

DetECCIÓN DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE *Mycobacterium bovis* A PARTIR DE ADN DE MOCO NASAL DE CAPRINOS INOCULADOS EXPERIMENTALMENTE

DETECTION OF *Mycobacterium bovis* NUCLEOTIDE SEQUENCES FROM NASAL MUCUS OF EXPERIMENTALLY INOCULATED GOATS

Isaura Carolina Ramírez Casillas* Marco A. Santillán Flores* Beatriz Arellano Reynoso**
Francisco Morales Álvarez** Víctor R. Tenorio Gutiérrez **

Abstract

Excretion of *M. bovis* through aerosols and their inhalation is considered the main route of transmission and infection in cattle. The traditional methods used for monitoring the elimination of the microorganism by the nasal route are the bacteriological culture and the radiometric method. Recently developed molecular biology methods have favored the fast and reliable diagnosis of mycobacteria in the field. In the present work, the M-PCR technique was used to determine the time at which *M. bovis*' DNA could be detected from the nasal mucus of 14 experimentally-infected goats. Samples were taken from the nasal cavity at different time intervals after the challenge, and bacteriological culture and DNA amplification by M-PCR were carried out. Sixty days after challenge, the M-PCR techniques detected six out of 14 animals as positive and at day 90, these same six animals plus four more were detected as positive. No sample was positive to the bacteriological culture. It is known that the bacteriological isolation of mycobacteria is difficult and that the reduced number of viable bacteria in each sample influences the result of the diagnosis. In this work, the advantage of using the M-PCR technique in order to obtain positive results in just a short time was demonstrated, which favors a quick and timely identification of the animals that represent a risk of infection in the herd and that could represent reservoirs of the disease.

Key words: BOVINE TUBERCULOSIS, M-PCR, NASAL MUCUS, *M. BOVIS*.

Resumen

La excreción de *M. bovis* a través de aerosoles y la inhalación de éstos es la principal ruta de transmisión de la infección en el ganado bovino. Los métodos tradicionales empleados para la vigilancia de la eliminación del microorganismo por la vía nasal son el cultivo bacteriológico y el método radiométrico. Los métodos de biología molecular desarrollados recientemente han favorecido el diagnóstico rápido y confiable de las micobacterias. En el presente trabajo se utilizó la técnica de PCR-M a partir de ADN obtenido del moco nasal de 14 cabras infectadas experimentalmente, para establecer el tiempo en que puede detectarse el material genético de *M. bovis* en el moco nasal. Se tomaron muestras de moco nasal a diferentes intervalos posteriores al desafío y se realizó el cultivo bacteriológico y amplificación de ADN por PCR-M. Al día 60 posdesafío, la técnica de PCR-M detectó seis animales de los 14 positivos y al día 90, estos animales y cuatro más resultaron positivos. Ninguna muestra resultó positiva al cultivo bacteriológico. Se sabe que el aislamiento bacteriológico de micobacterias es difícil y que el número reducido de bacterias viables en cada muestra influye en el resultado del diagnóstico. En el presente trabajo se demostró la ventaja de utilizar la técnica de PCR-M para obtener resultados positivos en menor tiempo, lo cual es favorable para identificar pronto a los animales que representan un riesgo de contagio en el hato y que son reservorios de la enfermedad.

Palabras clave: TUBERCULOSIS BOVINA, PCR-M, MOCO NASAL, *M. BOVIS*.

Recibido el 5 de julio de 2005 y aceptado el 25 de enero de 2006.

*Proyecto Tuberculosis Bovina CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGARPA, Km 15.5, Carretera México-Toluca, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.

**Departamento de Bacteriología CENID-Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, SAGARPA, Km 15.5, Carretera México-Toluca, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.

Responsable de correspondencia y sobretiros: Marco A. Santillán Flores, Teléfono: 55703100, ext. 49, Fax: 55704073. Correo electrónico: santillan.marco@inifap.gob.mx, msantillan_flores@hotmail.com

Introduction

The excretion of *M. bovis* is considered to take place through aerosols and the main transmission route is the inhalation of these from animals that are eliminating the bacillus through the nasal mucus.^{1,2} Therefore, it is convenient to observe the elimination of the microorganism through this pathway in order to understand the pathogenesis and epidemiology of the disease. Some of the currently used methods are the traditional bacteriological culture as well as the culture of the mycobacterium, using the BACTEC 460 radiometric method,³ followed by Ziehl-Neelsen stains of the obtained cultures. These methods take several weeks to carry out and their sensitivity is low.

In molecular biology several new techniques have been developed allowing the detection of a microorganism's genes; therefore, they are very sensitive, specific and permit results in a short time.^{4,5} Precise detection of the etiological agent allows the tracking and follow up of the strains of the pathogen within a population.^{4,6-12} The molecular technique that has been used for diagnosing tuberculosis is the polymerase chain reaction (PCR), in which the primers that have been described were developed from the nucleotide sequences IS6110, IS1081 and 16S rDNA, that are only present in the species that are part of the tuberculosis complex: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*; making them very specific.^{6,10,13-17} The application of this technique on bovine tuberculosis will be very valuable as it will permit a better understanding of the transmission dynamics of the bacillus, as well as the identification of outbreaks and their relationship with common infection foci, and the differentiation between vaccine, saprophyte or virulent strains.^{5,17} Talbot *et al.*⁶ designed a Multiplex PCR (PCR-M) from the RD1 sequence of the microorganism genome, that has the ability to differentiate between the BCG *M. bovis* and the virulent *M. bovis* and *M. tuberculosis* strains.

The objective of this study was to determine, through PCR-M, the time at which it is possible to detect the DNA of *M. bovis* from nasal mucus of experimentally inoculated animals.

Material and methods

Nasal mucus samples from 20 goats, 150 days old were used. These animals came from dams that were negative to the double comparative tuberculin test, and that had tested negative to the same test before being challenged. A total of 14 animals were inoculated with a dose of 5×10^2 units colony forming (CFU) of pathogen *M. bovis*, preceding from the strain

Introducción

Se considera que la excreción de *M. bovis* a través de aerosoles y la inhalación de éstos es la principal ruta de transmisión de la infección de los animales que están eliminando el bacilo a través del moco nasal.^{1,2} Por tanto, es conveniente vigilar la eliminación del microorganismo por esta ruta, para entender la patogénesis y la epidemiología de la enfermedad. Algunos de los métodos empleados actualmente son el cultivo bacteriano tradicional y el cultivo de la micobacteria, utilizando el método radiométrico BACTEC 460,³ seguido por tinciones de Ziehl-Neelsen de los cultivos obtenidos. Estos métodos tardan varias semanas y su sensibilidad es baja.

En el campo de la biología molecular se han desarrollado nuevas técnicas que permiten la detección de los genes de un microorganismo; por tanto, tienen la característica de ser muy sensibles, específicas y permiten obtener resultados en poco tiempo.^{4,5} La detección precisa del agente etiológico permite el rastreo y el seguimiento de las cepas del agente patógeno en una población.^{4,6-12} La técnica molecular que se ha empleado en el diagnóstico de la tuberculosis es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual los iniciadores que más se han descrito son los diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas IS6110, IS1081 y 16S rADN, ya que sólo están presentes en las especies que integran al complejo tuberculosis: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, lo que las hace específicas.^{6,10,13-17} La aplicación de esta técnica en el caso de la tuberculosis bovina será muy valiosa, pues permitirá comprender mejor la dinámica de la transmisión del bacilo, identificación de brotes y la relación de éstos con focos de infección comunes, así como la diferenciación entre cepas vacunales, saprófitas o virulentas.^{5,17} Talbot *et al.*⁶ diseñaron una PCR Multiplex (PCR-M) a partir de la secuencia RD1 del genoma micobacteriano, la cual tiene la característica de diferenciar entre la cepa *M. bovis*-BCG y las cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* virulentas.

El objetivo del presente estudio fue determinar por medio de una PCR-M, el tiempo en que se puede detectar el ADN de *M. bovis*, a partir de moco nasal de animales inoculados experimentalmente.

Material y métodos

Se trabajaron muestras de moco nasal de 20 caprinos, de 150 días de edad; los animales provenían de madres negativas a la prueba de tuberculina doble comparativa y resultaron negativos a dicha prueba previo al desafío. Catorce de los animales fueron inoculados con una dosis de 5×10^2 unidades

library of the CENID- Microbiology. This strain had been originally isolated from the mediastine lymph node of a bovine with tuberculosis. The animals were inoculated via the trachea with six of them remaining as controls to which 2 mL of saline solution were injected in the same manner. The mucus samples were obtained twice with sterile swabs from both nasal passages of each animal at a one-week interval before the animals were inoculated and then at 8, 15, 30, 60 and 90 days after inoculation.

The samples were divided into two: one for bacteriological culture and the other for DNA extraction and M-PCR later on. The bacteriological culture was carried out with the technique described by Payeur *et al.*³ They were grown in duplicate on Stonebrink medium and incubated at 37°C for four weeks. The DNA was extracted using the technique described by Van-Soolingen *et al.*⁷ DNA amplification was carried out using the technique by Talbot *et al.*⁶ Each PCR reaction was carried out with 5 µL of DNA from each sample (20 ng/µL of DNA), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.001% (p/v) gelatin, 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP,* 5 pmol/µL of the primers** ET1 (5' AAG CGG TTG CCG CCG ACC GACC 3') and ET3 (5' GAG GCG ATC TGG CCG TTT GGGG 3'), and 25 pmol/µL of ET2 (5' CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCGG 3') and 1.25 U of Taq polymerase*** in 50 µL final volume. The samples were placed in the thermocycler† with the following program: initial denaturing at 94°C for three minutes, followed by 40 cycles of 94°C for 30 seconds, 65°C for one minute and 72°C for one minute, with a final extension at 72°C for four minutes. As positive controls we included the DNA of a Danish strain of BCG *M. bovis* (ATCC 35734) and the AN5 strain of *M. bovis* (ATCC 35726). The amplification products were visualized in agarose gels at 2% stained with ethidium bromide.

Results

The control group was negative to the M-PCR test at all the time points analyzed (Figure 1, lane 14). Before the animals were inoculated, the results of the two samplings were negative. After the challenge, the bacteriological cultures of the nasal mucus were also negative in all time points analyzed. Nevertheless, the M-PCR carried out from the DNA obtained from the nasal mucus sample at day 60 post-challenge, detected the presence of *M. bovis* DNA in six animals (6/14, 43%) and by day 90, these six animals plus another four were identified as positive (10/14, 71.43%). In all cases a 150 bp DNA product was amplified, which corresponded to the challenging *M. bovis* strain (Figure 1, lanes 4 to 13).

formadoras de colonias (UFC) de *M. bovis* patógena, procedente del cepario del CENID-Microbiología, la cual fue originalmente aislada de un linfonodo mediastínico de un bovino tuberculoso. Los animales se inocularon vía intratraqueal y seis caprinos quedaron como testigos, a éstos se les aplicaron 2 mL de solución salina fisiológica por la misma vía. Las muestras de moco se obtuvieron con hisopos estériles de los dos pasajes nasales de cada animal dos veces, con intervalo de una semana, antes de que los animales se inocularan y después de la inoculación, a los 8, 15, 30, 60 y 90 días.

Las muestras se dividieron en dos: una parte para cultivo bacteriológico y la otra para extracción de ADN, para posteriormente trabajar la PCR-M. El cultivo bacteriológico se realizó con la técnica descrita por Payeur *et al.*³ Se sembraron por duplicado en medio de Stonebrink y se incubaron a 37°C durante cuatro semanas. El ADN se extrajo con la técnica descrita por Van-Soolingen *et al.*⁷ La amplificación del ADN se realizó utilizando la técnica de Talbot *et al.*⁶ Cada reacción de PCR se desarrolló con 5 µL de ADN de cada muestra (20 ng/µL de ADN), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 0.001% (p/v) de gelatina, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato,* 5 pmol/µL de los iniciadores** ET1 (5' AAG CGG TTG CCG CCG ACC GACC 3') y ET3 (5' GAG GCG ATC TGG CCG TTT GGGG 3') y 25 pmol/µL de ET2 (5' CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCGG 3') y 1.25 U de Taq polimerasa*** en un volumen final de 50 µL. Las muestras se trabajaron en el termociclador† con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C durante tres minutos, seguido de 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 65°C por un minuto y 72°C durante un minuto y una extensión final a 72°C por cuatro minutos. Se incluyeron como testigos positivos el ADN de la cepa Danesa de *M. bovis* BCG (ATCC 35734) y de la cepa AN5 de *M. bovis* (ATCC 35726). Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio.

Resultados

El grupo testigo fue negativo al PCR-M en todos los tiempos analizados (Figura 1, carril 14). Antes de que los animales se inocularan, los resultados de los dos muestreos fueron negativos. Después del desafío, los cultivos bacteriológicos de las muestras de moco nasal fueron negativos en todos los tiempos analizados. Sin embargo, la PCR-M realizada a partir del ADN

*GIBCO BRL, S.A de C.V.

**ACCESOLAB, S.A de C.V.

***BIOGENICA, S.A de C.V. (Biotecnologías Universitarias).

†Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400

Discussion

The results obtained in this research study demonstrate the presence of DNA from the challenging strain within the nasal mucus from day 60 post-infection. It is known that bacteriological isolation of mycobacterium is difficult and that a reduced number of viable bacteria in each sample influence the result in the diagnostic. McIlroy *et al.*² state that in order to obtain cultures positive to *M. bovis* from nasal mucus, a minimum sample of 2 to 5 mL is required. This is important because it confirms that the identification of the bacillus through conventional techniques, such as bacteriological culture, has low probability from nasal mucus samples obtained with sterile swabs, as the sample quantity that is recovered is low.¹⁸ It is possible that in this study the number of viable mycobacteria obtained with the swab was not enough to achieve the bacteriological isolation. On the other hand, we demonstrated the advantage of using the M-PCR because it has a greater sensitivity (10/14, 71.43%) than the culture, because it has the capability of identifying the DNA of the few mycobacteria present in the nasal mucus samples and allowed results in a faster time than the established for a positive bacteriological isolation, which is at least four weeks.

It is considered that the sensitivity of PCR for the diagnostic of infectious diseases with DNA obtained from biological samples (nasal mucus) tends to decrease due to factors such as polymerase inhibitors or the presence of DNA from the cellular detritus,¹⁹ along with the fact that the elimination of the

obtenido de la muestra de moco nasal del día 60 posdesafío detectó presencia de ADN de *M. bovis* en seis animales (6/14, 43%) y para el día 90, estos seis animales y cuatro más resultaron positivos (10/14, 71.43%). En todos los casos se amplificó un producto de ADN de 150 pb que correspondió a la cepa de *M. bovis* de desafío (Figura 1, carriles 4 al 13).

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación demuestran presencia de ADN de la cepa de desafío en el moco nasal a partir del día 60 posinfección. Se sabe que el aislamiento bacteriológico de micobacterias es difícil y que un número reducido de bacterias viables en cada muestra influye en el resultado del diagnóstico. McIlroy *et al.*² afirman que para obtener cultivos positivos de *M. bovis* a partir de moco nasal se requieren como mínimo 2 a 5 mL de la muestra, lo anterior es importante porque confirma que la identificación del bacilo por técnicas convencionales, como el cultivo bacteriológico, es poco probable a partir de muestras de moco nasal obtenidas con hisopos por la escasa cantidad de muestra que se recupera.¹⁸ Es posible que en el presente trabajo el número de micobacterias viables obtenidas con el hisopo no fuese suficiente para lograr el aislamiento bacteriológico. Por otro lado, se demostró la ventaja de utilizar la PCR-M porque tiene una sensibilidad mayor (10/14, 71.43%) que el cultivo, ya que tuvo la capacidad de identificar el ADN de las pocas micobacterias presentes en las muestras de moco nasal y permitió obtener resultados en un

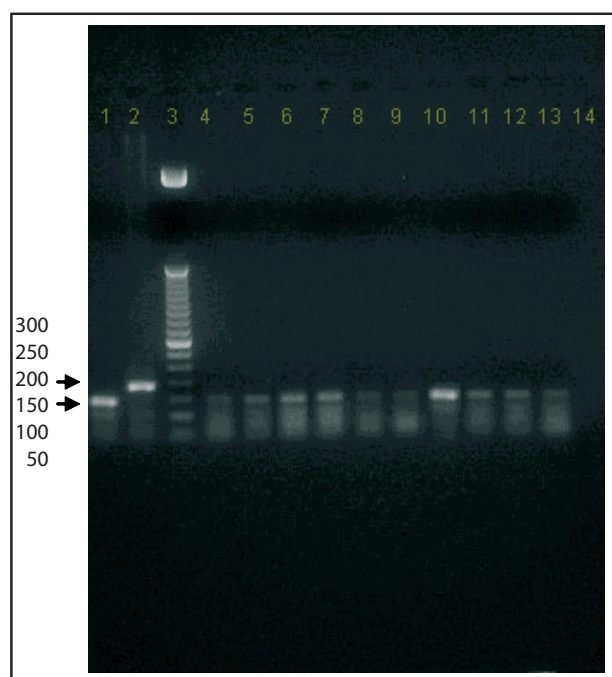


Figura 1. PCR-Multiplex realizado a partir del ADN genómico de los animales infectados al día 90 posinfección. Carril 1) *M. bovis* (Cepa AN5). 2) *M. bovis*-BCG (Cepa danesa). 3) Marcador 50 bp. Carriles: 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13) animales infectados con *M. bovis*. 14) Animal testigo.

Figure 1. Multiplex PCR test on genomic DNA of the animals on day 90 post-infection. Lane 1) *M. bovis* (Strain AN5). 2) *M. bovis*-BCG (Danish strain). 3) Molecular marker 50 bp. Lane 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13) animals infected with *M. bovis*. 14) control animal.

infectious agent is not constant.²⁰ This provides evidence that these factors had an influence in the negative result obtained in four of the inoculated animals, even though they showed characteristic lesions of tuberculosis that were found in the pathological analysis (data not shown). The sensitivity of the M-PCR is considered high, taking into consideration the type of sample from which the DNA was isolated from, because it allowed the identification of 71.43% of the animals inoculated with *M. bovis*.

Several authors have studied the time at which cattle start to eliminate the bacilli; results showed it was between 80 and 100 days post-infection.^{1,2,21} The use of goats as a ruminant experimental model to carry out tuberculosis studies, has been shown to be efficient because at low inoculation dosages (5×10^2 cfu) of *M. bovis* the disease is provoked in less than 90 days,²² with representative lesions of tuberculosis. Therefore, the model is an alternative for developing studies on the disease and for assessing anti-tuberculosis vaccines, and it also represents lower costs and greater ease of handling than when using cattle.²²

In this study, by using a goat model for detecting *M. bovis* by M-PCR, the presence of the bacteria's DNA was detected up to 20 days in advance of what has been described in other studies, giving support to the sensitivity of this test. The elimination pattern of the bacillus and its duration can be different for each animal.^{20,23} This situation could be demonstrated, as at day 60 post-infection only six animals were detected by M-PCR, while at day 90 post-infection an additional four animals were detected. The use of the M-PCR technique to determine, within a herd, which animals could be eliminating the bacillus, would be of great use due to its sensitivity (71.43%) when compared to the sensitivity described for bacteriological isolation which is less than 60%.²⁴ It would also allow the follow up of a reduced number of animals, in order to identify and control the possible sources of infection. At the same time, it will help to better understand the role of infected livestock as a reservoir in the epidemiology of the disease.

Acknowledgements

This project was partially financed by the National Science and Technology Council in Mexico (Conacyt), under project number 28634-B.

Referencias

1. Mc Corry T, Mc Nair J, Skuce RA, Pollock J, Nelly S. Investigation in tonasal shedding *Mycobacterium bovis* from calves infected experimentally with bovine

tiempo menor que el establecido para un aislamiento bacteriológico positivo, que es de por lo menos de cuatro semanas.

Se considera que la sensibilidad de la PCR para el diagnóstico de agentes infecciosos, realizada con ADN obtenido a partir de muestras biológicas (moco nasal), tiende a disminuir debido a factores como son inhibidores de la polimerasa o presencia de ADN del detritus celular,¹⁹ aunado al hecho de que la eliminación del agente infeccioso no es constante,²⁰ lo que permite inferir que estos factores influyeron en el resultado negativo que se obtuvo en cuatro de los animales inoculados; a pesar de que desarrollaron lesiones características de tuberculosis encontradas en el estudio patológico (datos no mostrados). La sensibilidad de la prueba se considera alta, tomando en cuenta el tipo de muestra de la cual se obtuvo el ADN, ya que permitió identificar al 71.43% de los animales inoculados con *M. bovis*.

Diferentes autores han estudiado el tiempo en que los bovinos comienzan a eliminar el bacilo por aerosoles; los resultados mostraron que los animales desafiados comienzan a eliminar los bacilos entre los 80 y 100 días posinfección.^{1,2,21} El empleo de caprinos como modelo experimental rumiante para llevar a cabo estudios sobre tuberculosis ha mostrado ser eficiente, ya que con dosis bajas de inoculación (5×10^2 ufc) de *M. bovis*, la enfermedad se reproduce en menos de 90 días,²² con lesiones representativas de tuberculosis, por lo que el modelo se convierte en una alternativa para desarrollar estudios sobre la enfermedad y para la evaluación de vacunas antituberculosas, además de que representa menores costos y mayor facilidad de manejo que con el uso de bovinos.²²

En el presente trabajo, al utilizar un modelo caprino para la detección de *M. bovis*, utilizando la técnica molecular PCR-M, el ADN de la micobacteria se hizo presente hasta 20 días antes de lo descrito en los estudios mencionados, lo que apoya la sensibilidad de esta prueba. Se ha referido que el patrón de excreción del bacilo y su duración puede ser diferente para cada animal,^{20,23} esta situación se pudo comprobar ya que al día 60 posinfección sólo seis animales fueron detectados por PCR-M y al día 90 posinfección, cuatro animales más fueron positivos, diferentes a los del muestreo anterior. El uso de la técnica PCR-M para determinar dentro de un hato cuáles animales podrían estar eliminando el bacilo, sería de gran utilidad por su sensibilidad (71.43%), comparada con la sensibilidad descrita para el aislamiento bacteriológico, que es menor a 60%,²⁴ además permitiría realizar el seguimiento en un grupo reducido de animales para identificar y controlar las posibles fuentes de infección. Al mismo tiempo,

- tuberculosis. Fifth International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infection. 2002 June 27-30; Stockholm, Sweden: Smittskydds Institute Saltsjöbaden, 2002, p. 119
2. McIlroy SG, Neill SD, McCracken RM. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. *Vet Rec* 1986; 718-721.
 3. Payeur B, Jarnagin L, Marquardt G, Schaper A, Martín M. Manual of laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of Mycobacteria. Ames, Iowa: United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. NSLV, 1993.
 4. Collins DM, Radford AJ, de Lisle GW, Billman-Jacobe H. Diagnosis and epidemiology of bovine tuberculosis using molecular biological approaches. *Vet Microbiol* 1994; 40: 83-94.
 5. Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 1996; 178: 1274-1282.
 6. Talbot EA, Williams DL, Frothingham R. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 566-569.
 7. Van-Soolingen D, de Haas P, Hermans P, Van Embden J. Manual for RFLP analysis of mycobacteria strains. The Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection. Bilthoven, 1989.
 8. Kato-Maeda M, Small PM. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. *West J Med* 2000; 172: 256-259.
 9. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, De Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1143-1147.
 10. Van-Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249: 1-26.
 11. Durr PA, Hewinson RG, Clifton-Hadley RS. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. I. *Mycobacterium bovis* genotyping. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 675-688.
 12. Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis. II. Applications of genotyping. *Rev Sci Tech* 2000; 19: 689-701.
 13. Thierry D, Brisson-Noel A, Vincent-Levy-Frebault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2668-2673.
 14. Hatfull F, Jacobs W. Molecular Genetics of Mycobacteria. Washington DC: ASM PRESS, 2000.
 15. Ratledge C, Dale J. Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence. Oxford: Blackwell Science, 1999.
 16. Young DB. Blueprint for the white plague. *Nature* 1998; 393: 515-516.
 17. Brosch R, Gordon SV, Pym A, Eiglmeier K, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 2000; 290: 143-152.
 18. Lantos A, Niemann S, Mezosi L, Sos E, Erdelyi K, David S *et al.* Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1462-1464.
 19. Suffys P, Vanderborgh P, Pinto-Correa P. Inhibition of the Chain Reaction Samples from tuberculosis patients after processing using a Silica-guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*; 2001 Noviembre 15-18; Rio de Janeiro; Brasil: Fundación Oswaldo Cruz. 2001; p. 1137-1139.
 20. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *Vet J* 2000; 160: 92-106.
 21. Neill SD, O'Brien JJ, McCracken RM. *Mycobacterium bovis* in the anterior respiratory tracts in the heads of tuberculin-reacting cattle. *Vet Rec* 1988; 122: 184-186.
 22. Ramirez C IC, Santillan F MA, Gonzalez V. The goat as an experimental ruminant model for tuberculosis infection. *S Rumin Res* 2003; 47: 113-116.
 23. Neill SD, Bryson DG, Pollock JM. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001; 81: 79-86.
 24. Cavarani S, Fanti F, Conti S, Calderaro A, Foni E, Dettori G *et al.* Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine tissue samples by the Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay and comparison with culture methods. *New Microbiol* 1999; 22: 343-349.

Agradecimientos

Este proyecto fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México, número 28634-B.