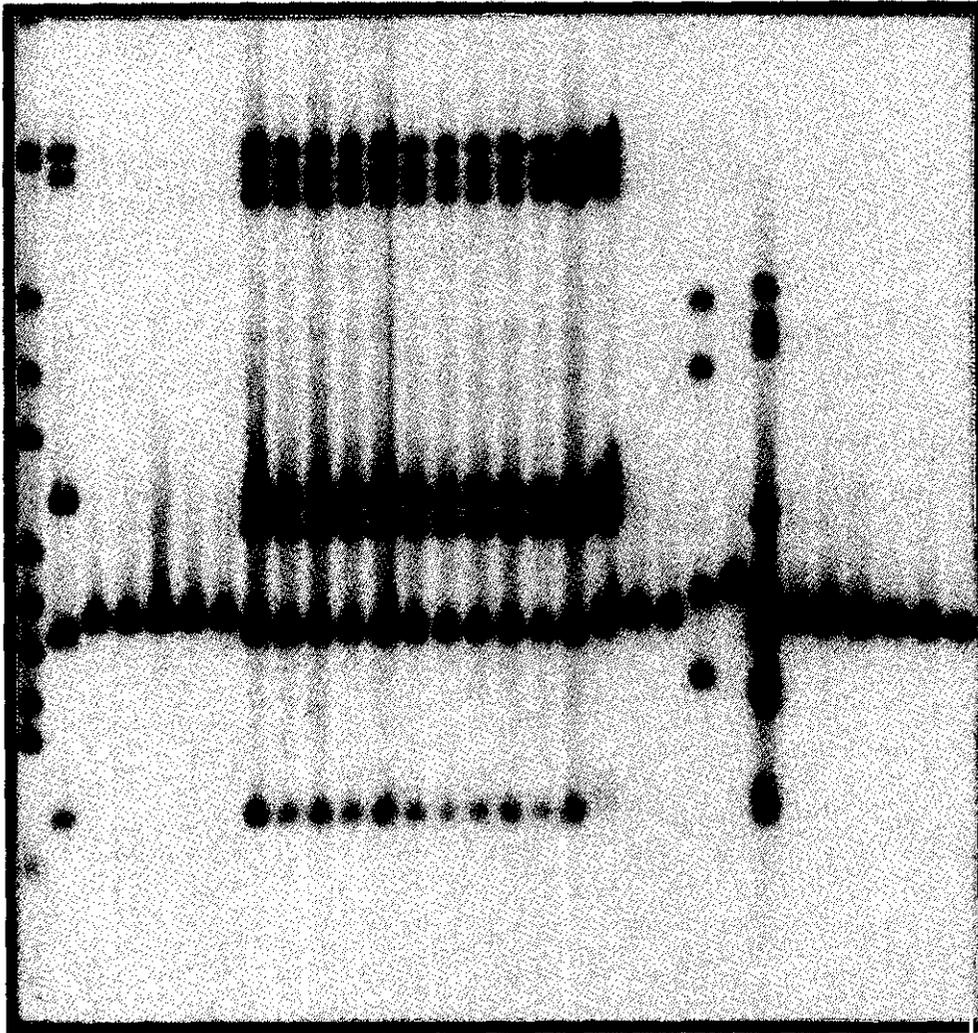
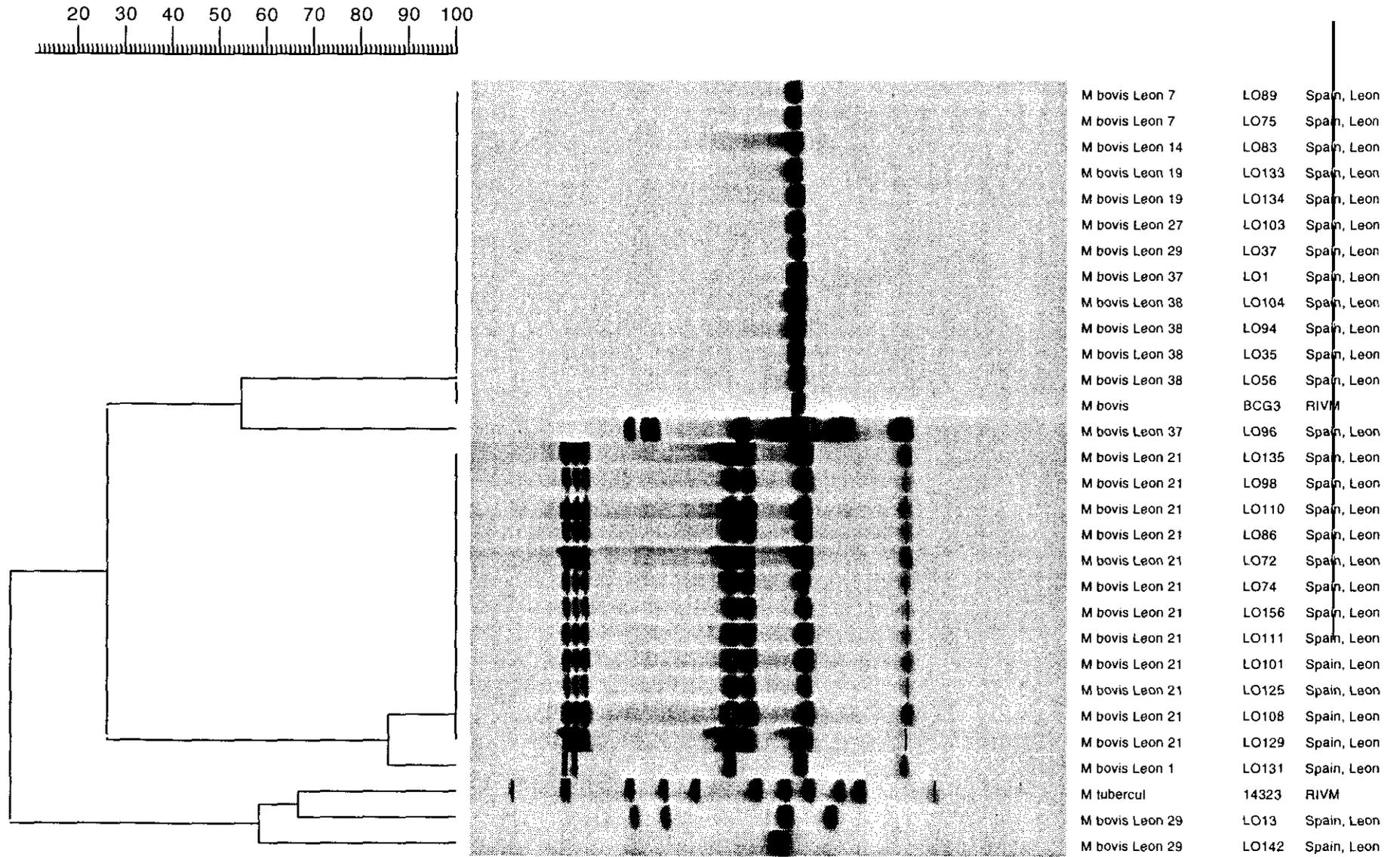


Figura 2a. Patrones de RFLP obtenidos tras la hibridación con IS6110 RHS de ADNs de cepas bovinas de *M. bovis* digeridos con *PvuII*. La calle 1 muestra el patrón obtenido para la cepa de referencia *M. tuberculosis* Mt.14323, con fragmentos de restricción IS6110-hibridados de tamaños de aproximadamente 17, 7.4, 7.1, 4.5, 3.6, 3.1, 2.1, 1.9, 1.7, 1.5, 1.4 y 1 kb. La calle 30 muestra el patrón obtenido para la cepa de referencia *M. bovis* BCG 3, con un fragmento de restricción IS6110-hibridado de 1.9 kb. La calle 2 contiene ADN de una cepa de la granja b-1; las calles 3 y 4, de cepas de la granja b-5; la calle 5, de una cepa de la granja b-6; las calles 6 y 7, de cepas de la granja b-7; las calles 8 a 19, de cepas de la granja b-2; la calle 20 de una cepa de la granja b-8; calles 21 a 23, cepas de la granja b-11; calles 24 y 25, de la granja b-12 y por último calles 26 a 29, cepas de la granja b-9.

La transparencia superpuesta muestra los fragmentos del marcador interno de peso molecular, visualizados tras la hibridación de la misma membrana con una sonda marcada como se describió en el texto.

FIG. 2 b



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

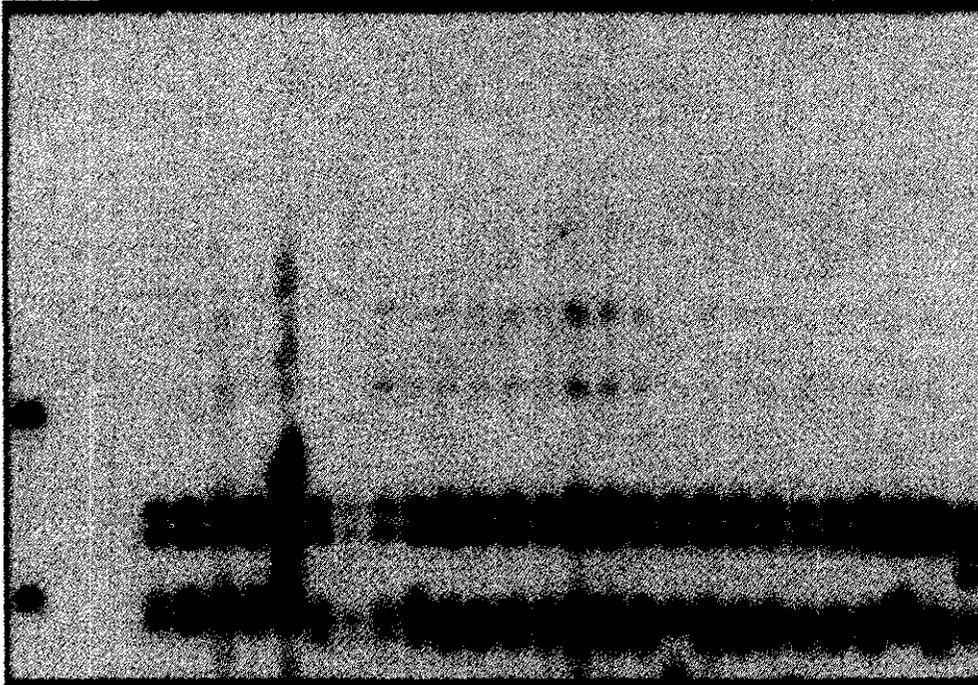
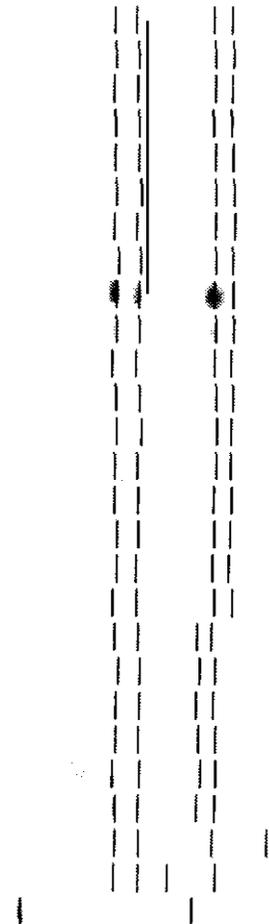
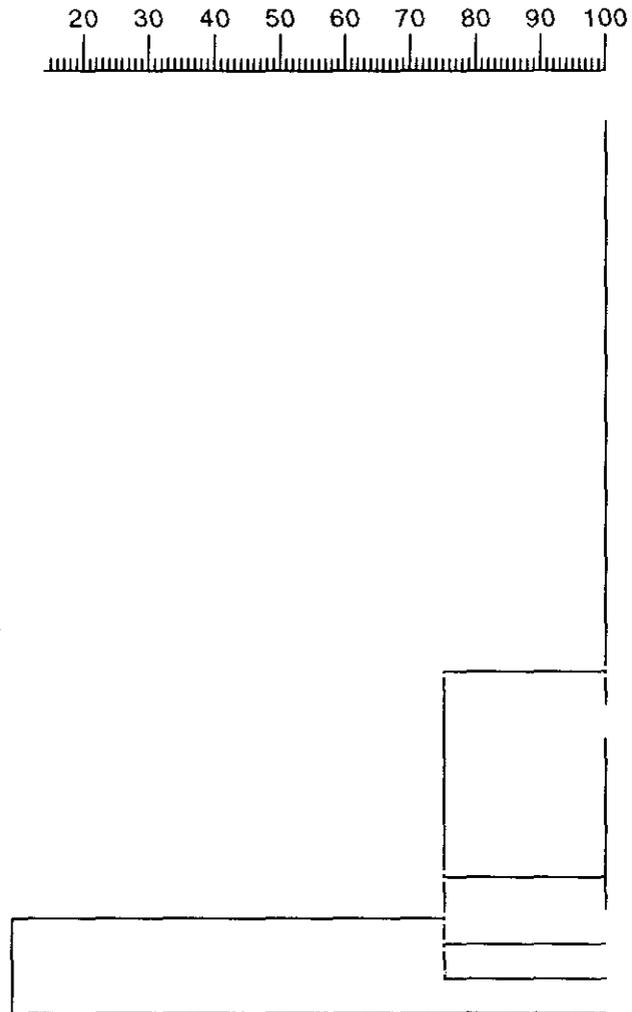


Figura 3a. Patrones de RFLP obtenidos tras la hibridación con DR de ADNs de cepas bovinas de *M. bovis* digeridos con *AluI*. Las calles 1 y 30 muestran los patrones obtenidos para las cepas de referencia *M. tuberculosis* Mt.14323 y *M. bovis* BCG 3 respectivamente. Las calles 2 a 4 contienen ADN de cepas de la granja b-20; la calle 5, de una cepa de la granja b-18; la calle 6, de una cepa de la granja b-17; las calles 7 y 8, de cepas de la granja b-21 y por último las calles 10 a 29, ADNs de cepas pertenecientes a la granja b-22.

La transparencia superpuesta muestra los fragmentos del marcador interno de peso molecular, visualizados tras la hibridación de la misma membrana con una sonda marcada como se describió en el texto.

FIG. 3b



M bovis Barna Verge	B213	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B219	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B224	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B299	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B282	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B284	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B288	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B289	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B301	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B305	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B378	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B388	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B390	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B392	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B394	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B395	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B396	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B412	Spain, Barce
M bovis Barna 583.AG	B23	Spain, Barce
M bovis Barna 405.AB	B43	Spain, Barce
M bovis Barna 397.AV	B73	Spain, Barce
M bovis Barna 397.AV	B91	Spain, Barce
M bovis Barna Salvi	B134	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B402	Spain, Barce
M bovis Barna Verge	B380	Spain, Barce
M bovis	BCG3	RIVM
M tuberculosis	14323	RIVM

Análisis de polimorfismos genéticos

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

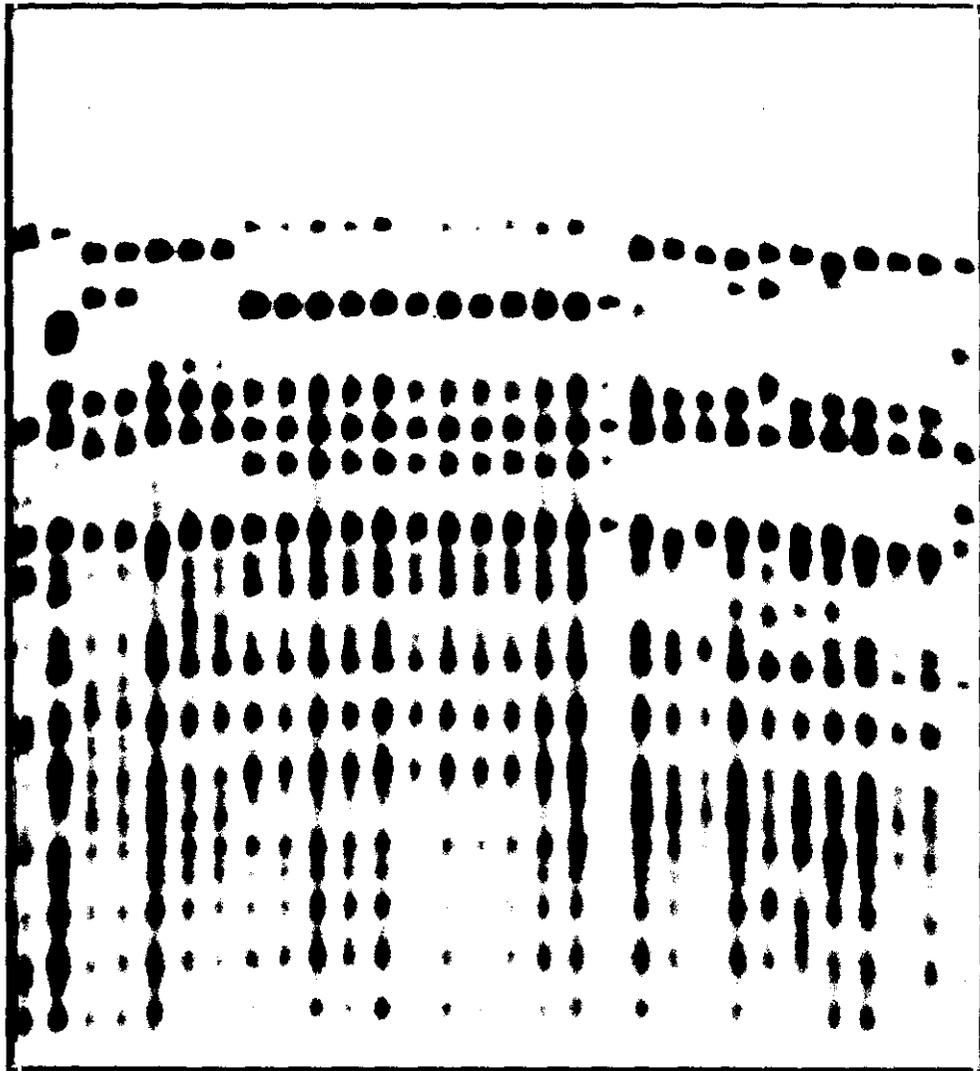
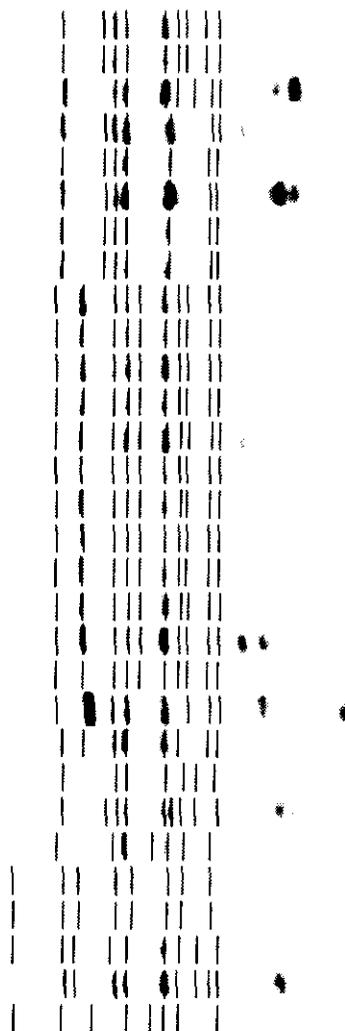
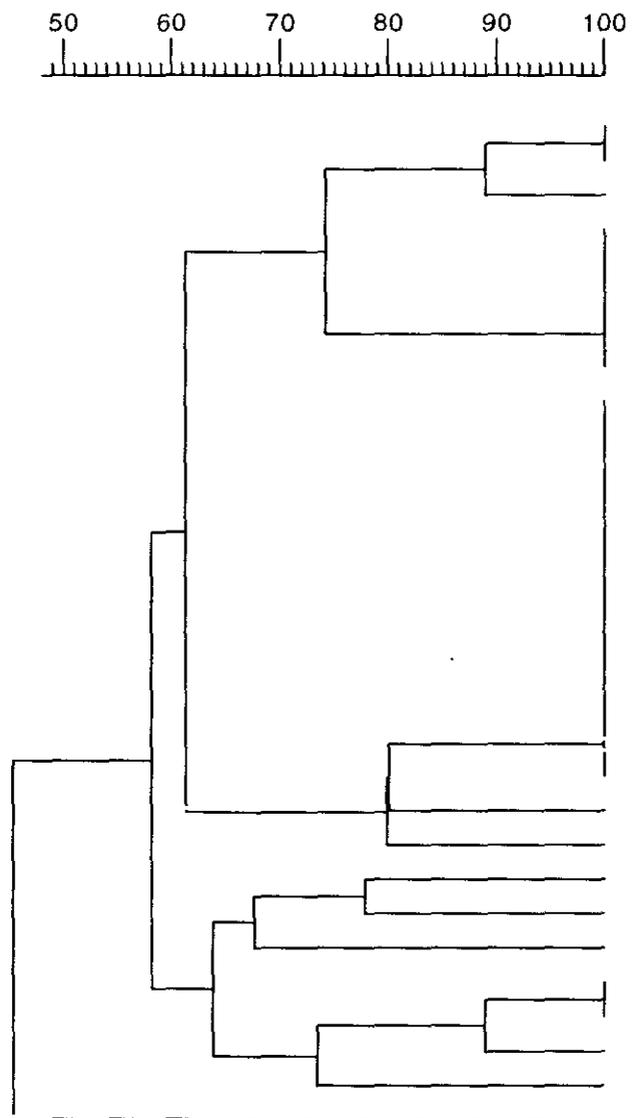


Figura 4a. Patrones de RFLP obtenidos tras la hibridación con PGRS de ADN de cepas bovinas de *M. bovis* digeridos con *AluI*. Las calles 1 y 30 muestran los patrones obtenidos para las cepas de referencia *M. tuberculosis* Mt.14323 y *M. bovis* BCG 3 respectivamente. La calle 2 contiene ADN de una cepa de la granja b-1; las calles 3 y 4, de cepas de la granja b-5; la calle 5, de una cepa de la granja b-6; las calles 6 y 7, de cepas de la granja b-7; las calles 8 a 19, de cepas de la granja b-2; la calle 20 de una cepa de la granja b-8; calles 21 a 23, cepas de la granja b-11; calles 24 y 25, de la granja b-12 y por último calles 26 a 29, cepas de la granja b-9.

La transparencia superpuesta muestra los fragmentos del marcador interno de peso molecular, visualizados tras la hibridación de la misma membrana con una sonda marcada como se describió en el texto.

FIG. 4 b



M bovis Leon 19	LO133	Spain, Leon
M bovis Leon 19	LO134	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO104	Spain, Leon
M bovis Leon 14	LO83	Spain, Leon
M bovis Leon 29	LO37	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO94	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO35	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO56	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO135	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO98	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO110	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO86	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO72	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO74	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO156	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO111	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO101	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO125	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO108	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO129	Spain, Leon
M bovis Leon 1	LO131	Spain, Leon
M bovis Leon 27	LO103	Spain, Leon
M bovis Leon 29	LO13	Spain, Leon
M bovis Leon 37	LO1	Spain, Leon
M tuber	14323	RIVM
M bovis Leon 7	LO89	Spain, Leon
M bovis Leon 7	LO75	Spain, Leon
M bovis Leon 37	LO96	Spain, Leon
M bovis Leon 29	LO142	Spain, Leon
M bovis	BCG3	RIVM

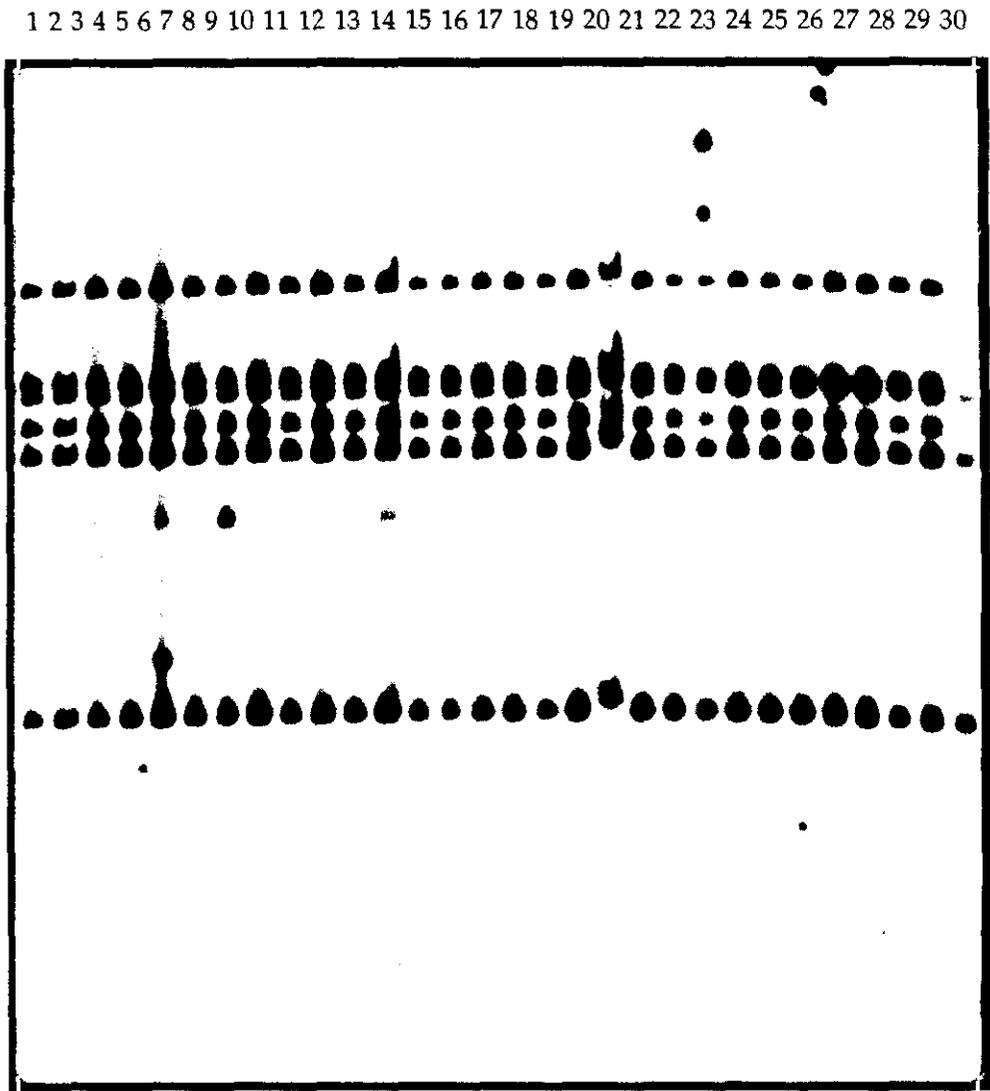
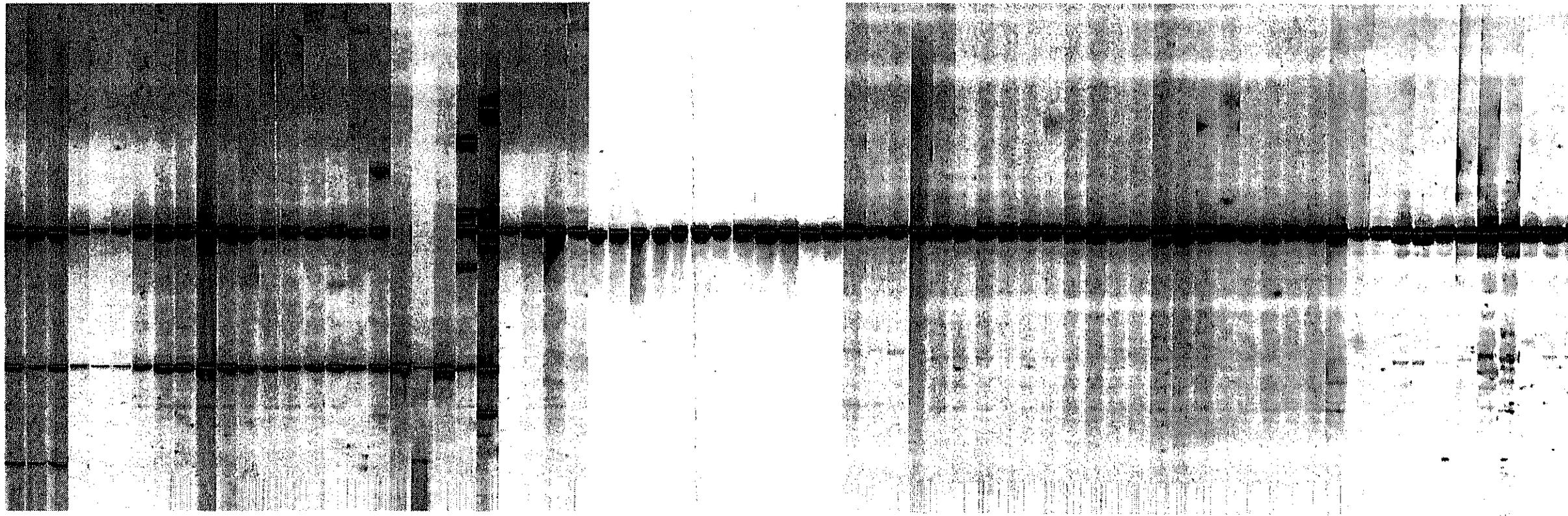
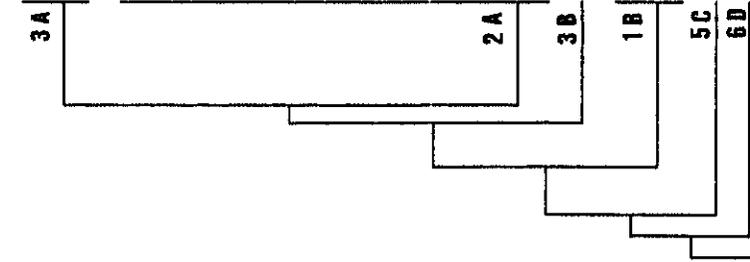


Figura 5. Patrones de RFLP obtenidos tras la hibridación con IS1081 de ADNs de cepas bovinas de *M. bovis* digeridos con *PvuII*. Las calles 1 y 30 muestran los patrones obtenidos para las cepas de referencia *M. tuberculosis* Mt.14323 y *M. bovis* BCG 3 respectivamente. La calle 2 contiene ADN de una cepa de la granja b-1; las calles 3 y 4, de cepas de la granja b-5; la calle 5, de una cepa de la granja b-6; las calles 6 y 7, de cepas de la granja b-7; las calles 8 a 19, de cepas de la granja b-2; la calle 20 de una cepa de la granja b-8; calles 21 a 23, cepas de la granja b-11; calles 24 y 25, de la granja b-12 y por último calles 26 a 29, cepas de la granja b-9.

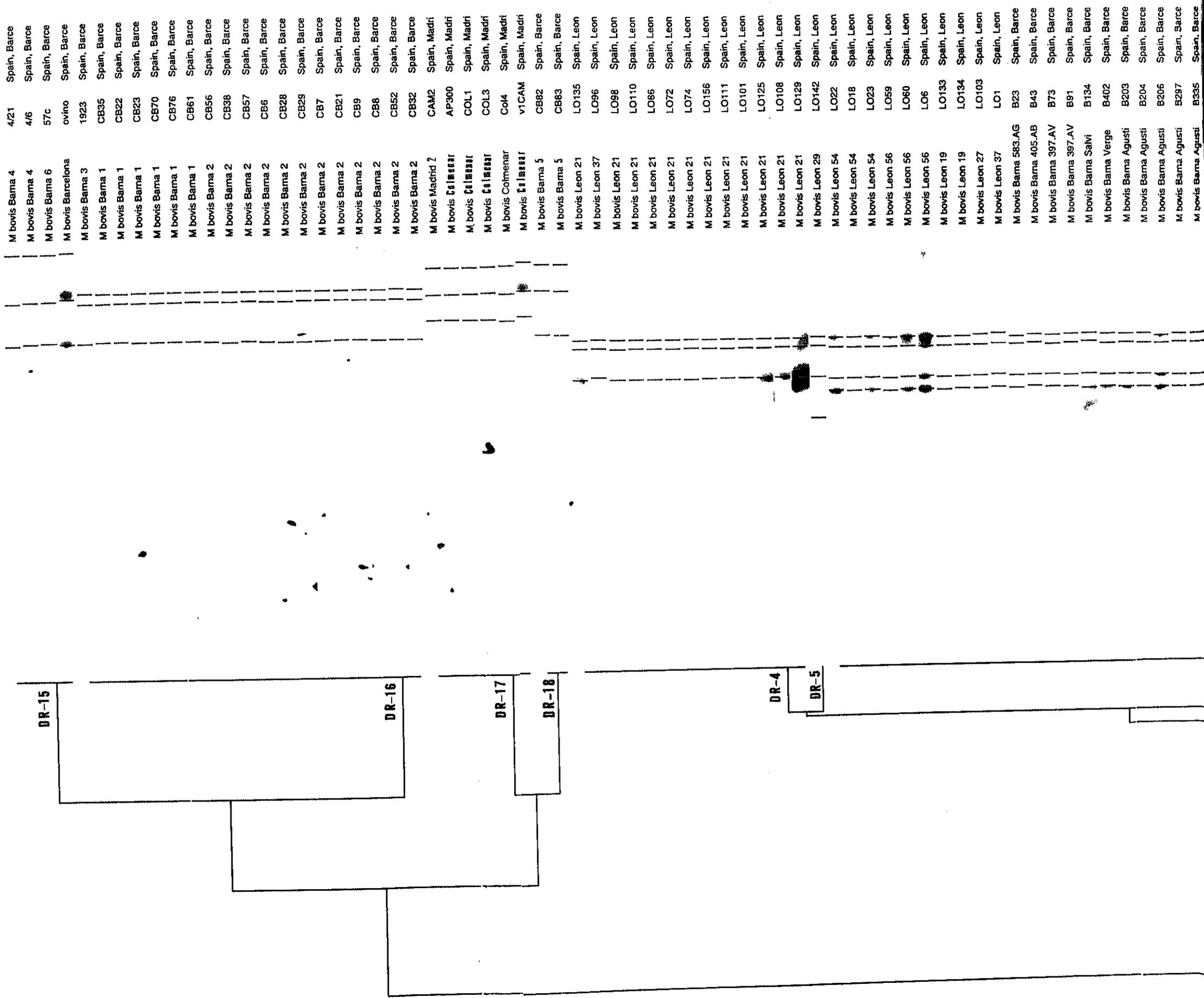
La transparencia superpuesta muestra los fragmentos del marcador interno de peso molecular, visualizados tras la hibridación de la misma membrana con una sonda marcada como se describió en el texto.

FIG. 6 IS 6110 RHS

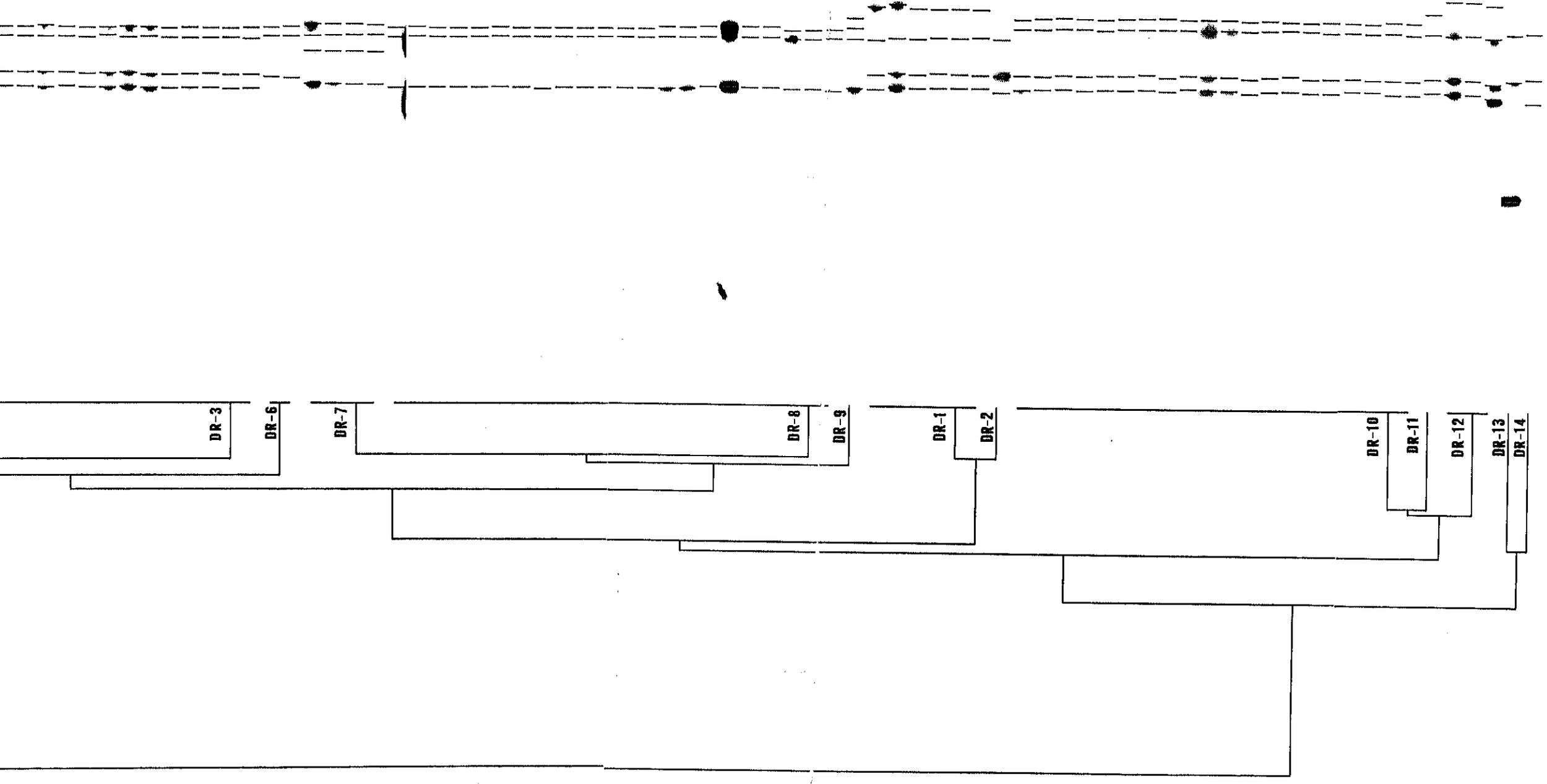


M bovis Barma Verge	B284	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B289	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B378	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B213	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B219	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B224	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B299	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B282	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B288	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B301	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B305	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B388	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B392	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B394	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B395	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B396	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B412	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B390	Spain, Barce
M bovis Barma Tenuel	B304	Spain, Barce
M bovis Barma Tenuel	B302	Spain, Barce
M bovis Barma Tenuel	B270	Spain, Barce
M bovis Barma 133.AD	B171	Spain, Barce
M bovis Madrid 1	M1g	Spain, Madr
M bovis Barma 583.AG	B23	Spain, Barce
M bovis Barma 405.AB	B43	Spain, Barce
M bovis Barma Salvi	B134	Spain, Barce
M bovis Barma Verge	B402	Spain, Barce
M bovis Leon 7	LO89	Spain, Leon
M bovis Leon 7	LO75	Spain, Leon
M bovis Leon 14	LO83	Spain, Leon
M bovis Leon 19	LO133	Spain, Leon
M bovis Leon 19	LO134	Spain, Leon
M bovis Leon 27	LO103	Spain, Leon
M bovis Leon 29	LO37	Spain, Leon
M bovis Leon 37	LO1	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO104	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO94	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO35	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO56	Spain, Leon
M bovis Barma 215.CG	B186	Spain, Barce
M bovis Barma 215.CG	B193	Spain, Barce
M bovis Barma 215.CG	B195	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B204	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B206	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B297	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B335	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B336	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B338	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B357	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B359	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B370	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B382	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B386	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B246	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B265	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B277	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B405	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B416	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B425	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B428	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B435	Spain, Barce
M bovis Barma Tenuel	B293	Spain, Barce
M bovis Leon 41	LO50	Spain, Leon
M bovis Leon 41	LO51	Spain, Leon
M bovis Leon 54	LO22	Spain, Leon
M bovis Leon 54	LO18	Spain, Leon
M bovis Leon 54	LO23	Spain, Leon
M bovis Leon 54	LO9	Spain, Leon
M bovis Santander	S4	Spain, Sant
M bovis Guadajajara	VGu	Spain, Guad
M bovis Porterrada	P24	Spain, Port
M bovis Doñana	J1	Spain, Dona

FIG. 7 DR



M bovis Bama Agustí B357 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B359 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B370 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B382 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B386 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B246 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B265 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B277 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B405 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B416 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B425 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B428 Spain, Barce
 M bovis Bama Agustí B435 Spain, Barce
 M bovis H. Ramon y Caj RC3 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC15 Spain, Madri
 M bovis Doñana J1 Spain, Donan
 M bovis Doñana J2 Spain, Donan
 M bovis Doñana J3 Spain, Donan
 M bovis Leon 38 LO104 Spain, Leon
 M bovis H. Ramon y Caj RC2 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC4 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC5 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC6 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC7 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC8 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC9 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC10 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC11 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC12 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC14 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC16 Spain, Madri
 M bovis H. Ramon y Caj RC17 Spain, Madri
 M bovis Leon 41 LO50 Spain, Leon
 M bovis Leon 41 LO51 Spain, Leon
 M bovis Ponferrada P24 Spain, Ponte
 M bovis Bama 653.BD B103 Spain, Barce
 M bovis Leon 7 LO89 Spain, Leon
 M bovis Leon 7 LO75 Spain, Leon
 M bovis Bama 215.CG B186 Spain, Barce
 M bovis Bama 215.CG B193 Spain, Barce
 M bovis Bama 215.CG B195 Spain, Barce
 M bovis Santander S4 Spain, Santa
 M bovis Leon 54 LO9 Spain, Leon
 M bovis Madrid Rita Spain, Madri
 M bovis Leon 14 LO83 Spain, Leon
 M bovis Leon 29 LO37 Spain, Leon
 M bovis Leon 38 LO94 Spain, Leon
 M bovis Leon 38 LO56 Spain, Leon
 M bovis Leon 1 LO131 Spain, Leon
 M bovis Madrid I M1G Spain, Madri
 M bovis Bama Verge B213 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B219 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B224 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B299 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B282 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B284 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B288 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B289 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B301 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B305 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B378 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B388 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B390 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B392 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B394 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B395 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B396 Spain, Barce
 M bovis Bama Verge B412 Spain, Barce
 M bovis Bama 133.AD B171 Spain, Barce
 M bovis Leon 38 LO35 Spain, Leon
 M bovis Guadalejara vacGU Spain, Guada
 M bovis Bama Verge B360 Spain, Barce
 M bovis Bama Teruel B293 Spain, Barce
 M bovis Leon 51 LO48 Spain, Leon
 M bovis Leon 29 LO13 Spain, Leon



DR-3

DR-6

DR-7

DR-8

DR-9

DR-1

DR-2

DR-10

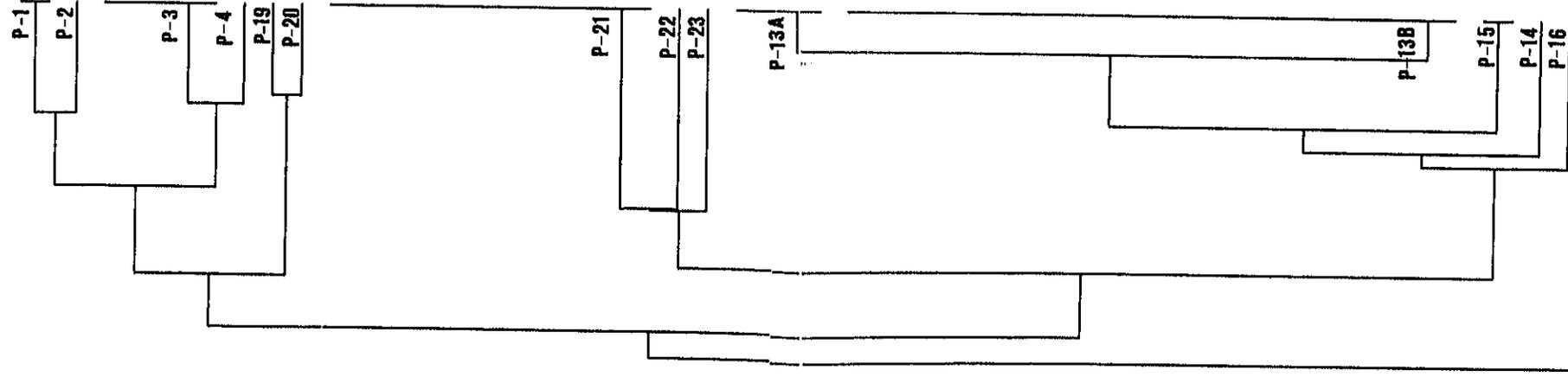
DR-11

DR-12

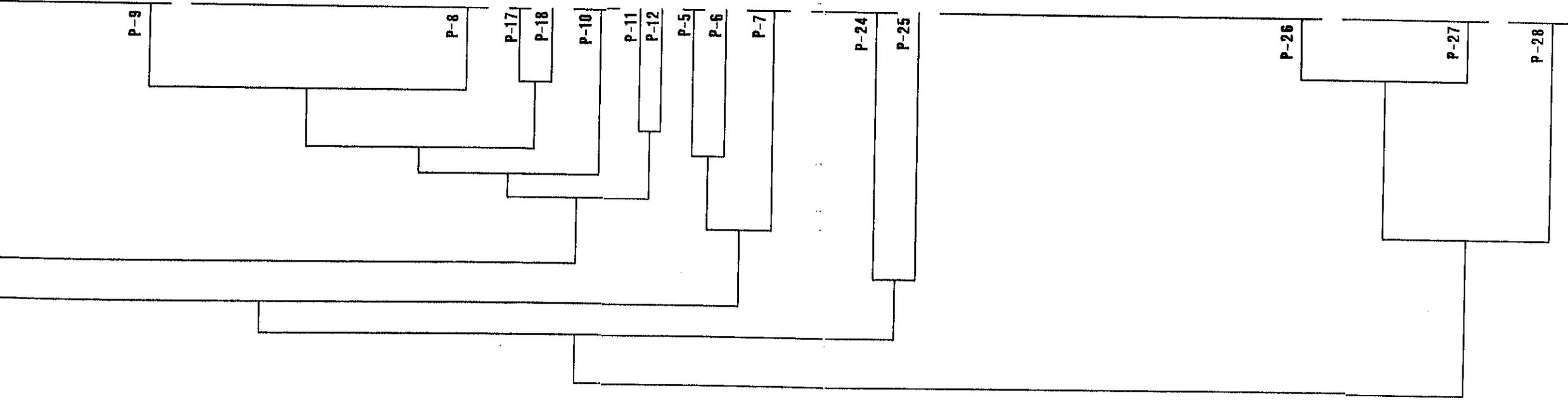
DR-13

DR-14

FIG. 8 PGERS



M bovis Leon 7	LO89	Spain, Leon
M bovis Leon 7	LO75	Spain, Leon
M bovis Leon 37	LO96	Spain, Leon
M bovis Bama 405.AB	B43	Spain, Barce
M bovis Leon 54	LO22	Spain, Leon
M bovis Leon 54	LO18	Spain, Leon
M bovis Leon 54	LO23	Spain, Leon
M bovis Santander	S4	Spain, Santa
M bovis Leon 29	LO142	Spain, Leon
M bovis Bama Verge	B299	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B402	Spain, Barce
M bovis Leon 21	LO195	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO98	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO110	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO86	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO72	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO74	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO156	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO111	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO101	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO125	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO108	Spain, Leon
M bovis Leon 21	LO129	Spain, Leon
M bovis Leon 1	LO131	Spain, Leon
M bovis Leon 27	LO103	Spain, Leon
M bovis Doñana	J1	Spain, Donan
M bovis Leon 38	LO104	Spain, Leon
M bovis Doñana	J2	Spain, Donan
M bovis Doñana	J3	Spain, Donan
M bovis Bama 133.AD	B171	Spain, Barce
M bovis Bama 583.AG	B23	Spain, Barce
M bovis Bama 397.AV	B73	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B213	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B224	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B282	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B284	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B288	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B289	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B301	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B305	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B378	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B380	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B388	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B390	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B392	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B394	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B395	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B396	Spain, Barce
M bovis Bama Verge	B412	Spain, Barce
M bovis Madrid 1	M1G	Spain, Madri
M bovis Guadalejara	VacGU	Spain, Guada
M bovis Leon 19	LO133	Spain, Leon
M bovis Leon 19	LO134	Spain, Leon
M bovis Leon 51	LO48	Spain, Leon
M bovis Leon 29	LO13	Spain, Leon
M bovis Bama Agusti	B203	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B204	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B206	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B297	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B335	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B336	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B338	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B357	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B359	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B370	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B382	Spain, Barce
M bovis Bama Agusti	B398	Spain, Barce



M bovis Barma Agusti	B277	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B405	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B416	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B425	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B428	Spain, Barce
M bovis Barma Agusti	B435	Spain, Barce
M bovis Barma Teruel	B304	Spain, Barce
M bovis Barma 397.AV	B91	Spain, Barce
M bovis Barma Savi	B134	Spain, Barce
M bovis H. Ramon y Caj	RC2	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC3	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC4	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC5	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC6	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC7	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC8	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC9	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC10	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC11	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC12	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC14	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC15	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC16	Spain, Madri
M bovis H. Ramon y Caj	RC17	Spain, Madri
M bovis Barma Teruel	B293	Spain, Barce
M bovis Leon 54	LO9	Spain, Leon
M bovis Barma Verge	B219	Spain, Barce
M bovis Barma 215.CG	B186	Spain, Barce
M bovis Barma 215.CG	B193	Spain, Barce
M bovis Barma 215.CG	B195	Spain, Barce
M bovis Madrid	Rita	Spain, Madri
M bovis Barma 653.BD	B103	Spain, Barce
M bovis Leon 56	LO59	Spain, Leon
M bovis Leon 56	LO60	Spain, Leon
M bovis Leon 56	LO6	Spain, Leon
M bovis Leon 41	LO50	Spain, Leon
M bovis Leon 41	LO51	Spain, Leon
M bovis Pontferrada	P24	Spain, Ponte
M bovis Leon 14	LO63	Spain, Leon
M bovis Leon 29	LO37	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO94	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO35	Spain, Leon
M bovis Leon 38	LO56	Spain, Leon
M bovis Leon 37	LO1	Spain, Leon
M bovis Barma 3	1923	Spain, Barce
M bovis Barma 1	CB35	Spain, Barce
M bovis Barma 1	CB22	Spain, Barce
M bovis Barma 1	CB23	Spain, Barce
M bovis Barma 1	CB70	Spain, Barce
M bovis Barma 1	CB76	Spain, Barce
M bovis Barma 1	CB61	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB56	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB38	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB57	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB6	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB28	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB29	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB7	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB7	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB9	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB8	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB52	Spain, Barce
M bovis Barma 2	CB32	Spain, Barce
M bovis Colmenar	COL4	Spain, Madri
M bovis Barma 3	CB82	Spain, Barce
M bovis Barma 3	CB83	Spain, Barce
M bovis Madrid 2	CAM2	Spain, Madri
M bovis 1 1 1 1 1	AP300	Spain, Madri
M bovis Colmenar	COL1	Spain, Madri
M bovis Colmenar	COL3	Spain, Madri
M bovis 1 1 1 1 1	V1CAM	Spain, Madri
M bovis Barma 4	4/21	Spain, Barce
M bovis Barma 4	4/6	Spain, Barce
M bovis Barma 6	57c	Spain, Barce
M bovis Barma	ovino	Spain, Barce

V. CONCLUSIONES DE ESTA TESIS

- 1) El protocolo óptimo para el primoaislamiento de *M. bovis* a partir de muestras tisulares es la descontaminación con HPC, seguida de la siembra en los medios de Coletsos y de Löwenstein-Jensen.
- 2) La reacción de PCR para detectar conjuntamente los fragmentos cromosómicos IS1081 y *mtp40*, es una prueba simple, rápida y eficaz para la diferenciación de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.
- 3) La mayoría de las cepas de *M. africanum* y de *M. tuberculosis*, consideradas como patógenos humanos, dan un resultado positivo en el PCR múltiple *mtp40*/IS1081. Sin embargo *M. bovis* y *M. microti*, los patógenos animales tradicionales, dan un resultado negativo para *mtp40*. La excepción a esta regla son las cepas de focas, las cuales se agrupan con los patógenos humanos.
- 4) En este trabajo hemos comunicado por primera vez la amplificación de una secuencia compatible con IS6110 en 1 cepa de *M. ulcerans* y en 1 cepa de *M. gilvum*. Este resultado indica la necesidad de analizar un mayor número de cepas de micobacterias para aclarar el espectro de hospedadores de esta secuencia, hasta ahora mundialmente considerada como específica de los miembros del complejo *M. tuberculosis*.
- 5) La prueba de inmunoperoxidasa para detección del antígeno MPB70 es un método fiable y específico para la identificación de cepas de la especie *M. bovis*.
- 6) Un elevado porcentaje de las cepas españolas de *M. bovis* de origen bovino presentan múltiples copias de la secuencia IS6110, siendo esta situación sorprendentemente diferente a la descrita para cepas similares procedentes de otras localizaciones mundiales.

7) Para la diferenciación exacta por RFLP de las cepas españolas de *M. bovis* no basta con la utilización de un marcador genético simple y se deben manejar todos los disponibles hasta el momento. Sin embargo, los elementos que originan un mayor polimorfismo entre las cepas son por orden, IS6110 y PGRS.

8) Las cepas de *M. bovis* de origen caprino, independientemente de su procedencia geográfica, forman un conjunto genéticamente homogéneo y claramente diferenciado del formado por las cepas de *M. bovis* de otros orígenes animales.

VI. RESUMEN

Esta Tesis Doctoral ha pretendido desarrollar y evaluar una serie de nuevas técnicas para la **identificación y tipificación molecular** de cepas de *M. bovis*. Estas nuevas técnicas son de gran interés para su aplicación práctica a las campañas de erradicación de la tuberculosis bovina.

La mayoría de las muestras tisulares remitidas para el aislamiento de *M. bovis* contienen una flora microbiana acompañante, por ello es necesaria la descontaminación de las muestras antes de su cultivo. Los reactivos elegidos para la descontaminación deben ejercer el mínimo efecto sobre la viabilidad de las micobacterias y sin embargo deben ser capaces de destruir completamente la flora contaminante. Hasta el momento no se conoce ningún agente desinfectante que carezca por completo de toxicidad para *M. bovis*. Los tratamientos actualmente más extendidos en los laboratorios de micobacteriología son: el método de descontaminación propuesto por Tacquet y Tison en 1961, y el tratamiento con cloruro de hexadecil-cetil-piridinio (HPC) (Corner y Trajstman, 1988).

En este estudio hemos demostrado que en el primoaislamiento de *M. bovis* a partir de tejidos en nuestro laboratorio, el protocolo óptimo es la descontaminación con HPC, seguida de la siembra en los medios de Coletsos (por la rapidez del crecimiento) y de Löwenstein-Jensen (por la menor posibilidad de contaminación). En aquellas muestras que se observe contaminación tras el uso del HPC se recomienda realizar una descontaminación con NaOH/SDS y si la contaminación persiste, una descontaminación doble seriada, primero con HPC y después con NaOH/SDS.

La identificación de micobacterias está comúnmente basada en observaciones macroscópicas y en pruebas bioquímicas convencionales. Todos ellos son procedimientos muy lentos cuando se trata de microorganismos incluidos en el complejo *M. tuberculosis*.

Recientemente se ha comenzado a introducir la utilización de sondas de ADN y de reacciones de PCR para la identificación rápida de estas bacterias. No obstante,

hasta hoy, estas técnicas no eran capaces de diferenciar a *M. tuberculosis* del resto de los miembros del complejo, entre los que se encuentran *M. bovis*, *M. microti* y *M. africanum*.

En los últimos años, la tuberculosis humana ha recuperado el protagonismo dentro de las enfermedades infecciosas; además la tuberculosis bovina es aún un serio problema económico y sanitario en muchos países, siendo un hecho reconocido su potencial influencia en la salud humana.

La gran similitud en la presentación clínica, el tratamiento y el pronóstico de las infecciones por *M. tuberculosis* y *M. bovis* en el hombre ha provocado fallos en los sistemas de identificación utilizados para diferenciar entre ambas especies, en buena parte de los laboratorios del mundo.

El primer paso para conocer la importancia real de las infecciones por *M. bovis* en humanos sería la realización de estudios epidemiológicos detallados sobre la forma y la magnitud de la transmisión de la infección del ganado afectado al hombre, y para ello hay una necesidad urgente de desarrollar una prueba rápida y simple para diferenciar entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. El objetivo del presente trabajo fue diseñar, optimizar, y evaluar en un número suficiente de cepas micobacterianas, una PCR múltiple para tal fin.

El funcionamiento de la prueba de PCR fue óptimo al utilizar conjuntamente los iniciadores 1081 para el elemento IS1081 (descrito como específico para el complejo *M. tuberculosis*) y los iniciadores PT para el elemento *mtp40* (descrito como específico para la especie *M. tuberculosis*). Los resultados óptimos de la reacción se consiguieron al utilizar 35 ciclos de amplificación con una temperatura de emparejamiento de 65°C, 0,5 mM de MgCl₂, 0,5 U/reacción de Tth polimerasa, 150 y 60 ng/reacción de cada uno de los iniciadores PT y 1081 respectivamente.

La reacción de PCR diseñada ha resultado ser una prueba simple, rápida (6-8 horas) y altamente específica; la utilización de los 4 iniciadores en un sólo tubo permite verificar la pertenencia al complejo *M. tuberculosis* y la presencia del fragmento *mtp40* en una sola reacción, lo que supone un ahorro importante en reactivos y material. Mediante el PCR múltiple *mtp40*/IS1081, la mayoría de las cepas

de *M. africanum* se agruparon junto a *M. tuberculosis*, obteniéndose un resultado positivo en la prueba para los patógenos humanos. Sin embargo, *M. bovis* y *M. microti*, los patógenos animales tradicionales, daban un resultado negativo para *mtp40*. La excepción a esta regla fueron las cepas de focas, las cuales se agruparon con los patógenos humanos. Se ha encontrado también que la prueba de inmunoperoxidasa es un método simple, fiable y específico para la identificación de la especie *M. bovis*

M. bovis es capaz de infectar a una gran variedad de especies, tanto domésticas como salvajes e incluso al hombre, por ello hay una gran necesidad de definir los principales reservorios y las rutas de transmisión entre ellos y el ganado.

Una de las herramientas más poderosas para el estudio de la epidemiología de las micobacterias patógenas es la diferenciación de cepas mediante técnicas genéticas de tipificación. La técnica más utilizada hasta el momento es el *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) del ADN genómico, también llamado *Restriction Endonuclease Analysis* (REA). Esta técnica consiste en poner de manifiesto una serie de fragmentos polimórficos de restricción mediante el uso de sondas específicas dirigidas a determinados elementos.

En las cepas pertenecientes al complejo *M. tuberculosis* se han identificado 3 diferentes elementos genéticos que contribuyen a la diferenciación entre cepas y que pueden ser útiles en estudios epidemiológicos: la secuencia de inserción IS6110 (Thierry et al., 1990), y las secuencias cortas repetitivas DR (Direct Repeat) (Hermans et al., 1991) y PGRS (Polimorphic GC Rich Repeat) (Ross et al., 1992).

La técnica de RFLP ha sido y está siendo utilizada de una manera rutinaria en estudios epidemiológicos de tuberculosis humana producida por *M. tuberculosis*. Sin embargo, hasta el momento, sólo se ha realizado un limitado número de estudios de epidemiología molecular de *M. bovis*.

El objeto de este estudio fue evaluar la aplicación del RFLP con sondas para los elementos antes indicados, en la caracterización de cepas españolas de *M. bovis* de diferentes procedencias geográficas y animales. Los resultados obtenidos han permitido establecer las bases para la creación de un banco de datos epidemiológico

que en un futuro próximo permita la realización de trazados epidemiológicos de los brotes de infección por *M. bovis* en nuestro país.

En resumen, hemos demostrado que las cepas de *M. bovis* responsables de la tuberculosis bovina y caprina en España pueden caracterizarse satisfactoriamente mediante RFLP con sondas para IS6110. La utilización de la sonda DR permite un grado de diferenciación mucho menor al conseguido con la sonda IS6110 y sólo presenta una ventaja en la diferenciación del grupo de cepas unicopia para IS6110. En concordancia con lo demostrado por otros autores (Cousins et al., 1993a y b; Dwyer et al., 1993) puede señalarse que la utilización de la sonda PGRS permite un elevado grado de diferenciación de las cepas españolas de *M. bovis*, la utilización de PGRS representa una ventaja evidente en la diferenciación de cepas con una sola copia de IS6110; incluso en dos ocasiones permitió diferenciar un mayor número de tipos dentro de grupos específicos obtenidos con IS6110, sin embargo en el resto de los casos IS6110 permitió diferenciar 2 o más tipos dentro de los grupos establecidos con PGRS. El RFLP con cualquiera de los elementos citados permitió separar claramente las cepas de origen bovino de aquellas de origen caprino.

Se ha demostrado pues, que para la diferenciación exacta de todas las cepas, no basta con la utilización de un marcador simple y que se deben manejar todos los disponibles. Sin embargo las sondas que originaron un mayor polimorfismo entre las cepas fueron IS6110 y PGRS.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Ab, B.K., R. Kiessling, J.D.A. Van Embden, J.E.R. Thole, D.S. Kumararatne, P. Pisa, A. Wondimu, & T.H.M. Ottenhoff. 1990. Induction of antigen-specific CD4+ HLA-DR-restricted cytotoxic T lymphocytes as well as nonspecific killer cells by the recombinant mycobacterial 65 kDa heat-shock protein. *European Journal of Immunology* 20: 369-377.
- Abou-Zeid, C., T.L. Ratliff, H.G. Wiker, M. Harboe, J. Bennedsen, & G.A.W. Rook. 1988. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 56: 3046-3051.
- Abou-Zeid, C., T. Garbe, R. Lathigra, H.G. Wiker, M. Harboe, G.A.W. Rook, & D.B. Young. 1991. Genetic and Immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infection and Immunity* 59 (8): 2712-2718.
- Akopyanz, N., N.O. Bukanov, T.U. Westblom, S. Kresovich, & D.E. Berg. 1992. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 20: 5137-5142.
- Andersen, A.B., Z.L. Yuan, K. Hasløv, B. Vergmann, & J. Bennedsen. 1986. Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 23 (3): 446-451.
- Andersen, A.B., L. Ljungqvist, & M. Olsen. 1990. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *Journal of General Microbiology* 136: 477-480.
- Andersen, P., D. Askgaard, L. Ljungqvist, J. Bennedsen, & I. Heron. 1991a. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. *Infection and Immunity* 59 (6): 1905-1910.
- Andersen, P., D. Askgaard, L. Ljungqvist, M.W. Bentzon, & I. Heron. 1991b. T-Cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 59 (4): 1558-1563.
- Aranaz, A., E. Liébana, & D.V. Cousins. 1995. Evaluación de la técnica RAPDs para la tipificación de microorganismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. JBC, 1st Bioscience Symposium, Madrid, Spain.

- Aranaz, A., E. Liébana, P. Pickering, C. Novoa, A. Mateos, & L. Domínguez. 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) procedures in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *The Veterinary Record*. 138: 276-280.
- Arnold, L.J., P.W. Hammond, W.A. Wlese, & N.C. Nelson. 1989. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin. Chem.* 35: 1588-1594.
- Ashbridge, K.R., R.J. Booth, J.D. Watson, & R.B. Lathigra. 1989. Nucleotide sequence of the 19-kDa antigen gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Research* 17: 1249.
- Auer, L.A. 1987. Assessment of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *Australian Veterinary Journal* 64 (6): 172-176.
- Auer, L.A., & S.M. Schleeauf. 1988. Antibodies to mycobacteria in cattle not infected with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 18: 51-61.
- Baess, I. 1982. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of rapidly growing mycobacteria. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica. Section B* 90: 371-375.
- Báguena, M.J. La tuberculosis y su historia. Colección Histórica de Ciencias de la Salud nº 3. Fundación Uriach 1838.
- Baldwin, J.H. 1968. Pulmonary bovine tuberculosis in an owner and in his dairy herd. *Cornell Veterinarian* 58: 81-87.
- Barrera, L., & I.N. de Kantor. 1987. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Tropical and Geographical Medicine*. 39: 222-227.
- Barrow, P.A. 1981. Aspects of the epidemiology of bovine tuberculosis in badgers and cattle. II. The development and use of a typing system for *Mycobacterium bovis*. *Journal of Hygiene, Cambridge* 86: 247-257.
- Barry, T., M. Glennon, T. Smith, & F. Gannon. 1993. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. *The Veterinary Record* 132 (16): 66-67.

- Bates, J.H. 1979. Diagnosis of tuberculosis. *Chest* 76(Suppl.): 757-763.
- Beck-Sagué, C., S.W. Dooley, M.D. Hutton, J. Otten, A. Breeden, J.T. Crawford, A.E. Pitchenic, C. Woodley, G. Cauthen, & W.R. Jarvis. 1992. Hospital outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* infections. *JAMA* 268: 1280-1286.
- Bercovier, H., O. Kafri, & S. Sela. 1986. Mycobacteria possess a surprisingly small number of ribosomal RNA genes in relation to the size of their genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 136 (3): 1136-1141.
- Bermejo, A., H. Veeken, & A. Berra. 1992. Tuberculosis incidence in developing countries with high prevalence of HIV infection. *AIDS* 6: 1203-1206.
- Bernabé, A., M.A. Gómez, J.A. Navarro, S. Gómez, J. Sánchez, J. Sidrach, & V. Menchén. 1991. Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Research* 5 (4): 377-390.
- Beroldingen, C.H., Higuchi von R.G., G.H. Senssabaugh, & H.A. Erlich. 1987. Analysis of enzymatically amplified HLA-DQ DNA from single hairs. *American Journal of genetics* 41: 725.
- Bhargava, S., A. K. Tyagi, & J. S. Tyagi. 1990. tRNA genes in mycobacteria: Organization and molecular cloning. *Journal of Bacteriology* 172 (6): 2930-2934.
- Black, H. 1972. The association of tuberculosis in man with a recurrent infection in a dairy herd. *New Zealand Veterinary Journal* 20: 14-15.
- Blancou, J.M. 1972. Comparaison des techniques pratiques pour le diagnostic de la tuberculose bovine. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*. 25: 29-35.
- Bloom, B.R. 1992. Back to a frightening future. *Nature* 358: 538-539.
- Bloom, B.R., & C.J.L. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257: 1055-1062.

- Böddinghaus, B., T. Rogall, T. Flohr, H. Blücker, & E.C. Büttger. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (8): 1751-1759.
- Bojalil, L. F., J. Cerbón, & A. Trujillo. 1962. Adansonian classification of mycobacteria. *Journal of General Microbiology* 28: 333-346.
- Bönicke, R. 1962. Report on identification of mycobacteria by biochemical methods. *Bulletin of the International Union against Tuberculosis* 32: 13-68.
- Borremans, M., L. de Wit, G. Volckaert, J. Ooms, J. De Bruyn, K. Huygrn, J.P. Van Vooren, M. Stelandre, R. Verhofstadts, & J. Content. 1989. Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 57 (10): 3123-3130.
- Bothamley, G.H., J.S. Beck, G.M.Th. Schreuder, J. D'Amaro, R.R.P. De Vries, T. Kardjito, & J. Ivanyi. 1989. Association of tuberculosis and *M. tuberculosis*-specific antibody levels with HLA. *Journal of Infectious Diseases* 159: 549-555.
- Bouvet, E., E. Casalino, G. Mendoza-Sassi, S. Lariven, E. Vallee, M. Pernet, S. Gottot, & F. Vachon. 1993. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV infected patients. A case-control study. *AIDS* 7: 1453-1460.
- Bouvier, G., H. Burgisser, & P.A. Schneider. 1957. Observations sur les maladies du gibier, des oiseaux et des poissons faites en 1955 et 1956. *Schweiz Arch. Tierheilk. D.* 99: 461-477.
- Bowles, J. A., & W. Segal. 1965. Kinetics of utilization of organic compounds in the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology* 90: 157-163.
- Bradley, S. G. 1972. Reassociation of DNA from selected mycobacteria with that of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium farcinica*. *American Review of Respiratory Diseases* 106: 122-124.
- Bradley, S. G. 1973. Relationships among mycobacteria and nocardiae based upon deoxiribonucleic acid reassociation. *Journal of Bacteriology* 113: 645-651.

- Breed, R. S., E. G. D. Murray, & N. R. Smith. 1957. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. 7th. ed. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- Brisson-Noel, A., C. Aznar, C. Chureau, S. Nguyen, C. Pierre, M. Bartoli, R. Bonete, G. Pialoux, B. Gicquel, & G. Garrigue. 1991. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *The Lancet* 338 (August 10): 364-366.
- Brown, A.E., T.J. Holzer, & B.R. Andersen. 1987. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Infectious Diseases* 156: 985-989.
- Buck, G.E., L.C. O'Hara, & J.T. Summersgill. 1992. Rapid, simple method for treating clinical specimens containing *Mycobacterium tuberculosis* to remove DNA for Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (5): 1331-1334.
- Buddle, B.M., F.E. Aldwell, A. Pfeffer, G.W. de Lisle, & L.A. Corner. 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection in cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune responses and distribution of lesions. *New Zealand Veterinary Journal* 42: 167-172.
- Buddle, B.M., F.E. Aldwell, & D.N. Wedlock. 1995. Vaccination of cattle and possums against bovine tuberculosis. Second International *Mycobacterium bovis* conference, Dunedin, New Zealand.
- Butler, W.R., S.P. O'Connor, M.A. Yakrus, & W.M. Gross. 1994. Cross-reactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species of *Mycobacterium celatum*. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (2): 536-538.
- Caffrey, J. P. 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Veterinary Microbiology* 40: 1-4.
- Calmette, A. 1936. *L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux*. Edited by A. Boquet and L. Negre. Paris: Masson.
- Calmette, H., & C. Guerin. 1908. Sur quelques propriétés du bacille tuberculeux cultivé sur la bille. *C. R. Acad. Sci.* 147: 1456-1459.

- Cancilla, M.R., I.B. Powell, A.J. Hillier, & B.E. Davidson. 1992. Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with 32P and fluorescent labels. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1773-1775.
- Carleton, H. M. 1967. *Carleton's Histological Technique*. 4th ed. New York: Oxford University Press.
- Carmichael, J. 1939. Bovine tuberculosis in the tropics with special reference to Uganda. Part I. *Journal of Comparative Pathology* 52: 322-335.
- Carmichael, J. 1941. Bovine tuberculosis in the propics with special reference to Uganda part II. *Journal of Comparative Pathology* 97: 329-339.
- Castets, M., N. Rist, & H. Boisvert. 1969. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Médecine à l'Afrique Noire* 16: 321-322.
- Cave, M.D., K.D. Eisenach, P.F. McDernott, J.H. Bates, & J.T. Crawford. 1991. IS6110: conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mollecular and Cellular Probes* 5: 73-80.
- Centers for Disease Control. 1982. Tuberculosis control. *Tubercle* 63: 157-169.
- Cetrangolo, A. 1971. Tuberculosis humana provocada por *Mycobacterium bovis*. *Anatomía Patológica Clínica* 30: 84-88.
- Chan, J., X. Fan, S.W. Hunter, P.J. Brennan, & B.R. Bloom. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infection and Immunity* 59: 1755-1761.
- Chaussé, P. 1913. Des méthodes à employer pour réaliser la tuberculose expérimentale par inhalation. *Bulletin de la Société de Médecine Vétérinaire*. 31: 267-274.
- Cheneau, Y., & J. Blancou. 1975. Valeurs comparées du BCG vivant ou tué et du bacille de Koch trypsiné dans l'immunisation des zébus contre la tuberculose. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.* 28: 1-7.

- Choi, C.S., & A.J. Frost. 1984. Specificity of purified protein derivatives extracts from ten species of mycobacteria killed with phenol in the haemagglutination and haemagglutination inhibition test. *Veterinary Microbiology* 9: 301-308.
- Clarridge III, J.E., R.M. Shawar, T.M. Shinnick, & B.B. Plikaytis. 1993. Large-scale use of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *Journal of clinical Microbiology* 31 (8): 2049-2056.
- Clifton-Hadley, R.S., & J.W. Wilesmith. 1991. Tuberculosis in deer: a review. *The Veterinary Record* 129 (1): 5-12.
- Coates, A.R.M., B.W. Allen, J. Hewitt, & J. Ivanyi. 1981. Antigenic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* detected by means of monoclonal antibodies. *The Lancet* 2: 167-169.
- Cobbett, L. 1917. *The causes of tuberculosis: together with some account of the prevalence and distribution of the disease*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cocito, C., & F. Vanlinden. 1986. Preparation and properties of antigen 60 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Clinical and Experimental Immunology* 66: 262-272.
- Cohn, M.L., R.F. Waggoner, & J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *American Review of Respiratory Disease* 98: 295-296.
- Colditz, G.A., T.F. Brewer, K.S. Berkey, M.E. Wilson, E. Burdick, H.V. Fineberg, & F. Mosteller. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *Journal of the American Medical Association* 271 (9): 698-702.
- Coletsos, P. J. 1971. Isolation des mycobacteries. *Reviste de Tuberculose et Pneumologie* 35: 601-616.
- Collins, C.H., & M.D. Yates. 1981. A study of bovine strains of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from humans in south-east England, 1977-1979. *Tubercle* 62: 113-116.
- Collins, C.H., & M.D. Yates. 1982. Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into 5 variants for epidemiological purposes: methods and nomenclature. *Journal of Hygiene, Cambridge* 89: 235-242.

- Collins, C.H., & J.M. Grange. 1983. The bovine tubercle bacillus. *Journal of Applied Bacteriology* 55: 13-29.
- Collins, D.M., & G.W. de Lisle. 1984. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of General Microbiology* 130: 1019-1021.
- Collins, D.M., & G.W. de Lisle. 1985. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *M. tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 21 (4): 562-564.
- Collins, D.M., G.W. de Lisle, & D.M. Gabric. 1986. Geographic distribution of restriction types of *Mycobacterium bovis* isolates from brush-tailed possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand. *Journal of Hygiene, Cambridge* 96: 431-438.
- Collins, C.H., & J.M. Grange. 1987. Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* infection. *Irish Veterinary Journal* 41: 363-366.
- Collins, D.M., & G.W. de Lisle. 1987. BCG identification by DNA restriction fragment patterns. *Journal of General Microbiology* 133: 1431-1434.
- Collins, D.M., D.M. Gabric, & G.W. de Lisle. 1988. Typing of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and other animals in the same locality. *New Zealand Veterinary Journal* 36: 45-46.
- Collins, D.M., & D.M. Stephens. 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiology Letters* 83 (1): 11-16.
- Collins, D.M., S.K. Erasmuson, D.M. Stephens, G.F. Yates, & G.W. de Lisle. 1993. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (5): 1143-1147.
- Cordes, D.O., J.A. Bullians, D.E. Lake, & M.E. Carter. 1981. Observations on tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in sheep. *New Zealand Veterinary Journal* 29: 60-62.

- Cormican, M.G., T. Barry, F. Gannon, & J. Flynn. 1992. Use of Polymerase Chain Reaction for early identification of *Mycobacterium tuberculosis* in positive cultures. *Journal of Clinical Pathology* 45: 601-604.
- Corner, L.A., & C.W. Pearson. 1978. Response of cattle to inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. *Australian Veterinary Journal* 54: 379-382.
- Corner, L.A., M. John, P.G. Bundesen, & P.R. Wood. 1988. Identification of *Mycobacterium bovis* isolates using a monoclonal antibody. *Veterinary Microbiology* 18: 191-196.
- Corner, L.A., & A.C. Trajstman. 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Veterinary Microbiology* 18: 127-134.
- Corner, L.A. 1989. Bovine tuberculosis. Pathology and bacteriology. In *Australian Standard Diagnostic Techniques for Animal Diseases.*: CSIRO, Australian Agricultural Council.
- Corner, L.A., L. Melville, K. McCubbin, K.J. Small, B.S. McCormick, P.R. Wood, & J.S. Rothel. 1990. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67: 389-392.
- Corner, L.A., A.C. Trajstman, & K. Lund. 1995. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zealand Veterinary Journal* 43: 129-133.
- Corper, H.J., & N. Vyei. 1930. Oxalic acid as a reagent for isolating tubercle bacilli and a study of the growth of acid-fast non-pathogens on different mediums with their reactions to chemical reagents. *J. Lab. Clin. Med.* 15: 348.
- Cousins, D.V. 1987. ELISA for detection of tuberculosis in seals. *The Veterinary Record* 121: 305.
- Cousins, D.V., B.R. Francis, & B.L. Gow. 1989. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 20: 89-95.

- Cousins, D.V., B.R. Francis, B.L. Gow, D.M. Collins, C.H. McGlashan, A. Gregory, & R.M. MacKenzie. 1990. Tuberculosis in captive seals: bacteriological studies on an isolate belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Research in Veterinary Science* 48: 196-200.
- Cousins, D.V., S.D. Wilton, & B.R. Francis. 1991. Use of DNA amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 27: 187-195.
- Cousins, D.V., S.D. Wilton, B.R. Francis, & B.L. Gow. 1992. Use of Polymerase Chain Reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (1): 255-258.
- Cousins, D.V., S.N. Williams, R. Reuter, D. Forshaw, D. Chadwick, D. Coughran, P. Collins, & N. Gales. 1993a. Tuberculosis in wild seals and characterisation of the seal bacillus. *Australian Veterinary Journal* 70 (3): 92-97.
- Cousins, D.V., S.N. Williams, B.C. Ross, & T.M. Ellis. 1993b. Use of a repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridisation studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 37 (1-2): 1-17.
- Cousins, D.V., B.R. Francis, R. Casey, & C. Mayberry. 1993c. *Mycobacterium bovis* infection in a goat. *Australian Veterinary Journal* 70 (7): 262-263.
- Cousins, D.V., R.L. Peet, W.T. Gaynor, S.W. Williams, & B.L. Gow. 1994. Tuberculosis in hyrax (*Procavia capensis*) caused by an unusual variant belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology* .
- Crawford, J., & J.H. Bates. 1984. Phage typing of mycobacteria. In *The Mycobacteria: A sourcebook Part A*, edited by G. P. Kubica and L. G. Wayne. Ney York: Marcel Dekker, Inc.
- Crowle, A. 1991. Evidence that vesicles containing living virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infection and Immunity* 59: 1823-1831.
- Cutbill, L. T., & A. Lynn. 1944. Pulmonary tuberculosis of bovine origin. *British Medical Journal* i: 283-285.

- Damato, J.J., & M.T. Collins. 1990. Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media. *Veterinary Microbiology* 22 (1): 31-42.
- Daniel, T.M., & P.A. Anderson. 1978. The isolation by immunoabsorbent affinity chromatography and physiochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *American Review of Respiratory diseases* 117: 533-539.
- Danneberg, A.M.Jr. 1989. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Review of Infectious Diseases* 2 (Supp. 2): 5369-5478.
- Das, S., S.L. Chan, B.W. Allen, D.A. Mitchison, & D.B. Lowrie. 1993. Application of DNA fingerprinting with IS986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary in Hong Kong before, during and after short course chemotherapy. *Tubercle and Lung Diseases* 74: 47-51.
- David, H.L., M.T. Jahan, A. Jumin, J. Grandry, & E.H. Lehman. 1978. Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28 (4): 467-472.
- Davies, P.D., M.J. Humphries, & S.P. Byfield. 1984. Bone and joint tuberculosis. A survey of notifications in England and Wales. *Journal of Bone and Joint Surgery* 60: 326-330.
- Davis, B. D., & R. J. Dubos. 1946. Interaction of serum albumin, free and esterified oleic acid and lipase in relation to cultivation of the tubercle bacillus. *Archives of Biochemistry* 11: 201-203.
- Davis, B. D., & R. J. Dubos. 1947. The binding of fatty acids by serum albumine, a protective growth factor in bacteriological media. *Journal of Experimental Methods* 86: 215-228.
- Dawson, D.J. 1990. Tuberculosis in Australia: an unfinished fight. *The Medical Journal of Australia* 154: 75-76.
- De Bruyn, J., R. Bosmans, J. Nyabenda, & J.P. Van Vooren. 1989. Effect of zinc deficiency on the appearance of two immunodominant protein antigens (32-kDa and 65-kDa) in culture filtrates of mycobacteria. *Journal of General Microbiology* 135: 7984.

- De Jongh, H., & M.O. Ekdahl. 1969. Evaluation of a number of ancillary tuberculin tests in cattle. *New Zealand Veterinary Journal* 17 (11): 213-226.
- De Kantor, I.N., A.C. Odeon, P.E. Steffan, M.J. Auza, C.R. Madrid, & N. Marchevsky. 1984. Sensitivity of the cervical and caudal fold tests with *Mycobacterium bovis* in infected cattle in Argentina. *Review of Science and Technology of the O.I.E.* 3: 137-150.
- De Kantor, I.N., L. Barrera, V. Ritacco, & I. Miceli. 1991. Utilidad del enzimoimmunoensayo en el diagnóstico de la tuberculosis. *Boletín Oficial Sanitario de Panamá* 110: 461-470.
- De Kantor, I.N., & V. Ritacco. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Veterinary Microbiology* 40: 5-14.
- De Lisle, G.W., D.M. Collins, A.S. Loveday, W.A. Young, & A.F. Julian. 1990. A report of tuberculosis in cats in New Zealand, and the examination of strains of *Mycobacterium bovis* by DNA restriction endonuclease analysis. *New Zealand Veterinary Journal* 38: 10-13.
- De Lisle, G.W., B.J. Wards, D.M. Collins, & G.F. Yates. 1995. The postmortem diagnosis of mycobacterial infections. Second international *Mycobacterium bovis* Conference, Dunedin, New Zealand.
- De Wit, D., L. Steyn, S. Shoemaker, & M. Sogin. 1990. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by DNA amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (11): 2437-2441.
- Del Portillo, P., L.A. Murillo, & M.E. Patarryo. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (10): 2163-2168.
- Denis, M. 1991. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitron. *Clinical and Experimental Immunology*. 84: 200-206.

- Dienna, B. B., H. Yugi, R. Wallace, Y. Carriene, & L. Greenberg. 1968. The bentonite flocculation test in the serology of tuberculosis. Purification of BCG antigens. *Canadian Journal of Microbiology* 14: 881-885.
- Domingo, M., E. Liébana, J. Carrera, M. Vilafranca, J. Casal, A. Aranaz, J. Altimira, D. Vidal, A. Marco, J.M. Planell, A. Mateos, & L. Domínguez. 1995a. Eficacia comparativa de la intradermoreacción y de la prueba de liberación de gamma interferón para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo. *Medicina Veterinaria* 12 (5): 307-317.
- Domingo, M., E. Liébana, M. Vilafranca, A. Aranaz, D. Vidal, N. Prats, A. Mateos, J. Casal, & L. Domínguez. 1995b. A field evaluation of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test in dairy cattle in Spain. Second international *Mycobacterium bovis* conference, Dunedin, New Zealand.
- Doran, T.J., A.L.M. Hodgson, J.K. Davies, & A.J. Radford. 1993. Characterization of a highly repetitive DNA sequence from *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiology Letters* 111: 147-152.
- Dowling, L.A., & S.M. Schleeauf. 1991. Specific antibody responses to *Mycobacterium bovis* in infected cattle analysed with six mycobacterial antigens in enzyme-linked immunosorbent assays. *Research in Veterinary Science* 50: 157-161.
- Drake, T.A., J.A. Hindler, O.G.W. Berlin, & D.A. Bruckner. 1987. Rapid identification of *Mycobacterium avium* complex in culture using DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology* 25: 1442-1445.
- Draper, P. 1982. *The anatomy of mycobacteria*. In *The Biology of the Mycobacteria*. Edited by C. Ratledge and J.L. Stanford. London: Academic Press.
- Dubos, R. J., & G. Middlebrook. 1947. Media for tubercle bacilli. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases* 56: 334-345.
- Duffield, B.J. 1990. The development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 24 (2): 205-209.

- Dwyer, B., K. Jackson, K. Raios, A. Sievers, E. Wilshire, & B. Ross. 1993. DNA restriction fragment analysis to define an extended cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. *The Journal of Infectious Diseases* 167: 490-494.
- Edlin, B.R., J.I. Tokars, M.H. Grieco, J.T. Crawford, J. Williams, E.M. Sordillo, K.R. Ong, J.O. Kilburn, S.W. Dooley, K.G. Castro, W.R. Jarvis, & S.D. Holmberg. 1992. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *New England Journal of Medicine* 326: 1514-1521.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde, & E.C. Bottger. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 17 (19): 7843-7853.
- Eisenach, K.D., J.T. Crawford, & J.H. Bates. 1988. Repetitive DNA sequences as probes for *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 26 (11): 2240-2245.
- Eisenach, K.D., M.D. Cave, J.H. Bates, & J.T. Crawford. 1990. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Diseases* 161: 977-981.
- Eisenach, K.D., M.D. Sifford, M.D. Cave, J.H. Bates, & J.T. Crawford. 1991. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using polymerase chain reaction. *American Review of Respiratory Diseases* 144: 1160-1163.
- Ellner, J.J., & R.S. Wallis. 1989. Immunologic aspects of mycobacterial infections. *Review of Infectious Diseases* 2: 455-459.
- Elsabban, M. S., O. Lofty, W. M. Awad, H. S. Soufi, D. G. Mikhail, D. G. Hammam, R. A. Dimitri, & S. M. Gergis. 28-30 April 1992. Bovine tuberculosis and its extent of spread as a source of infection to man and animals in Arab Republic of Egypt. IUATLD Conference on Animal Tuberculosis in Africa and The Middle East, El Cairo, Egypt.
- Elwood, D.C., & F.G. Waddington. 1972. A second experiment to challenge the resistance to tuberculosis in BCG vaccinated cattle in Malawi. *British Veterinary Journal* 128: 619-629.

- Esaguy, N., A.P. Aguas, J.D.A. Van Embden, & M.T. Silva. 1991. Mycobacteria and human autoimmune disease: direct evidence of cross-reactivity between human lactoferrin and the 65-kilodalton protein of tubercle and leprosi bacilli. *Infection and Immunity* 59 (3): 1117-1125.
- Essey, M. A., & M. A. Koller. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. *Veterinary Microbiology* 40: 15-22.
- Falla, J.C., C.A. Parra, M. Mendoza, L.C. Franco, F. Guzmán, J. Forero, O. Orozco, & M.E. Patarroyo. 1991. Identification of B- and T-cell epitopes within the *mtp40* protein of *Mycobacterium tuberculosis* and their correlation with the disease course. *Infection and Immunity* 59: 2265-2273.
- Fanning, A., & S. Edwards. 1991. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaphus*) in Alberta, Canada. *The Lancet* 338 (Nov 16): 1253-1255.
- Fauville-Dufaux, M., B. Vanfleteren, L. Dewit, J.P. Vincke, J.P. Van Vooren, M.D. Yates, E. Serruys, & J. Content. 1992. Rapid detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria by Polymerase Chain Reaction amplification of a 162 bp DNA fragment from antigen 85. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11: 797-803.
- Fifis, T., P. Plackett, L.A. Corner, & P.R. Wood. 1989. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 29: 91-101.
- Fifis, T., C. Costopoulos, L.A. Corner, & P.R. Wood. 1992. Serological reactivity to *Mycobacterium bovis* protein antigens in cattle. *Veterinary Microbiology* 30: 343-354.
- Fine, P.E.M., & L.C. Rodrigues. 1990. Modern vaccines: mycobacterial diseases. *The Lancet* 335: 1016-1021.
- Fischl, M.A., R.B. Uttamchandani, & G.L. Daikos. 1992. An outbreak of tuberculosis caused by multiple-drug resistant tubercle bacilli among patients with HIV infection. *Ann. Intern. Med.* 117: 177-183.
- Fleming, G. 1875. *A manual of veterinary sanitary science and policy*. 2. London.

- Flesh, I., & S.H.E. Kaufmann. 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology* 138: 4408-4413.
- Folgueira, L., R. Delgado, E. Palenque, & A.R. Noriega. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical samples by using a simple lysis method and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (4): 1019-1021.
- Francis, J. 1947. *Bovine tuberculosis including a contrast with human tuberculosis*. London: Staples Press Ltd.
- Francis, J. 1958. *Tuberculosis in animals and man. A study in comparative pathology*. London: Cassell.
- Francis, J., R.J. Seiler, I.W. Wilkie, D. O'Boyle, M.J. Lumsden, & A.J. Frost. 1978. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD tuberculin. *The Veterinary Record* 103: 420-435.
- Fröthingham, R., H. G. Hills, & K. H. Wilson. 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (7): 1639-1643.
- Gaillard, J.L., P. Berche, & P. Sansonetti. 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocitogenes*. *Infection and Immunity* 52: 50-55.
- Gallagher, J., & D.M. Horwill. 1977. A selective oleic acid albumin agar medium for the cultivation of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Hygiene, Cambridge* 79: 155-160.
- García, R.J., L. Hellquist, R. Booth, A. Radford, W. Britton, L. Atsburry, R. Trent, & A. Basten. 1989. Homology of the 70-kilodalton antigens from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* with the *Mycobacterium tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infection and Immunity* 57: 204-212.
- Gerney-Rieuse, C.H., & A. Tacquet. 1952. Les reactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditiones dans la tuberculose. *Adv. Tuberc. Res.* 5: 66-151.

- Ghossein, R.A., D.G. Ross, R.N. Salomon, & A.R. Rabson. 1992. Rapid detection and species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Diagnostic Molecular Pathology* 1 (3): 185-191.
- Gilmour, N.J.L., & K.W. Angus. 1976. The specificity and sensitivity of the fluorescent antibody test in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium johnei*. *Research in Veterinary Science* 20: 6-9.
- Glennon, M., T. Smith, M. Cormican, D. Noone, T. Barry, M. Maher, M. Dawson, J.J. Gilmartin, & F. Gannon. 1994. The ribosomal intergenic spacer region: a target for the PCR based diagnosis of tuberculosis. *Tubercle and Lung Disease* 75: 353-360.
- Gómez-Mampaso, E., E. Palenque, M. Sánchez, M.J. Rivera, F. De la Torre, E.A. Gonzalez, G. Ladrón, R. Silvestre, M.J. March, & A. Ortega. 1991. Detección de anticuerpos IgG frente al antígeno 60 para el diagnóstico de la tuberculosis humana: resultados de un estudio multicéntrico. *Revista Española de Microbiología Clínica* 6 (9): 456-463.
- González, R., & B.A. Hanna. 1987. Evaluation of Gene-Probe DNA hybridization systems for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium intracellulare*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 8: 69-77.
- Goodfellow, M., & L.G. Wayne. 1982. *Taxonomy and nomenclature*. In *The Biology of the Mycobacteria*. Edited by C. Rarledge and J.L. Stanford. London: Academic Press.
- Goria, M., A. Dondo, M. Amadori, E. Lodetti, G. Bellan, & L. Nicolandi. 1993. Diagnosi di infezione tubercolare nel bovino: stimolazione della reazione immunitaria cellulo-mediata in vitro mediante preparazioni diverse di tubercolina PPD. XLVII National Congress of the Italian Society for Veterinary Sciences, Riccione, Italia.
- Goto, M., S. Oka, K. Okozumi, S. Kimura, & K. Shimada. 1991. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 2473-2476.

- Grange, J. M. 1979. The changing tubercle. *British Journal Hospital Medicine* 22: 540-548.
- Grange, J.M. 1985. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiological Reviews* 32: 55-60.
- Gray, M.W., D. Sankoff, & R.J. Cedargreen. 1984. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structure core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research* 12: 5837-5852.
- Griffin, J.F.T., S. Nagai, & G.S. Buchan. 1991. Tuberculosis in domesticated red deer: comparison of purified protein derivative and the specific protein MPB70 for in vitro diagnosis. *Research in Veterinary Science* 50 (3): 279-285.
- Griffith, A.S. 1914. Further investigations of the type of tubercle bacilli occurring in the sputum of phthisical persons. *British Medical Journal* 1: 1171-75.
- Grmek, M. D. 1983. *Les maladies à l'aube de la civilisation occidentale*. Paris: Payot.
- Groenen, P.M.A., A.E. Bunschoten, D. Van Sooligen, & J.D.A. Van Embden. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application of strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology* 10 (5): 1057-1065.
- Gross, W.M., & J.E. Hawkins. 1985. Radiometric selective inhibition tests for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, and other mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 21: 565-568.
- Gutiérrez, M. & J.F. García-Marín. 1993. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *Journal of Comparative Pathology* 109: 361-370.
- Gutiérrez, M., S. Samper, J.A. Gavigan, J.F. García-Marín, & C. Martín. 1995. Differentiation by molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains causing tuberculosis in cattle and goats. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (11): 2953-2956.

- Haagsma, J, & A. Eger. 1990. ELISA for diagnosis of tuberculosis and chemotherapy in zoo and wildlife animals. Proceedings American Association of Zoo Veterinarians.
- Habib, N.I., & F.C. Jr. Warring. 1966. A fatal case of infection due to *Mycobacterium bovis*. *American Review of Respiratory Disease* 93: 804-810.
- Hahn, H., & S.H.E. Kaufmann. 1981. Role of cell-mediated immunity in bacterial infections. *Review of Infectious Diseases* 3: 1221-1250.
- Hance, A.J., B. Grandchamp, V. Levy-Fr ebault, D. Lecossier, J. Rauzier, D. Bocart, & B. Gicquel. 1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Molecular Microbiology* 3 (7): 843-849.
- Hanna, J., S.D. Neill, & J.J. O'Brien. 1989. Use of PPD and phosphatide antigens in an ELISA to detect the serological response in experimental bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 47 (1): 43-47.
- Hanna, J., S.D. Neill, & J.J. O'Brien. 1992. ELISA tests for antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 31 (2): 243-249.
- Hansen, G. A. 1874. Undersogelser angaaende spedal skhadens arsager. *Norsk Magazin BR Laegevidenskahen* 4: 1-88.
- Harada, K. 1976. The nature of mycobacterial acid fastness. *Stain Technology* 51: 255-260.
- Harboe, M., & S. Nagai. 1984. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *American Review of Respiratory Disease* 129: 444-452.
- Harboe, M., S. Nagai, M.E. Patarroyo, M.L. Torres, C. Ramirez, & N. Cruz. 1986. Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 52: 293-302.
- Harboe, M., H.G. Wiker, J.R. Duncan, M.M. Garcia, T.W. Dukes, B.W. Brooks, C. Turcotte, & S. Nagai. 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (5): 913-921.

- Havlir, D.V., J.J. Ellner, K.A. Chervenak, & W.H. Boom. 1991. Selective expansion of human gamma/delta T-cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Investigation* 87: 729-733.
- Hein, W.R., & A.A. Tomasovic. 1981. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. *Australian Veterinary Journal* 57: 543-547.
- Hein, W.R., & C.R. Mackay. 1991. Prominence of gamma/delta T-cells in the ruminant immune system. *Immunology Today* 12: 30-34.
- Hermans, P.W.M., A.R.J. Schuitema, D. Van Soolingen, C.P.H.J. Verstynen, E.M. Bik, J.E.R. Thole, A.H.J. Kolk, & J.D.A. Van Embden. 1990a. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (6): 1204-1213.
- Hermans, P.W.M., D. van Soolingen, J.W. Dale, A.R.J. Schuitema, R.A. McAdam, D. Catty, & J.D.A. Van Embden. 1990b. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis*: a useful tool for the diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (9): 2051-2058.
- Hermans, P.W.M., D. Van Soolingen, E.M. Bik, P.E.W. de Haas, J.W. Dale, & J.D.A. Van Embden. 1991. The insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infection and Immunity* 59: 2695-2705.
- Hermans, P.W.M., D. Van Soolingen, & J.D.A. Van Embden. 1992. Characterization of a major polymorphic tandem repeat in *Mycobacterium tuberculosis* and its potential use in the epidemiology of *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium goodii*. *Journal of Bacteriology* 174 (12): 4157-4165.
- Hewinson, R. G., & W. P. Russell. 1993. Processing and secretion by *Escherichia coli* of a recombinant form of the immunogenic protein MPB70 of *Mycobacterium bovis*. *Journal of General Microbiology* 139: 1253-1259.
- Horwitz, B. M., & R. Gultiz. 1974. A simple method for the primary isolation of *Mycobacterium* in a carbon dioxide atmosphere. *South-African Medicine Journal* 48: 1949-1950.

- Huebner, R.E., R.C. Good, & J.I. Tokars. 1993. Current practices in mycobacteriology: results of a survey of public health laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (4): 771-775.
- Huitema, H., & F.H.J. Jaartsveld. 1967. *Mycobacterium microti* infection in a cat and some pigs. *Antonie van Leeuwenhoek* 33: 209-212.
- Huitema, H. 1969. The eradication of bovine tuberculosis in cattle in the Netherlands and the significance of man as a source of infection for cattle. *The Royal Netherlands Tuberculosis Association* 12: 62-67.
- Huitema, H. 1988. Tuberculosis in animals and man with attention to reciprocal transmission of mycobacterial infections and the successful eradication of bovine tuberculosis in cattle in The Netherlands. The Hague: Royal Netherlands Tuberculosis Association.
- Imaeda, T., F. Kanetsuna, & B. Galindo. 1968. Ultrastructure of cell walls of genus *Mycobacterium*. *Journal of Ultrastructure Research* 25: 46-63.
- Imaeda, T. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 35 (2): 147-150.
- Jarnagin, J.L., P.J. Brennan, & S.K. Harris. 1983. Rapid identification of *Mycobacterium bovis* by a thin-layer chromatographic technique. *American Journal of Veterinary Research* 44 (10): 1920-1921.
- Jenkins, P. A. 1981. Lipid analysis for the identification of mycobacteria: an appraisal. *Review of Infectious Diseases* 3: 862-866.
- Jenkins, P. A., S.R. Pattyn, & F. Portaels. 1982. *Diagnostic bacteriology*. In *The Biology of Mycobacteria*. Edited by C. Ratledge and J. L. Stanford. London: Academic Press.
- Jensen, K. A. 1932. Reinzüchtung und Typenbestimmung von Tuberkelbazillenstämmen. *Zbl. für Bakteriologie* 125: 22.

- Jones, S.L., J.C. Cox, J.M. Shepherd, J.S. Rothel, P.R. Wood, & A.J. Radford. 1992. Removal of false-positive reactions from plasma in an enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma. *Journal of Immunological Methods* 155: 233-240.
- Jubb, K. V. F., & P. C. Kennedy. 1970. *Tuberculosis*. 2nd ed. Vol. 1, *Pathology of domestic animals*. New York and London: Academic Press.
- Kabelitz, D., A. Bender, S. Schondelmaier, B. Schoel, & S.H.E. Kaufmann. 1990. A large fraction of human peripheral blood gamma/delta T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65 kDa heat shock protein. *Journal of Experimental Medicine*. 171: 667-679.
- Kadival, G.V., & S.D. Chaparas. 1987. Production, characterization, and species specificity of five monoclonal antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 25 (1): 76-80.
- Kadival, G.V., S.D. Chaparas, & D. Hussong. 1987. Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Immunology* 139 (7): 2447-2451.
- Karlson, A. G. 1940. The comparative values of certain media for the isolation of bovine tubercle bacilli. *Journal of Infectious Diseases* 67: 1-4.
- Karlson, A.G., & E.F. Lessel. 1970. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 20: 273-282.
- Kataria, Y.P. 1969. Observations on human infection with *Mycobacterium bovis*. *Tubercle* 50: 14-21.
- Kaufmann, S.H.E. 1988. CD8+ T lymphocytes in intracellular microbial infections. *Immunology Today* 9: 168-174.
- Kaufmann, S.H.E. 1989. In vitro analysis of the cellular mechanisms involved in immunity to tuberculosis. *Review of Infectious Diseases* 11 (supp 2): S448-S454.
- Kaufmann, S.H.E. 1990. Immunity to mycobacteria. *Research in Microbiology* 141: 765-768.

- Kaufmann, S.H.E., & J.D.A. van Embden. 1993. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. *Trends in Microbiology* 3 (1).
- Kent, L., T.D. McHugh, O. Billington, J.W. Dale, & S.H. Gillespie. 1995. Demonstration of homology between IS6610 of *Mycobacterium tuberculosis* and DNAs of other *Mycobacterium* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (9): 2290-2293.
- Kerr, W.R., H.G. Lamont, & J.L. McGirr. 1946. Studies on tuberculin sensitivity in the bovine. *Veterinary Record* 58: 451-453.
- Ketterer, P.J., R.J. Rogers, & B. Donald. 1981. Pathology and tuberculin sensitivity in cattle inoculated with *Mycobacterium avium* complex serotypes 6, 14 and 18. *Australian Veterinary Journal* 57: 61-65.
- Koch, R. 1882. Die aetiologie der tuberculose. *Berliner Klinische Wochenschrift* 19: 221-230.
- Kolk, A.H.J., A.R.J. Schuitema, S. Kuijper, J. Van Leeuwen, P.W.M. Hermans, J.D.A. Van Embden, & R.A. Hartskeerl. 1992. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (10): 2567-2575.
- Konno, K. 1956. New chemical method to differentiate human type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Science* 124: 985.
- Konno, K., F. M. Feldman, & W. McDermott. 1967. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *American Review of Respiratory Diseases* 95: 461-469.
- Kotani, S., T. Kitaura, T. Hirano, & S. Tanaka. 1959. Isolation and chemical composition of the cell walls of BCG. *Biken Journal* 2: 129-142.
- Krasnow, I., & G.C. Kidd. 1965. The effect of a buffer wash on sputum sediments digested with Zephiran trisodium phosphate on the recovery of acid-fast bacilli. *American Journal of Clinical Pathology* 44: 238-246.

- Krasnow, I., & L.G. Wayne. 1966. Sputum digestion. I. The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 352-355.
- Kubica, G.P., W.E. Dye, M.L. Cohn, & G. Middlebrook. 1963. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *American Review of respiratory diseases* 87: 775-779.
- Kwok, S., D.H. Mack, K.B. Mullis, B. Poiesz, G. Erlich, A. Blair, A. Freidman-Kein, & J.J. Sninsky. 1987. Identification of human immunodeficiency virus sequences by in vitro enzymatic amplification and oligimer cleavage detection. *Journal of Virology* (1690-1694).
- Leake, E.S., Q.N. Myrvik, & M.J. Wright. 1984. Phagosomal membranes of *Mycobacterium bovis* BCG-immune alveolar macrophages are resistant to disruption by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Infection and Immunity* 45: 443-446.
- Lebrun, L., F. Espinasse, J.D. Poveda, & V. Vincent-Levy-Fr ebault. 1992. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (9): 2476-2478.
- Lehmann, K.B., & R. Neumann. 1896. Lehmann's Medezin Handatlaten band X. In Atlas und Grundiss der Bakteriologie und Lehrbuch der speciellen bakteriologischen Diagnostik, Teil II. Munchen: Lehmann J.F. Verlag.
- Lehmann, K.B., & R. Neumann. 1907. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. Munchen: Lehmann J F Verlag.
- Lehmann, P.F., D. Lin, & B.A. Lasker. 1992. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (12): 3249-3254.
- Lenzini, L., P. Rottoli, & L. Rottoli. 1977. The spectrum of human tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology* 27: 230-237.

- Lepper, A.W.D., C.W. Pearson, & P.M. Outerridge. 1973. Assessment of the bentonite flocculation test for detecting tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal* 49: 445-450.
- Lepper, A.W.D., & C.W. Pearson. 1975. The indirect fluorescent antibody test for the detection of circulating antibodies in bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 51: 256-261.
- Lepper, A.W.D., L.A. Corner, & C.W. Pearson. 1977. Serological responses in experimental bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 53: 301-305.
- Lepper, A.W.D., M.T. Carpenter, O.J. Williams, W.A. Scanlan, D.R. McEwan, L.G. Andrews, T.R. Thomas, & L.A. Corner. 1979a. Comparison of the efficiency of two doses of bovine PPD tuberculin in single caudal fold tests on Australian cattle. *Australian Veterinary Journal* 55: 251-256.
- Lepper, A.W.D., D.J. McKay, & V. Lord. 1979b. Comparison of the efficiency of 4 doses of bovine PPD tuberculin in cattle and guinea pigs: recommendations for the most suitable dose for use in the single caudal fold test in cattle. *Australian Veterinary Journal* 55: 507-509.
- Lepper, A.W.D., & L.A. Corner. 1983. *Naturally occurring mycobacterioses of animals*. In *The Biology of the Mycobacteria: Immunological and Environmental Aspects Vol 2*. Edited by C. Ratledge and J. Stanford. London Academic Press.
- Lesslie, I.W., K.J. Birn, P. Stuart, P.A.F. O'Neill, & J. Smith. 1968. Tuberculosis in the pig and the tuberculin test. *The Veterinary Record* 83: 647-651.
- Lesslie, I.W., C.N. Hebert, K.J. Burn, B.N. McClancy, & W.J.C. Donnelly. 1975. Comparison of the specificity of human and bovine tuberculin PPD for testing cattle. *Veterinary Record* 96: 332-341.
- Liébana, E., A. Aranaz, A. Mateos, M. Vilafranca, E. Gómez-Mampaso, J.C. Tercero, J. Alemany, G. Suárez, M. Domingo, & L. Domínguez. 1995. Simple and Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33 (1): 33-36.

- Liébana, E., A. Aranaz, B. Francis, & D. Cousins. 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*. En Prensa
- Linton, C.J., H. Jalal, J.P. Leeming, & M.R. Millar. 1994. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (9): 2169-2174.
- Little, T.W.A., P.F. Naylor, & J.W. Wilesmith. 1982. Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. *The Veterinary Record* 111: 550-557.
- Lowrie, D.B., & P.W. Andrew. 1988. Macrophage antimycobacterial mechanisms. *British Medical Bulletin* 44: 624-634.
- Magnusson, H. 1941. The relations between bovine and human tuberculosis from the veterinary point of view. *Acta Medicina Scandinavica* 135: 201-239.
- Mallmann, W. L., & R.S. Lippe. 1961. Improved methods for the enumeration of culturable cells of mycobacteria. *American Review of Respiratory Diseases* 84: 379-391.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, & J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York: Cold Spring Harbor.
- Manjumath, N., P. Shankar, L. Rajan, A. Bhargava, S. Saluja, & M.B. Shrinivas. 1991. Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle* 72: 21-27.
- Marks, J. 1976. Occasional survey: a system for the examination of tubercle bacilli and other mycobacteria. *Tubercle* 57: 207-225.
- Marshall, R.B., B.E. Wilton, & A.J. Robinson. 1981. Identification of leptospira serovars by restriction-endonuclease analysis. *Journal of Medical Microbiology* 14: 163-166.

- Mazurek, G.H., M.D. Cave, K.D. Eisenach, R.J.Jr. Wallace, J.H. Bates, & J.T. Crawford. 1991. Chromosomal DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic study of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (9): 2030-2033.
- Mazurier, S., A. Van de Giessen, K. Heuvelman, & K. Wernars. 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Letters in Applied Bacteriology* 14: 260-262.
- McAdam, R.A., P.W.M. Hermans, D. Van Soolingen, Z.F. Zainuddin, D. Catty, J.D.A. Van Embden, & J.W. Dale. 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Molecular Microbiology* 4 (9): 1607-1613.
- McFadden, J., Z. Kunze, & P. Seechurn. 1990. *DNA probes for detection and identification. In: Molecular Biology of the Mycobacteria.*: Surrey University Press.
- McFadyean, J. 1888. Congress for the study of tuberculosis in man and animals. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1: 262-275.
- McFadyean, J. 1902. Tubercle bacilli in cow's milk as a possible source of tuberculous disease in man. Paper read at Transactions of the British Congress on Tuberculosis 1901, at London.
- McFadyean, J. 1910. What is the common method of infection in tuberculosis? London: Annual Report of the Veterinary Department.
- McIlroy, S.G., S.D. Neill, & R.M. McCracken. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *The Veterinary Record* 118: 718-721.
- Mendiola, M.V., C. Martín, I. Otal, & B. Gicquel. 1992. Analysis of regions responsible for IS6110 RFLP in a single *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Research in Microbiology* 143: 767-772.
- Middlebrook, G., & R.J. Dubos. 1948. Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. *Journal of Expertise in Medicine* 88: 521-528.

- Middlebrook, G. 1950. A hemolytic modification of the haemagglutination test for antibodies against tubercle bacillus antigen. *Journal of Clinical Investigations* 29: 1480-1485.
- Minnikin, D. E. 1991. 7th Forum in Microbiology. Chemical principles in the organization of lipids components in the mycobacterial cell envelope. *Research in Microbiology* 142: 423-427.
- Mitchison, D.A., B.W. Allen, L. Cassal, J.M. Dickinson, & V.R. Aber. 1972. A selective oleic acid albumin agar medium for tubercle bacilli. *Journal of Medical Microbiology*. 5: 165-175.
- Mitchison, D.A., B.W. Allen, & R.A Lambert. 1973. Selective media in the isolation of tubercle bacilli from tissues. *Journal of Clinical Pathology* 26: 250-252.
- Miura, K., S. Nagai, M. Kinomoto, S. Haga, & T. Tokunaga. 1983. Comparative studies with various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an antigenic protein, MPB70. *Infection and Immunity* 39: 540-545.
- Modlin, R.L., C. Pirmez, F.M. Hofmann, V. Torigian, K. Uyemura, T.H. Rea, B.R. Bloom, & M.B. Brenner. 1989. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma/delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature (Lond.)* 339: 544-548.
- Monaghan, M.L., M.L. Doherty, J.D. Collins, J.F. Kazda, & P.J. Quinn. 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 40: 111-124.
- Monaghan, M.L., J.D. Collins, K. McGill, C. McMurray, & A. Kelly. 1995. Field trials of the gamma interferon assay for the diagnosis of bovine tuberculosis in the republic of Ireland. Second International *Mycobacterium bovis* Conference, Dunedin, New Zealand.
- Moore, M.W., F.R. Carbone, & M.J. Bevan. 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54: 777-785.
- Morris, J.A., A.E. Stevens, T.W.A. Little, & P. Stuart. 1978. Lymphocyte unresponsiveness to PPD tuberculin in badgers infected with *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science* 25 (1978): 390-392.

- Morris, J.A., A.E. Stevens, P. Stuart, & W.A. Little. 1979. A pilot study to assess the usefulness of ELISA in detecting tuberculosis in badgers. *The Veterinary Record* 104: 14.
- Morris, J. A., C. J. Thorns, & J. Woolley. 1985. The identification of antigenic determinants on *Mycobacterium bovis* using monoclonal antibodies. *Journal of General Microbiology* 131: 1825-1831.
- Morris, J.A., & J. Ivanyi. 1985. Immunoassays of field isolates of *Mycobacterium bovis* and other mycobacteria by use of monoclonal antibodies. *Journal of Medical Microbiology* 19: 367-373.
- Morris, A., L.B. Reller, M. Salfinger, K. Jackson, A. Sievers, & B. Dwyer. 1993. Mycobacteria in stool specimens: the nonvalue of smears for predicting culture results. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (5): 1385-1387.
- Morris, R.S., D.U. Pfeiffer, & R. Jackson. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Veterinary Microbiology* 40: 153-177.
- Moser, D.R., L.V. Kirchhoff, & J.E. Donelson. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (7): 1477-1482.
- Muller, I., S.P. Cobbold, H. Waldmann, & S.H.E. Kaufmann. 1987. Impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infection and Immunity* 55: 2037-2041.
- Mullis, K.B., & F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-351.
- Murray, M. G., & W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research* 8: 4321-4325.
- Muscoplat, C.C., C.O. Thoen, A.W. Chen, & D.W. Johnson. 1975. Development of specific in vitro lymphocyte responses in cattle infected with *Mycobacterium bovis* and with *Mycobacterium avium*. *American Journal of Veterinary Research* 36 (4): 395-398.

- Musial, C.E., L.S. Tice, L. Stockman, & G.D. Roberts. 1988. The identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe rapid diagnostic system for *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 2120-2123.
- Myers, L.E., S.V. Silva, J.D. Procnier, & P.B. Little. 1993. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* isolates by using a random amplified polymorphic DNA assay. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 512-517.
- Nader, A., & H. Husberg. 1988. Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. *Revista de Medicina Veterinaria de Buenos Aires* 69: 36-43.
- Nagai, S., J. Matsumoto, & T. Nagasuga. 1981. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 31: 1152-1160.
- Nagai, S., H.G. Wiker, M. Harboe, & M. Kinomoto. 1991. Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 59 (1): 372-382.
- Nassau, E., E.R. Parsons, & G.D. Johnson. 1976. The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle* 57: 67-70.
- Neill, S.D., J. Hanna, & J.J. O'Brien. 1986. Radiometric detection of mycobacteria in abattoir specimens taken from tuberculin reactive cattle. *The Veterinary Record* 118: 304-306.
- Neill, S.D., J. Hanna, J.J. O'Brien, & R.M. McCracken. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Veterinary Record* 123: 340-343.
- Neill, S.D., J.J. O'Brien, & J. Hanna. 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Veterinary Microbiology* 28: 103-109.
- Neill, S.D., J. Hanna, D.P. Mackie, & T.G.D. Bryson. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tract of skin test-negative cattle. *The Veterinary Record* 131: 45-47.

- Neill, S.D., J.M. Pollock, D.B. Bryson, & J. Hanna. 1994a. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology* 40: 41-52.
- Neill, S.D., J. Cassidy, J. Hanna, D.P. Mackie, J.McA. Pollock, A. Clements, E. Walton, & D.G. Bryson. 1994b. Detection of *Mycobacterium bovis* infection in skin test-negative cattle with an assay for bovine interferon-gamma. *The Veterinary Record* 135: 134-135.
- Neill, S.D., J. Hanna, A. Clements, J. Cassidy, E. Walton, J. Pollock, & D.G. Bryson. 1995. An evaluation of a commercial assay for bovine interferon-gamma when used for diagnosing tuberculosis in cattle. Second International *Mycobacterium bovis* Conference, Dunedin, New Zealand.
- Newell, D.G., & R.G. Hewinson. 1995. Control of bovine tuberculosis by vaccination. *The Veterinary Record* 136: 459-463.
- O'Reilly, L.M., & C.J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle and Lung Disease* 76 (Supplement 1): 1-46.
- Olive, D.M. 1989. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (2): 261-265.
- Oste, C. 1988. Polymerase chain reaction. *Biotechniques* 6 (2): 162-167.
- Ota, T., Y. Okuba, & M. Sekiguchi. 1990. Analysis of immunologic mechanisms of high natural killer cell activity in tuberculous pleural effusions. *American Review of Respiratory Diseases*. 142: 29-33.
- Otal, I., C. Martín, V. Vincent-Levy-Frébault, D. Thierry, & B. Gicquel. 1991. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (6): 1252-1254.
- Outteridge, P.M., & A.W.D. Lepper. 1973. The detection of tuberculin-sensitive lymphocytes from bovine blood by uptake of radio-labelled nucleosides. *Research in Veterinary Science* 14: 296-305.

- Palittapongarnpim, P., S. Chomyc, A. Fanning, & D. Kunimoto. 1993. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases* 167: 975-978.
- Pao, C.C., S.S. Lin, S.Y. Wu, W.M. Juang, C.H. Chang, & J.Y. Lin. 1988. The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical specimens with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA as probes. *Tubercle* 69: 27-36.
- Pao, C.C., T.S.B. Yen, J-B. You, J-S. Maa, E.H. Fiss, & C-H. Chang. 1990. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (9): 1877-1880.
- Park, C.H., D.L. Hixon, C.B. Ferguson, S.L. Hall, C.C. Risheim, & C.B. Cook. 1984. Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technic. *American Journal of Clinical Pathology* 81: 341-345.
- Park, W. H. 1913. The relation of bovine tuberculosis in the production of human tuberculosis: Department of Health, New York City.
- Parra, C.A., L.P. Londono, P. del Portillo, & M.E. Pattaroyo. 1991. Isolation, characterization and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: Identification of species-specific sequence. *Infection and Immunity* 59 (10): 3411-3417.
- Pattyn, S.R., F.A. Portaels, P. Kageruka, & P. Gigase. 1970. *M. microti* infection in vicuna (*Lama vicugna*). *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensa* 51: 17-24.
- Peetermans, W.E., J.A.M. Langermans, M.E.B. Van Der Hulst, J.D.A. Van Embden, & R. Van Furth. 1993. Murine peritoneal macrophages activated by the mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein express enhanced microbicidal activity *in vitro*. *Infection and Immunity* 61 (3): 868-875.
- Perraut, R., A.R. Lussow, S. Gavaille, O. Garraud, H. Matile, C. Tougne, J. Van Embden, R. Van der Zee, P.H. Lambert, J. Gysin, & G. del Giudice. 1993. Successful primate immunization with peptides conjugated to purified protein derivative or mycobacterial heat shock proteins in the absence of adjuvants. *Clinical and Experimental Immunology* 93: 382-386.

- Peterson, E.M., R. Lu, C. Floyd, A. Nakasone, G. Friedly, & L.M. de la Maza. 1989. Direct identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, and *Mycobacterium intracellulare* from amplified primary cultures in BACTEC media using DNA probes. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (7): 1543-1547.
- Petran, E.I., & H.D. Vera. 1971. Media for selective isolation of mycobacteria. *Health and Laboratory Science* 8: 225-230.
- Petroff, S.A. 1915. Some cultural studies on the tubercle bacillus. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 26: 276-279.
- Pfeiffer, D.U., & R.S. Morris. 1991. A longitudinal study of bovine tuberculosis in possums and cattle. In *Symposium on Tuberculosis (Publication No. 132)*. *Veterinary Continuing Education*. Palmerston North, N.Z.: Massey University.
- Philips, B.J., & W. Kaplan. 1976. Effect of cetylpyridinium chloride on pathogenic fungi and *Nocardia asteroides* in sputum. *Journal of Clinical Microbiology* 3: 272-276.
- Pierre, C., D. Lecossier, Y. Boussougant, D. Bocart, V. Joly, P. Yeri, & A.J. Hance. 1991. Use of reamplification protocol improves sensitivity of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by amplification of DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (4): 712-717.
- Plackett, P., J. Ripper, L.A. Corner, K. Small, K. de Whitte, L. Melville, S. Hides, & P.R. Wood. 1989. An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Australian Veterinary Journal* 66: 15-19.
- Plikaytis, B.B., K.D. Eisenach, J.T. Crawford, & T.M. Shinnick. 1991. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG by a polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 5: 215-219.
- Pritchard, D.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *Journal of Comparative Pathology* 99: 357-399.
- Radford, A.J., B.J. Duffield, & P. Plackett. 1988. Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Infection and Immunity* 56: 921-925.

- Radford, A.J., P.R. Wood, H. Billman-Jacobe, H.M. Geysen, T.J. Mason, & G. Tribbick. 1990. Epitope mapping of the *Mycobacterium bovis* secretory protein MPB70 using overlapping peptide analysis. *Journal of General Microbiology* 136: 265-272.
- Radunz, B.L., & A.W.D. Lepper. 1985. Suppression of reactivity to tuberculin in repeat tests. *Australian Veterinary Journal* 62: 191-194.
- Ralph, W. 1989. A new test for TB. *Rural Research* 144: 4-8.
- Rastogi, N., C. Frehel, & H. L. David. 1986. Triple-layered structure of mycobacterial cell wall: Evidence for the existence of a polysaccharide-rich outer layer in 18 mycobacterial species. *Current Microbiology* 13: 237-242.
- Rastogi, N., B.C. Ross, B. Dwyer, K.S. Goh, S. Clavel-Sérès, V. Jeantils, & P. Cruaud. 1992. Emergence during unsuccessful chemotherapy of multiple drug resistance in a strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious diseases* 11: 901-907.
- Ravenel, M. P. 1902. Intercommunicability of human and bovine tuberculosis. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 15: 112-143.
- Reich, M., L.F. Affronti, & G.L. Wright. 1982. Isolation and partial characterization of the most immunologically reactive antigen from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra culture filtrate. *Tubercle* 63: 99-106.
- Richards, W.D., E.M. Ellis, & H.S. Wrigth. 1966. Modifications of the gel diffusion precipitation test for tuberculosis. *American Review of Respiratory Diseases* 93: 951-952.
- Ritacco, V., I.N. de Kantor, L. Barrera, A. Nader, A. Bernardelli, G. Torrea, F. Errico, & E. Fliess. 1987. Assessment of the sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of mycobacterial antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine* B34: 119-125.
- Ritacco, V., B. López, L. Barrera, A. Nader, E. Fliess, & I.N. de Kantor. 1990. Further evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Journal of Veterinary Medicine* B37: 19-27.

- Ritacco, V., B. López, I.N. de Kantor, L. Barrera, F. Errico, & A. Nader. 1991. Reciprocal cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 50 (3): 365-367.
- Ritacco, V., & I.N. de Kantor. 1992. Zoonotic tuberculosis in Latin America. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (12): 3299-3300.
- Rogall, T., T. Flohr, & E.C. Bottger. 1990a. Differentiation of of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified products. *Journal of General Microbiology* 136: 1915-1920.
- Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr, & E.C. Bottger. 1990b. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40 (4): 323-330.
- Romaniuk, P.J., & T.J. Trust. 1987. Identification of *Campylobacter* species by southern hybridization of genomic DNA using an oligonucleotide probe for 16s rRNA genes. *FEMS Microbiology Letters* 43: 331-335.
- Romano, M.I., A. Alito, F. Bigi, J.C. Fisanotti, & A. Cataldi. 1995. Genetic characterization of mycobacteria from South American wild seals. *Veterinary Microbiology* 47: 89-98.
- Rook, G.A.W. 1987. Progress in the immunology of the mycobacterioses. *Clinical and Experimental Immunology* 69: 19.
- Ross, B.C., K. Raios, K. Jackson, & B. Dwyer. 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiologic tool. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (4): 942-946.
- Rossi, L., & S. Dokoupil. 1969. Causes of reinfection of tuberculosis-free herds of cattle. *Veterinarni Medicina, Praha* 14: 441-448.
- Roswurm, J.D., & L.D. Konya. 1973. The comparative cervical tuberculin test as an aid to diagnosing bovine tuberculosis. Proceedings of the 77th U.S. Animal Health Association.

- Roszman, T. L., V. H. Mallman, W. L. Mallman, & D. O'Reilly. 1968. Immunologic responses evoked by mycobacterial components: Disc electrophoretic separation of specific mycobacterial antigens. *American Review of Respiratory Diseases* 97: 103-112.
- Rothel, J.S., S.L. Jones, L.A. Corner, J.C. Cox, & P.R. Wood. 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67 (4): 134-137.
- Rothel, J.S., S.L. Jones, L.A. Corner, J.C. Cox, & P.R. Wood. 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon on whole blood culture. *Australian Veterinary Journal* 69 (1): 1-4.
- Rothstein, E. 1970. The twenty-ninth Veterans Administration Armed Forces Pulmonary Disease Research Conference. *American Review of Respiratory Disease* 101: 788.
- Rowlet, S.G., & L.A. Corner. 1981. The use of a conventional counterstain with auramine fluorescent stain for acid-fast organisms, to obtain a better histological contrast. *Australian Veterinary Journal* 57: 53-54.
- Royal Commission of Tuberculosis. 1911. Final Report, HMSO, London.
- Rumschlag, H.S., T.M. Shinnick, & M.L. Cohen. 1988. Serological responses of patients with lepromatous and tuberculoid leprosy to 30-, 31- and 32-kDa antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 26: 2200-2202.
- Runyon, E.H. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Medical Clinics of North America* 43: 273-290.
- Runyon, E. H. 1970. Identification of mycobacterial pathogens utilizing colony characteristics. *American Journal of Clinical Pathology* 54: 578-586.
- Runyon, E. H., A.G. Karlson, G.P. Kubica, & L.G. Wayne. 1974. *Mycobacterium*. In *Manual of Clinical Microbiology*, edited by E. H. L. a. J. P. Truant. Washington D.C.: Society of Microbiology.

- Ruys, A.C. 1939. On tuberculosis in man due to the bovine type of the tubercle bacillus in the Netherlands. *Tubercle* 20: 556-560.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, & N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of gammaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*: 1350-1354.
- Salyers, A.A., & D.D. Whitt. 1994. *Bacterial Pathogenesis, a molecular approach.*: ASM press.
- Saubolle, M.A., G.D. Roberts, N.L. Goodman, T. Davis, & V. Jonas. 1993. Isolates of non-tuberculous mycobacteria identified as members of the tuberculosis complex by commercial genetics probes. 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Savic, B., U. Sjöbring, S. Alugupalli, L. Larsson, & H. Miörnör. 1992. Evaluation of polymerase chain reaction, tuberculostearic acid analysis, and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum. *Journal of Infectious Diseases* 66: 1177-1180.
- Scharf, S.J., G.T. Horn, & H.A. Erlich. 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*: 1076-1078.
- Shankar, P., N. Manjunath, K.K. Mohan, K. Prasad, M.B. Shrinivas, & G.K. Ahuja. 1991. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *The Lancet* 337: 5-7.
- Shawar, R.M., F.A.K. El-Zaatari, A. Nataraj, & J.E. Clarridge. 1993. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by two step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (1): 61-65.
- Sigurdsson, J. 1945. Studies on the risk of infection with bovine tuberculosis to the rural population. *Acta Tuberculosea Scandinavica Supplementum* 15: 24-60.
- Sinclair, K., J.A. Challans, R.R. Kazwala, R.G. Hewinson, & M.J. Sharp. 1995. A multiplex polymerase chain reaction for distinguishing *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Molecular and Cellular Probes* 9: 291-295.

- Sjöbring, U., M. Mecklenburg, A.B. Andersen, & H. Miorner. 1990. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (10): 2200-2204.
- Sjogren, I., & I. Sutherland. 1975. Studies of tuberculosis in man in relation to infection in cattle. *Tubercle* 56: 113-127.
- Skerman, V.B.D., V. McGowan, & P.H.A. Sneath. 1980. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 30: 225-420.
- Skuce, R.A., D. Brittain, M.S. Hughes, L.-A. Beck, & S.D. Neill. 1994. Genomic fingerprinting of *Mycobacterium bovis* from cattle by restriction fragment length analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (10): 2387-2392.
- Smith, N. 1960. The 'Dassie' bacillus. *Tubercle, London* 41: 203-212.
- Smith, T. 1896. Two varieties of the tubercle bacillus from mammals. *Trans. Association of American Physicians* 11: 75-93.
- Smith, T. 1898. A comparative study of bovine tubercle bacilli in man in relation to infection in animals. *Journal of Experimental Medicine* 3: 451-11.
- Smithwick, R.W., C.B. Stratigos, & H.L. David. 1975. Use of cetylpyridinium chloride and sodium chloride for the decontamination of sputum specimens that are transported to the laboratory for the isolation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1 (5): 411-413.
- Snipes, K.P., D.C. Hirsh, R.W. Kasten, L.M. Hansen, D.W. Hird, T.E. Carpenter, & R.H. McCapes. 1989. Use of a rRNA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasturella multocida* isolated from turkeys and wildlife. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (8): 1847-1853.
- Soini, H., M. Skurnik, K. Liipo, E. Tala, & M.K. Viljanen. 1992. Detection and identification of mycobacteria by amplification of a segment of the gene coding for the 32-Kilodalton protein. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (8): 2025-2028.
- Stanford, J. L. 1973. Immunodiffusion analysis: A rational basis for the taxonomy of mycobacteria. *Annals of the Belgium Society for Medicine Tropical* 53: 321-330.

- Stanford, J. L. 1983. *Immunologically important constituents of Mycobacteria: Antigens*. In *The Biology of the Mycobacteria*. Edited by C. Ratledge and J.L. Stanford. London: Academic Press.
- Stockman, L., B. Springer, E.C. Bötger, & G.D. Roberts. 1993. *Mycobacterium tuberculosis* nucleic acid probes for rapid diagnosis. *Lancet* 341: 1486.
- Stonebrink, B. 1958. The use of a pyruvate containing egg medium in the culture of isoniazid resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* var. hominis. *Acta Tuberculosis Scandinavia* 35: 67-80.
- Stull, T.L., J.J. Lipuma, & T.D. Edlind. 1988. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: Ribosomal RNA. *The Journal of Infectious Diseases* 157 (2): 280-286.
- Sunderam, G., R.J. McDonald, T. Maniatis, J. Oleske, R Kapila, & L.B. Reichman. 1986. Tuberculosis as a manifestation of the aquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Journal of the American Medical Association* 256: 362-366.
- Suzuki, S., K. Yoshinaga, Y. Ono, A. Nagata, & T. Yamada. 1987. Organization of rRNA genes in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Bacteriology* 169 (2): 839-843.
- Tacquet, A., & F. Tison. 1961. Nouvelle technique d'isolement des mycobacteries par le lauryl-sulfate de sodium. *Annales de l'Institut Pasteur* 100: 676-680.
- Takewaki, S.I., K. Okuzumi, H. Ishiko, K.I. Nakahara, A. Ohkubo, & R. Nagai. 1993. Genus-specific polymerase chain reaction for the *Mycobacterium dnaJ* gene and species specific oligonucleotide probes. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (2): 446-450.
- Tammemagi, L., G.C. Simmons, R. Kelman, & W.T.K. Hall. 1973. A study of tuberculosis-like lesions in cattle slaughtered in Queensland meatworks. *Australian Veterinary Journal* 49: 507-511.
- Tarara, R., M.A. Suleman, R. Sapolsky, M.J. Wabomba, & J.G. Else. 1985. Tuberculosis in wild olive baboons, *Papio cynocephalus anubis*, in Kenya. *Journal of Wildlife Diseases* 21: 137-140.

- Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E.C. Büttger, & T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by Polymerase Chain Reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (2): 175-178.
- Tessaro, S.V., L.B. Forbes, & C. Turcotte. 1990. A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park, Canada. *Canadian Veterinary Journal* 31: 174-180.
- Thierry, D., A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frébault, S. Nguyen, J.L. Guesdon, & B. Gicquel. 1990a. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (12): 2668-2673.
- Thierry, D., M.D. Cave, K.D. Eisenach, J.T. Crawford, J.H. Bates, B. Gicquel, & J.L. Guesdon. 1990b. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Research* 18 (1): 188.
- Thoen, C.O., W.D. Richards, & J.L. Jarnagin. 1977a. Mycobacteria isolated from exotic animals. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 170: 987-990.
- Thoen, C.O., F.Z. Beluhan, E.M. Himes, Capek.V., & B.T. Bennett. 1977b. *Mycobacterium bovis* infection in baboons (*Papio papio*). *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 101: 291-293.
- Thoen, C.O., K. Mills, & M.P. Hopkins. 1980. Enzyme-linked protein A: An enzyme-linked immunosorbent assay reagent for detecting antibodies in tuberculous exotic animals. *American Journal of Veterinary Research* 41: 833-835.
- Thoen, C.O., M.R. Hall, T.A. Petersburg, & J.R. Harrington. 1984. Detection of mycobacterial antibodies in sera of cattle experimentally exposed to *Mycobacterium bovis* by use of a modified enzyme-linked immunosorbent assay. Annual Meeting of American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.
- Thoen, C.O., & E.M. Himes. 1986a. Mycobacterium. In *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, edited by C.L.G. and C.O.T. Ames: Iowa State University Press.

- Thoen, C.O., & E.M. Himes. 1986b. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 2: 198-214.
- Thole, J.E.R., W.A.C. Van Schooten, W.J. Keulen, P.W.M. Hermans, A.A.M. Janson, R.R.P. De Vries, A.H.J. Kolk, & J.D.A. Van Embden. 1988. Use of a recombinant antigens expressed in *Escherichia coli* K-12 to map B-cell and T-cell epitopes on the immunodominant 65-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 56 (6): 1633-1640.
- Thorel, M.F. 1980. Isolation of *Mycobacterium africanum* from monkeys. *Tubercle* 61: 101-104.
- Thorns, C.J., & J.A. Morris. 1983. The immune spectrum of *Mycobacterium bovis* infections in some mammalian species: a review. *Veterinary Bulletin* 53 (6): 543-549.
- Tisdall, P.A., D.R. de Young, G.D. Roberts & J.P. Anhalt. 1982. Identification of clinical isolates of Mycobacteria with gas-liquid chromatography: a 10-month follow-up study. *Journal of Clinical Microbiology* 16 (2):400-402.
- Tweddle, N. E., & P. Livingstone. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Veterinary Microbiology* 40: 23-39.
- Van Embden, J.D.A., D. Van Soolingen, P.M. Small, & P.W.D. Hermans. 1992. Genetic markers for the epidemiology of tuberculosis. *Research in Microbiology* 143: 385-391.
- Van Embden, J.D.A., D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick, & P.M. Small. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (2): 406-409.
- Van Eys, G.J.J.M., C. Gravekamp, M.J. Gerritsen, W. Quint, M.T.E. Cornelissen, J. ter Schegget, & W.J. Terpstra. 1989. Detection of leptospire in urine by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (10): 2258-2262.

- Van Soolingen, D., P.W.M. Hermans, P.E.W. de Haas, D.R. Soll, & J.D.A. Van Embden. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (11): 2578-2586.
- Van Soolingen, D., P.W.M. Hermans, P.E.W. de Haas, & J.D.A. Van Embden. 1992a. Insertion element IS1081-associated restriction fragment polyorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (7): 1772-1777.
- Van Soolingen, D., P.E.W. de Haas, P.W.M. Hermans, & J.D.A. Van Embden. 1992b. RFLP analysis of mycobacteria: National Institute of Public Health and Environmental Protection, Biltoven, The Netherlands.
- Van Soolingen, D., P.E.W. de Haas, P.W.M. Hermans, P.M.A. Groenen, & J.D.A. Van Embden. 1993. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (8): 1987-1995.
- Van Soolingen, D., P.E.W. de Haas, J. Haagsma, T. Eger, P.W.M. Hermans, V. Ritacco, A. Alito, & J.D.A. Van Embden. 1994. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 32 (10): 2425-2433.
- Vaneechoutte, M., H. Debeenhouwer, G. Claeys, G. Verschraegen, A. Derouck, N. Paepe, A. Elaichouni, & F. Portaels. 1993. Identification of mycobacteria species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (8): 2061-2065.
- Vardaman, T.H., & A.B. Larser. 1962. Bovine tuberculosis II. A comparison of the haemagglutination, hemolytic and complement fixation tests on serum from intradermal bovine tuberculin reactors. *American Journal of Veterinary Research* 23: 274-276.
- Veerman, G.M., R. Kelman, J. Colley, & J.G. Pike. 1990. Rapid confirmatory identification of *Mycobacterium bovis* using a dot blotting immunodetection technique. *Veterinary Microbiology* 22: 335-340.

- Verbon, A., S. Kuijper, H.M. Jansen, P. Speelman, & A.H.J. Kolk. 1990. Antigens in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis*: epitopes defined by monoclonal and human antibodies. *Journal of General Microbiology* 136: 955-964.
- Veringa, E., B. Van Harsselaar, & P. Hermans. 1992. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Microbiological Methods* 16: 139-147.
- Versalovic, J., V. Kapur, E.O.Jr. Mason, U. Shah, T. Koeuth, J.R. Lupski, & J.M. Musser. 1993. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains recovered in Houston: Identification and molecular characterization of multiple clones. *The Journal of Infectious Diseases* 167: 850-856.
- Vestal, A.L. 1975. *Procedures for the Isolation and Identification of mycobacteria*. Atlanta: US Department of Health, Education and Welfare, Centers for Disease Control, PHS No.15.
- Victor, T., R. du Toit, & P.D. Van Helden. 1992. Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (6): 1514-1517.
- Virtanen, S. 1960. A study of nitrate reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria. *Acta Tuberculosae Scandinavica (Suppl)* 48: 1-119.
- Wallace, R., J. Carrievé, B.B. Diena, & L. Greenberg. 1968. The bentonite flocculation on test in the serology of tuberculosis II. Detection of tuberculosis in cattle. *Canadian Journal of Microbiology* 14: 887-890.
- Walley, T. 1888. Veterinary sanitation. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 1: 25-32.
- Weber, A., & L. Naumann. 1992. Pilot study for radiometric detection of mycobacteria in tuberculous changed lymph nodes of slaughter animals. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 105: 43-45.
- Wells, A.Q., & D.M. Oxen. 1937. Tuberculosis in wild voles. *The Lancet* 1: 1221.

- Wells, A.Q., & A.H.T. Robb-Smith. 1946. The murine type of tubercle bacillus (The vole acid-fast bacillus) with notes on the morphology of infection by the vole acid-fast bacillus: Medical Research Council.
- Werner, V. E. 1981. Transmission of tuberculosis to cattle herd from livestock attendant with renal tuberculosis. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 36: 819-820.
- Whipple, D.L., & R.S. Merkal. 1983. Modifications in the techniques for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis*. Proceedings of the international Coloquium on Research in Paratuberculosis, Ames, IA.
- Wigle, W.D., M.J. Ashley, E.M. Killough, & M. Cosens. 1972. Bovine tuberculosis in humans in Ontario. The epidemiologic features of 31 active cases occurring between 1964 and 1970. *American Review of Respiratory Disease* 106: 528-534.
- Wiker, H.G., M. Harboe, S. Nagai, M.E. Patarroyo, C. Ramirez, & N. Cruz. 1986. MPB59, a widely cross-reacting protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 81: 307-314.
- Wilesmith, J.W. 1991. The epidemiology of bovine tuberculosis in Great Britain: an overview of the badger problem. In *Symposium on Tuberculosis (Publication No. 132)*. *Veterinary Continuing Education*. Palmerston North, N.Z.: Massey University.
- Wilkins, E.G.L., R.J. Griffiths, & C. Roberts. 1986a. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. *Thorax* 41: 685-687.
- Wilkins, E.G.L., R.J. Griffiths, C. Roberts, & H.T. Green. 1986b. Tuberculosis meningitis due to *Mycobacterium bovis*. A report of two cases. *Postgraduate Medical Journal* 63: 653-655.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, & S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535.
- Wilson, K. 1988. Preparation of genomic DNA from bacteria. In *Current Protocols in Molecular Biology*, edited by R. B. F.M. Ausubel R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. New York: John Wiley & Sons inc.

- Wilson, K.H., R.B. Blitchington, & Greene. R.C. 1990. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 28: 1942-1946.
- Wilson, P., E. Weavers, B. West, M. Taylor, J. Kavanagh, & P. Jones. 1984. *Mycobacterium bovis* infection in primates in Dublin zoo: Epidemiological aspects and implications for management. *Laboratory Animals* 18: 383-387.
- Wilson, S.M., R. McNerney, P.M. Nye, P.D. Godfrey-Faussett, N.G. Stoker, & A. Voller. 1993. Progress towards a simplified Polymerase Chain Reaction and its application to diagnosis of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (4): 776-782.
- Wilton, S., & D. Cousins. 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR: Methods and Applications* 1: 269-273.
- Winblad, B., & M. Duchek. 1973. Comparison between microscopical methods and cultivation for demonstration of tubercle bacilli in experimental tuberculosis infection. *Acta Pathologica and Microbiologica Scandinava. series A* 81: 824-830.
- Woese, C.R., R. Gutell, R. Gupta, & H.F. Noller. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiological Reviews* 47: 621-669.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* 51 (2): 221-271.
- Wong, C., C.E. Dowling, R.K. Saiki, H.G. Higuchi, H.A. Erlich, & H.H. Kazazian. 1987. Direct genomic sequencing of amplified single copy DNA: Rapid characterization of unknown B-thalassemia mutations. *Nature* 330: 384-386.
- Wood, P.R., J. Ripper, A.J. Radford, P.G. Bundesen, D.B. Rylatt, L.E. Cottis, M. John, & P. Plackett. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium bovis*. *Journal of General Microbiology* 134: 2599-2604.
- Wood, P.R., J.S. Rothal, P.G.D. McWaters, & S.L. Jones. 1990a. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for bovine gamma-interferon. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 25: 37-46.

- Wood, P.R., L.A. Corner, & P. Plackett. 1990b. Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon. *Research in Veterinary Science* 49 (1): 46-49.
- Wood, P.R., L.A. Corner, J.S. Rothel, C. Baldock, S.L. Jones, D.V. Cousins, B.S. McCormick, B.R. Francis, J. Creeper, & N.E. Tweddle. 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 68 (9): 286-290.
- Wood, P.R., L.A. Corner, J.S. Rothel, J.L. Ripper, T. Fifis, B.S. McCormick, B. Francis, L. Melville, K. Small, K. de Witte, J. Tolson, T.J. Ryan, G.W. de Lisle, J.C. Cox, & S.L. Jones. 1992. A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 31 (1): 71-79.
- Woodford, M.H. 1982. Tuberculosis in wildlife in the Ruwenzori National Park. Uganda (Part I). *Trop. Anim. Health Prod.* 14: 81-88.
- Yamaguchi, R., K. Matsuo, A. Yamazaki, C. Abe, S. Nagai, K. Terasaka, & T. Yamada. 1989. Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 57 (1): 283-288.
- Yanagihara, D.L., V.L. Barr, C.V. Knisley, A.Y. Tsang, J.K. McClatchy, & P.J. Brennan. 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay of glycolipid antigens for identification of mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 21 (4): 569-574.
- Yates, M. C., & C. H. Collins. 1979. Identification of tubercle bacilli. *Annals of Microbiology* 130B: 13-19.
- Yates, M.D., & J.M. Grange. 1988. Incidence and nature of human tuberculosis due to bovine tubercle bacilli in South-East England: 1977-1987. *Epidemiology and Infection* 101: 225-229.
- Youmans, G. P. 1979. *Tuberculosis*. Philadelphia: W. B. Saunders.
- Young, D., L. Kent, A. Rees, J. Lamb, & J. Ivanyi. 1986. Immunological activity of a 38-Kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 54: 177-183.

- Young, D.B., & T.R. Garbe. 1991a. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 56 (9): 3086-3093.
- Young, D.B., & T.R. Garbe. 1991b. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Research in Microbiology* 142: 55-65.
- Yuen, L.K.W., B.C. Ross, K.M. Jackson, & B. Dwyer. 1993. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 31 (6): 1615-1618.
- Zaki, S., T.S. Nalini, & B.S. Keshavamurthy. 1980. Kaolin agglutination test in the diagnosis of bovine tuberculosis. *Mysore Journal of Agricultural Sciences* 14: 545-548.
- Zeiss, C.R., R.C. Radin, J.E. Williams, D. Levitz, & J.P. Phair. 1982. Detection of immunoglobulin G antibody to purified protein derivative in patients with tuberculosis by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 15: 93-96.