

Determinación de la estabilidad genética de una cepa de *Mycobacterium bovis* por infecciones seriadas en cobayos

Genetic stability of a *Mycobacterium bovis* strain by serial infections in guinea pigs

Feliciano Milián Suazo^a, Carlos O. Serna González^a, Víctor Banda Ruíz^b, Georgina Robles $\text{\textcircled{P}}$, Camila Arriaga Díaz^b, Ana María Anaya Escalera^a

RESUMEN

El presente trabajo se realizó para determinar el origen de la variabilidad de la región «direct repeat» (DR) de una cepa de *M. bovis*. Se formaron tres grupos de seis cobayos cada uno, y fueron inoculados intraperitonealmente con una cepa de *M. bovis* obtenida de una lesión de bovino a una dosis de 10^3 microorganismos/animal en forma seriada. Los animales fueron sacrificados cinco semanas posinoculación para obtener muestras de tejidos y hacer el aislamiento del *M. bovis*. Para el análisis molecular se usó la técnica de spoligotyping. De 18 cobayos, 15 lograron vivir hasta la fecha del sacrificio. Todos presentaron algún tipo de lesión, y de 14 de ellos se logró el aislamiento. Se obtuvo ADN de 13 aislados, de los cuales se obtuvieron dos clusters. El primero involucró seis aislados: dos del grupo 1, dos del grupo 2 y dos del grupo 3; el segundo también incluyó seis aislados: tres del grupo 1, dos del grupo 2, y uno del grupo 3. Las cepas de referencia MTB, AN5 y h37rv, cada una formó un spoligotipo diferente. En el caso específico del primer grupo de cobayos se obtuvieron dos clusters: el primero incluyó tres aislados y el segundo dos. Nuevamente las cepas de referencia formaron un spoligotipo diferente. Los resultados indican que la diversidad en la región DR del *M. bovis* en cobayos puede darse a pesar de no haber introducción de fuentes externas de infección, muy probablemente por la generación de mutaciones no letales en la reproducción bacteriana, lo cual podría estar sucediendo en la especie bovina.

PALABRAS CLAVE: Epidemiología, Tuberculosis, *M. bovis*, Bovinos.

ABSTRACT

This research was performed in order to determine the origin of the «direct repeat» (DR) region variability in one *M. bovis* strain when passed serially in guinea pigs. Three 6-guinea-pig groups were inoculated intraperitoneally with 10^3 *M. bovis* organisms/animal, using a strain isolated from a cattle lesion. Five weeks after inoculation the animals were killed. Tissue samples were obtained for *M. bovis* isolation. Fifteen of the 18 guinea pigs survived until sacrifice. All animals showed some type of lesion, and *M. bovis* was isolated from 14 of them. The molecular analysis was performed using the spoligotyping technique. The DNA from 13 isolates was harvested, out of which two clusters were obtained. The first cluster included six isolates: two from group 1, two from group 2, and two from group 3. The second cluster also included six isolates: three from group 1, two from group 2, and 1 from group 3. Each of the three reference strains (MTB, AN5, and h37rv), formed a different spoligotype. Two clusters were obtained specifically from the first group of guinea pigs: the first cluster includes three isolates, and the second cluster included three isolates. Once again, reference strains formed a different spoligotype. Results show that diversity in the DR region of *M. bovis* can occur in guinea pigs even if no external infections sources are present. This is likely to occur due to the generation of non-lethal mutations during bacterial reproduction, and this might be happening also in cattle.

KEY WORDS: Epidemiology, Tuberculosis, *M. bovis*, Cattle.

Recibido el 28 de abril de 2003 y aceptado para su publicación el 22 de junio de 2004.

a CENID-Fisiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Km 1 carretera a Colón 76228, Ajuchitlán, Qro. Tel. 01 (41929) 20036. Correspondencia con el primer autor: milian.feliciano@inifap.gob.mx

b CENID-Microbiología, INIFAP

c Centro Nacional de Servicio de Diagnóstico en Salud Animal (CENASA).

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) humana es la enfermedad más importante como causa única de morbilidad y mortalidad en muchos países⁽¹⁾; si bien las infecciones con el virus de la inmunodeficiencia humana VIH⁽²⁾, la presencia de enfermedades concurrentes⁽³⁾, la desnutrición, la sobrepoblación, y la falta de recursos económicos para enfrentar a la enfermedad, hacen de éste un problema de difícil solución. En 1990, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 8 millones de casos activos en el mundo, 7.6 millones en países pobres, y 400 mil en países industrializados⁽²⁾. Las muertes por tuberculosis en ese año fueron de 2.9 millones, la mayoría de ellas en el tercer mundo. En México la TB ha incrementado su incidencia hasta en un 100 % en algunos Estados en sólo un año⁽⁴⁾. Aunque en el humano es causada principalmente por *M. tuberculosis*, también lo puede ser por *M. bovis*, causante del problema en los bovinos.

La tuberculosis bovina es un problema grave en ganado lechero, con una prevalencia del 16 % y tendencia creciente en establos que no participan de la campaña⁽⁵⁾. Varios estudios han demostrado diversidad genética en cepas de *M. bovis* en poblaciones bovinas^(5,6,7,8), con resultados controversiales en cuanto a su origen. Algunos dicen que ésta se debe a la alta tasa de mutaciones no letales de las micobacterias por el tipo de reproducción clonal que manifiestan⁽⁵⁾, otros, que se debe a la indiscriminada movilización de animales entre explotaciones⁽⁶⁾. Milián-Suazo *et al.*⁽⁵⁾ basan su hipótesis en el hecho de que en un análisis discriminante de *M. bovis* encontraron un índice de asociación de 1.13 ± 0.14 , muy parecido al de otras bacterias de reconocida reproducción clonal, y en que a través de un cuestionario a productores se encontró que menos del 5 % de las explotaciones lecheras encuestadas (n= 76) en diferentes regiones de México, venden o compran animales de otras explotaciones lecheras, lo que hace poco probable la mezcla de animales. Perumaalla *et al.*⁽⁶⁾ por su lado, aseveran que en un estudio en una sola explotación lechera se encontró la misma cepa de *M. bovis* después de 10 años, estudio que no coincide con los resultados de otros^(5,7,9). Las

INTRODUCTION

Human tuberculosis (TB) is the single most important cause of morbidity and mortality⁽¹⁾ in many countries. Human immunodeficiency virus (HIV)⁽²⁾, concurrent diseases⁽³⁾, malnutrition, overcrowding, and poverty, make TB a hard-to-solve problem. In 1990 the World Health Organization (WHO) reported 8 million active cases of TB in the world, out of which 7.6 millions occurred in poor countries, and 400,000 occurred in industrialized countries⁽²⁾. That particular year, TB was responsible for 2.9 million deaths, mostly in the 3rd world. In some Mexican states, the incidence of TB has been increased in 100 % in only one year⁽⁴⁾. Even though human TB is mainly caused by *M. tuberculosis*, it can also be caused by *M. bovis*, which is the etiology of TB in cattle.

TB is a serious problem in dairy cattle, with a 16 % prevalence and a growing trend in those dairies non participating in Mexico's TB campaign⁽⁵⁾. Several studies have shown genetic diversity among *M. bovis* strains infecting cattle populations^(5,6,7,8), with controversial results regarding to origin. Some authors say that such genetic diversity is due to the high rate of non-lethal mutations, due to the clonal type of reproduction used by mycobacteria⁽⁵⁾, while others attribute this fact to the indiscriminate movement of animals among dairies⁽⁶⁾. Milián-Suazo *et al.*⁽⁵⁾ base their hypothesis in the fact that in a discriminating analysis of *M. bovis* a 1.13 ± 0.14 association index was found, similar to that observed in other bacteria with recognized clonal reproduction. In addition, in a survey among producers it was found that in < 5 % of responding dairies (n= 76) in different regions of Mexico, cattle are sold or purchased from other dairies, which results in reduced likelihood of mixing animals. On the other hand, Perumaalla *et al.*⁽⁶⁾ reported that –unlike studies performed elsewhere^(5,7,9)– the same *M. bovis* strain was found after 10 years in one single dairy. Molecular techniques can be highly useful in solving this problem^(10,11). For example, one spoligotyping-based study⁽¹¹⁾ determined 35 different genetic types with 273 isolates, many of which were grouped by origin⁽⁸⁾. A different study⁽⁷⁾ found that isolates

técnicas moleculares pueden ser de mucha ayuda para resolver este problema^(10,11); por ejemplo, usando espoligotiping⁽¹¹⁾ en un estudio se determinaron 35 tipos genéticos diferentes con 273 aislados, muchos agrupados por origen⁽⁸⁾. Otro estudio⁽⁷⁾ encontró que aislados de jabalí y venado presentaban el mismo patrón genético que los bovinos de una misma región, sugiriendo transmisión directa. En México 62 aislados de *M. bovis* analizados con esta técnica formaron diferentes grupos genéticos; sin embargo no se pudieron agrupar aislados por región geográfica, indicando alta diversidad genética⁽⁸⁾. Por lo tanto, el presente trabajo se desarrolló con el fin de determinar el origen de la diversidad de la región «direct repeat» (DR) de una cepa de *M. bovis* por medio de infecciones intraperitoneales seriadas a tres grupos de cobayos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa de *M. bovis* se obtuvo de una lesión de bovino proveniente del estado de Jalisco, que se mantuvo en congelación por un periodo de dos años. Antes de la infección, la cepa fue resuspendida en medio líquido de Middlebrook 7H10 con 4.16 mg de piruvato de sodio/ml y enriquecido con 10% (vol/vol) de OADC. Posteriormente fue inoculada intraperitonealmente a dos cobayos para su reactivación. Inicialmente esta cepa reactivada fue inoculada por vía intraperitoneal a una dosis de 10^3 bacilos por animal a un grupo de seis cobayos, cruza de la raza Dunkin-Hartley de entre 400 y 500 g, y luego recuperada de lesiones en hígado, bazo, pulmón, linfonodo mesentérico, y piel cuando se presentó lesión en la zona de inoculación. La cepa de infección para el segundo grupo de cobayos fue aquella obtenida del primer grupo, y la cepa de infección para el tercer grupo fue la obtenida del segundo grupo de cobayos. Los grupos de cobayos fueron totalmente independientes entre sí.

Cuatro semanas después de la infección los animales fueron sacrificados mediante la inhalación de cloroformo a las vías respiratorias. Posteriormente se disecaron para la obtención de los órganos mencionados, los cuales fueron identificados con

from wild boar and deer showed the same genetic pattern as those from cattle in the same region, suggesting direct transmission. In Mexico, the spoligotyping of 62 *M. bovis* isolates formed different groups, indicating high genetic diversity⁽⁸⁾. Even though, they were not able to be grouped by region. This research was performed in order to determine the origin of genetic diversity in the «direct repeat» (DR) region of a *M. bovis* strain, using serial intraperitoneal infections in three groups of guinea pigs.

MATERIALS AND METHODS

The *M. bovis* strain used for infection was obtained from a cattle lesion in the State of Jalisco. This strain had been maintained frozen for three years. Prior to inoculation, the strain was reactivated by re-suspension in Middlebrook's 7H10 liquid medium with 4.16 mg sodium pyruvate/mL, enriched with 10% (v/v) OADC, and inoculated to two guinea pigs. The reactivated strain was initially inoculated intraperitoneally at a dose of 10^3 bacterial organisms per animal, to a group of six cross-breed Dunkin-Hartley guinea pigs with a body weight of 400 to 500 g. The strain was further recovered from liver, spleen, lung, mesenteric lymph node and skin lesions, when lesions were detected in the inoculation site. The strain recovered from the first group of guinea pigs was used to infect the second group, and so on. Guinea pig groups were totally independent from each other.

Four weeks after infection, animals were killed by chloroform inhalation, dissected and the above-mentioned organs collected. Organ samples were identified using one letter followed by one digit (i.e.: group number), then one dot, and a second digit (i.e.: animal number within the group). *M. bovis* isolation was performed following the protocol recommended by the APHIS-USDA Mycobacteriology Laboratory⁽¹³⁾.

M. bovis isolates were molecularly analyzed by spoligotyping, which involves genomic DNA extraction and amplification of the variable zone of the DR regions. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using the following primers: DRa

una literal unida a dos dígitos separados por un punto, el primer dígito indicaba el número del grupo, y el segundo en número del cobayo dentro del grupo. Para el aislamiento del *M. bovis* se utilizó el protocolo recomendado por el laboratorio de micobacteriología de APHIS-USDA en los Estados Unidos⁽¹³⁾.

El análisis molecular de los aislados de *M. bovis* en cada grupo de animales se realizó utilizando el método de espigototyping, el cual consistió en la extracción del ADN genómico de los aislados obtenidos de los animales infectados. Posteriormente se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias espaciadoras utilizando los iniciadores DRa y DRb: 5'-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3' marcado con biotina en la terminación 5', y 5'-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3, respectivamente. La mezcla total para el PCR fue de 50 ml, y se utilizó el siguiente protocolo de amplificación: 1 ciclo a 96 °C por 3 min, y 20 ciclos a 96 °C por un min, seguido por 55 °C por 1 min y 72 °C por 30 seg. Los productos de la PCR fueron hibridados con oligonucleótidos previamente fijados a una membrana de nylon (37 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* h37Rv y 6 de *M. bovis* AN5). Después de la eliminación del producto que no hibridó se hizo la detección de la hibridación del aislado probado con los oligonucleótidos conocidos pegados a la membrana.

Los patrones genéticos individuales de los aislados fueron utilizados para calificar la presencia (1) o ausencia (0) de bandas específicas de acuerdo a las secuencias espaciadoras fijadas a la membrana. Con esta calificación se elaboró una matriz de 1's y 0's que fue utilizada para determinar el índice de distancia genética entre pares de aislados siguiendo la fórmula de Nei y Li⁽¹⁴⁾; donde la distancia genética ($D=1-S$) se deriva de la fórmula:

$$S = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

Donde N_{ab} es el número de bandas que los aislados a y b tienen en común, N_a es el número de bandas en el aislado a, y N_b es el número de bandas en el aislado b.

and DRb: 5' -GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3,' labeled with biotin in the 5' end, and 5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3, respectively. The total mix volume used for PCR was 50 ml, with the following amplification protocol: one cycle at 96 °C for 3 min, and 20 cycles at 96 °C for 1 min, followed by 55 °C for 1 min, and 72 °C for 30 sec. PCR products were hybridized with oligonucleotides previously attached to a nylon membrane (37 spacer sequences of *M. tuberculosis* h37Rv, and 6 spacer sequences of *M. bovis* AN5). After discarding the non-hybridizing product, hybridization of the tested isolates with the known membrane-fixed oligonucleotides was detected.

Individual isolate genetic patterns (fingerprints) were used to score either the presence (1) or absence (0) of specific bands in agreement with the spacer sequences attached to the membrane. Scores were used to prepare a 1's / 0's matrix, which was then used to determine the genetic distance index between pairs of isolates following the Nei and Li's formula⁽¹⁴⁾; in which the genetic distance ($D=1-S$) derives from the following equation:

$$S = 2 N_{ab} / (N_a + N_b)$$

Where: N_{ab} is the number of bands that isolates a and b have in common; N_a is the number of bands in isolate a and N_b is the number of bands in isolate b.

The genetic distance matrix was subjected to a cluster statistical analysis following the procedure described by Sneath and Sokal⁽¹⁵⁾, known as UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method Average). Statistical analyses were performed using the SPSS® software, version 9 for Windows®. Genetic distance was determined using the "Squared Euclidean Distance" procedure, with the "Hierarchical cluster" option and the "Nearest Neighbor" grouping method. A dendrogram was finally prepared.

RESULTS AND DISCUSSION

From a total of 18 guinea pigs inoculated, 15 survived throughout the experiment, until sacrifice

Cuadro 1. Órganos con presencia de lesiones compatibles a tuberculosis en cobayos infectados de manera seriada para determinar estabilidad genética de *M. bovis*Table 1. Organs with lesions compatible with tuberculosis in guinea pigs infected in a serial fashion, in order to determine the genetic stability of *M. bovis*

| Affected organ | Reactivation group | Group 1 | Group 2 | Group 3 |
|-----------------------|--------------------|---------|---------|---------|
| Skin | 0 | 0 | + | + + + + |
| Spleen | + | + + + | + + + | + + + |
| Liver | + + + | + + | 0 | + + |
| Lung | 0 | + | + + | + |
| Mesenteric lymph node | + + + + | + + + + | + + + + | 0 |
| Growing time (days) | 40 | 38 | 33 | 28 |

La matriz de las distancias genéticas fué sometida a un análisis estadístico de clusters siguiendo el procedimiento de Sneath y Sokal⁽¹⁵⁾ conocido como UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method Average). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete SPSS® versión 9 para Windows®. La distancia genética se determinó utilizando el procedimiento de “Squared Euclidean Distance” con la opción de “Hierarchical cluster” y “Nearest Neighbor” como el método de agrupamiento, con la elaboración final de un dendrograma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 18 cobayos inoculados, 15 vivieron hasta el momento del sacrificio y 3 murieron por razones ajenas a la infección. Los 15 sobrevivientes fueron sacrificados a las cinco semanas post-inoculación; todos presentaron algún tipo de lesión en mayor o menor grado (Cuadro 1), y de las muestras obtenidas, de 14 se logró aislar *M. bovis*.

El órgano con las lesiones más notorias fue el linfonodo mesentérico; el hígado y el bazo presentaron gran cantidad de lesiones diminutas en la superficie, sin embargo, las lesiones en pulmón no aparecieron en todos los animales, y en aquéllos que aparecieron fueron muy escasas. La mayor parte de las lesiones en el tercer grupo de animales aparecieron en la piel en el sitio de la inoculación, de donde también fue posible hacer el aislamiento. El periodo de incubación fue diferente para los

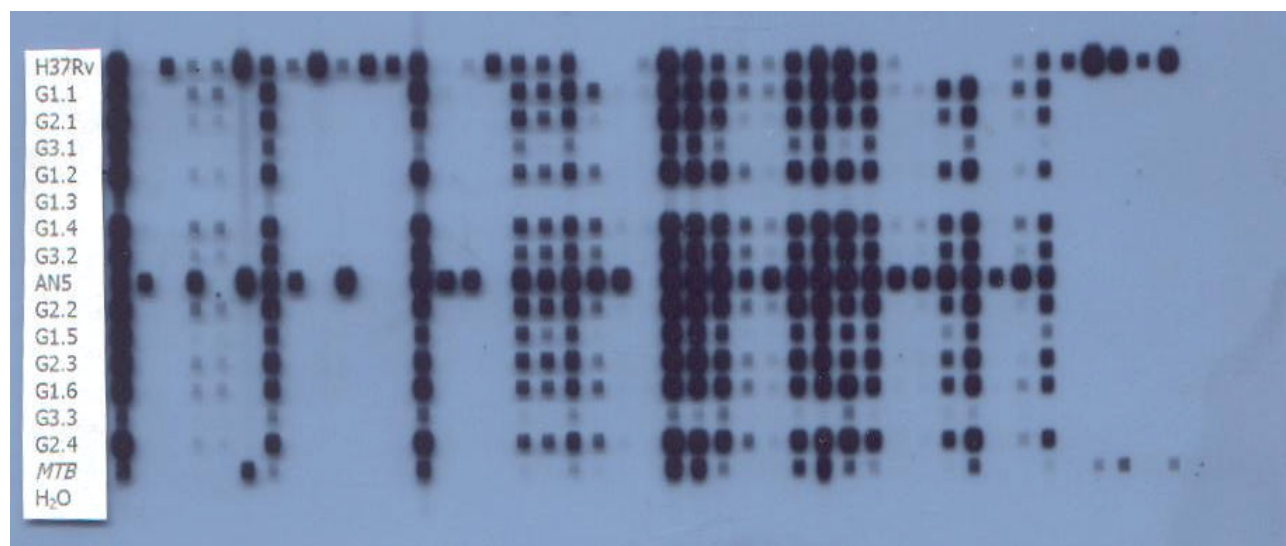
date. The remaining three animals died due to non infection-associated causes. The 15 surviving guinea pigs were killed 5 wk post-challenge. All of these animals showed one type of lesion in a higher or lesser degree (Table 1). *M. bovis* was isolated from 14 of all samples obtained. The organ with the most evident lesions was the mesenteric lymph node. Liver and spleen showed a great amount of surface pin point lesions. Lung lesions were not present in all animals and –if any– they were very scarce. Most lesions in the 3rd group of animals appeared in the skin around the inoculation site, and the bacterium was also isolated from this point. Incubation period varied among guinea pig groups. Incubation period in group 2 was shorter than that in group 1 (38 vs 33 d).

Incubation period in group 3 was even shorter than that in group 2 (28 d). Guinea pig clinical signs included: inappetence, depression, rough hair, and weakness at an average of 24 d postinfection. *M. bovis* isolation from lesions was achieved approximately at 33 d postinfection.

Genomic DNA was extracted from 13 of the 14 samples processed. Even though the remaining sample showed the presence of *M. bovis* by culture, DNA was not extracted in a sufficient amount as to perform the corresponding analysis, supposedly due to extraction method failure. The molecular analysis was performed by spoligotyping. Nylon membrane hybridization points are shown in Figure 1.

Figura 1. Patrón genético (puntos de hibridación en la membrana de nylon) de los diferentes aislados de *M. bovis* obtenidos con espoligotiping de tres grupos de cobayos infectados en forma seriada

Figure 1. Genetic pattern (hybridization points in the nylon membrane) of the different *M. bovis* isolates obtained by spoligotyping, from three groups of serially-infected guinea pigs



distintos grupos de cobayos, el del segundo grupo fue más corto que el del primero (38 vs 33 días), y el del tercero aún menor que el del segundo (28 días). Los signos clínicos que se notaron en los cobayos fueron: inapetencia, recogimiento, pelo hirsuto, y debilidad a los 24 días promedio postinfección. El aislamiento del *M. bovis* en cultivo a partir de lesiones se logró aproximadamente al día 33 posinfección.

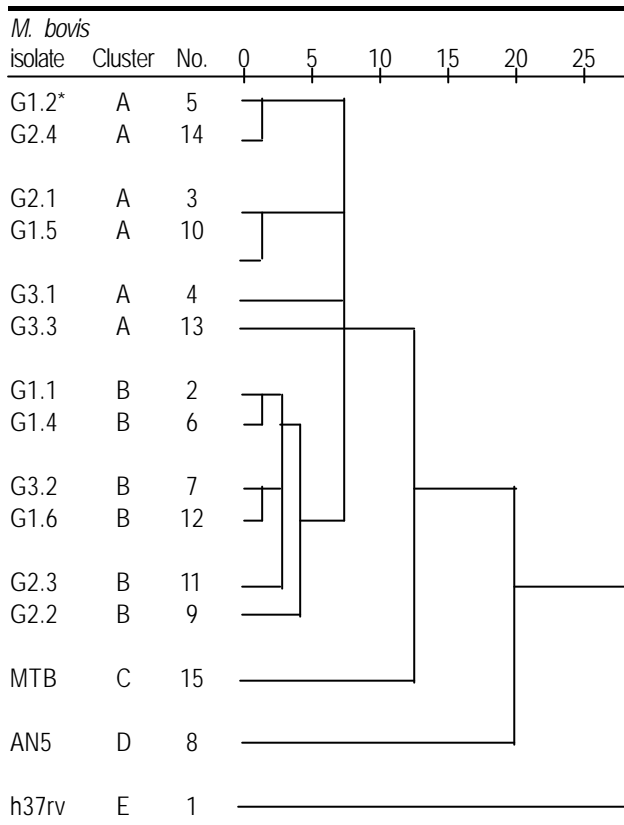
De un total de 14 muestras procesadas se logró extraer ADN genómico de 13, y aunque la muestra restante mostraba la presencia de *M. bovis* en el cultivo, por fallas atribuidas al método de extracción no se pudo obtener ADN suficiente para realizar el análisis respectivo. Para el análisis molecular se utilizó espoligotiping, los puntos de hibridación en la membrana de nylon se presentan en la Figura 1. De las 13 muestras trabajadas por este método se obtuvieron dos grupos genéticos o clusters (Figura 2). Por conveniencia, los clusters fueron nombrados A y B, y a las cepas de referencia le fueron asignados los clusters C, D y E. El cluster A incluyó seis aislados: dos del grupo 1 de cobayos (G1.2 y G1.5), dos del grupo 2 (G2.1 y G2.4), y dos del grupo

Two genetic groups or clusters were obtained from the 13 samples analyzed with this method (Figure 2). For convenience, clusters were named A and B, and the reference strains were named as clusters C, D, and E. Cluster A included six isolates: two from guinea pig Group 1 (G1.2 and G1.5), two from Group 2 (G2.1 and G2.4), and two from Group 3 (G3.1 and G3.3). Cluster B also included six isolates, i.e.: three from guinea pig Group 1, two from Group 2, and one from Group 3. Each of reference strains MTB, AN5, and h37rv formed a different spoligotype. It was considered that isolate G1.3 represented a biased value, since it only showed one hybridization point, thus confusing the results. It was therefore discarded from the statistical analysis.

The lack of hybridization in this isolate could have been due to the mistaken lack of addition of one reagent to the PCR mix, even though, the reaction could not be repeated since no more DNA was This would be the first report in the literature attempting to determine the origin of the genetic diversity observed in *M. bovis* strains in the field.

Figura 2. Dendrograma de los grupos genéticos formados por los aislados de *M. bovis* obtenidos de tres grupos de cobayos infectados en forma seriada

Figure 2. Dendrogram of the genetic groups formed with the *M. bovis* isolates obtained from three groups of serially-infected guinea pigs



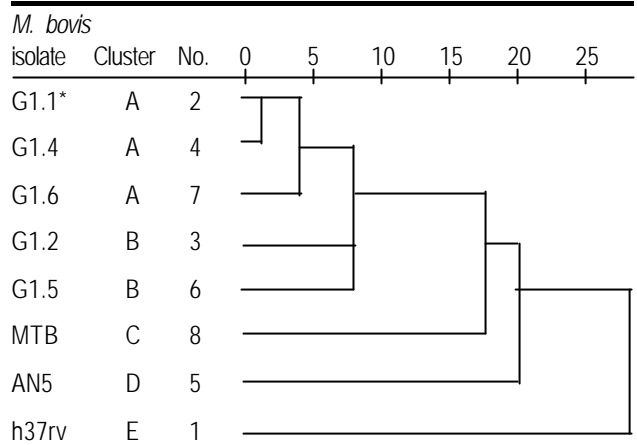
*The first digit stands for group number; the second digit represents the guinea pig number within the group.

No= shows the spoligotype number.

3 (G3.1 y G3.3). El cluster B también incluyó seis aislados: tres del grupo 1 de cobayos, dos del grupo 2 y uno del grupo 3. Las cepas de referencia MTB, AN5 y h37rv cada una formó un espoligotipo diferente. Por considerarse que el aislado G1.3 representaba un valor sesgado puesto que sólo presentó un solo punto de hibridación, y esto traía confusión a los resultados, éste fue eliminado del análisis estadístico. La falta de hibridación para este aislado pudo haberse debido a la falta de algún reactivo a la mezcla del PCR, sin embargo, debido a la falta de ADN no se pudo repetir la reacción.

Figura 3. Dendrograma de los grupos genéticos formados con los aislados de *M. bovis* del primer grupo de cobayos

Figure 3. Dendrogram of the genetic groups formed with the *M. bovis* isolates from the first group of guinea pigs



*The first digit stands for group number; the second digit represents the guinea pig number within the group.

No= shows the spoligotype number.

Our results show that the genetic diversity of *M. bovis* strains occurs even though no animals from different origins are co-mingled. This differs from other documented reports⁽⁶⁾, but supports the findings published by Milián-Suazo *et al.*⁽⁵⁾, who stated the possibility of non-lethal mutations during bacterial reproduction, after having found a clonal trend in such process. This unquestionably discards the genetic recombination of *M. bovis* strains, characteristic of other types of reproduction.

Given the presence of different spoligotypes observed from the very first group of animals, the question of where do mutations resulting in new genetic lines occur, remains pending. Such mutations can occur in three different sites, i.e.: in the culture medium used for isolation, in the tissue lesion from which the original strain was obtained, or in the tissues of infected guinea pigs. In order to confirm these results, further research with a higher degree of control is needed. For example: using genetically identical guinea pigs; using a *Mycobacterium* from one single colony, instead of the classic medium-surface scraping where several different strains can exist; performing several

Con el fin de conocer el comportamiento molecular de la cepa en el primer grupo de cobayos, se hizo un análisis molecular de los aislados de dicho grupo. Fue inesperado observar que la cepa en esta primera infección ya presentaba variabilidad de las DRs (Figura 3), de los cinco aislados analizados se obtuvieron tres espoligotipos diferentes y sólo dos presentaron patrón genético similar.

Este trabajo sería el primer reporte en la literatura donde se busca determinar el origen de la diversidad genética observada en una región específica del *M. bovis* de campo. Los resultados obtenidos muestran que la diversidad genética de cepas de *M. bovis* se presenta aún cuando no existe mezcla de animales de diferente origen, lo que difiere con lo reportado en otras publicaciones⁽⁶⁾, y apoyan los hallazgos de Milán-Suazo *et al.*⁽⁵⁾, quienes mencionan la posibilidad de mutaciones no letales en la reproducción bacteriana al haber encontrado una tendencia clonal de dicho proceso, lo que indudablemente elimina la recombinación genética de las cepas de *M. bovis*, que es característica de otro tipo de reproducción.

Dada la presencia de diferentes espoligotipos observada desde el primer grupo de animales, queda la duda de dónde se dan las mutaciones que dan origen a nuevas líneas genéticas. Estas pueden ocurrir en tres lugares: pudieron haberse dado en el medio de cultivo de donde se obtuvo el aislamiento, en la lesión del tejido afectado de donde la cepa original fue obtenida, o en los tejidos de los cobayos infectados. Para confirmar los resultados obtenidos sería necesario realizar trabajos con mayor grado de control: por ejemplo, utilizar cobayos genéticamente iguales, utilizar micobacterias de una sola colonia y no hacer el clásico raspado de la superficie del medio donde muchas cepas pueden estar presentes, hacer varios aislamientos de una misma lesión y hacer un análisis molecular de varias colonias en los diferentes cultivos; además del análisis de los aislados obtenidos de los cobayos. De cualquier modo, la importancia que la diversidad genética de cepas de *M. bovis* en las poblaciones blanco aún requiere de mucha investigación, para así profundizar en el conocimiento que esto pudiera tener en la epidemiología de la tuberculosis.

isolations from one same lesion; and performing one molecular analysis from several colonies in the different cultures, in addition to the isolates obtained from guinea pigs. Anyhow, the importance of genetic diversity in *M. bovis* strains among the target population still requires intense research, in order to learn more about the meaning of these findings in the epidemiology of TB.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

It is concluded that the mix of strains expected from the indiscriminate movement of animals among regions is not necessary for *M. bovis* DR region diversity to occur in animal populations. It seems that the generation of new genetic lines derived from non-lethal mutations that occur during bacterial reproduction plays a very important role in the genetic diversity of *M. bovis* observed in cattle populations in Mexico and other countries.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Queretaro's Livestock Promotion Committee (*Comité de Fomento Pecuuario del Estado de Querétaro*), and GB Ranch for their cooperation with this project. This project was partially funded by Mexico's National Science and Technology Council (*CONACYT*).

End of english version

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se concluye que para que la diversidad de la región DR de *M. bovis* se presente en las poblaciones animales, no es necesaria la mezcla de cepas esperada por una indiscriminada movilización de animales entre regiones; parece ser que la generación de nuevas líneas genéticas derivadas de las mutaciones no letales dadas en la reproducción bacteriana, juegan un papel importante en la diversidad genética de *M. bovis* observada en las poblaciones bovinas de México y de otros países.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Comité de Fomento Pecuario del estado de Querétaro y al Rancho GB las facilidades proporcionadas para el desarrollo del presente proyecto, el cual fue parcialmente financiado por CONACYT.

LITERATURA CITADA

1. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi MC. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. Bull World Health Organization 1994;172:211-220.
2. Daborn CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. Br Vet J 1993;149:403-408.
3. Chávez A, de Chavez MM, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, *et al.* La nutrición en México y la transición epidemiológica. División de Nutrición en Comunidad. INNSZ, México. 1993.
4. Vaca-Marín MA, Tlacuáhuac Ch, Olvera-Castillo, R. Tuberculosis pulmonar entre sintomáticos respiratorios detectados en las unidades de salud de la SSA, en el Estado de Tlaxcala, México. Rev Inst Nal Enf Resp Méx 1999;12(1):29-34.
5. Milián-Suazo F, Salman M, William CB, Triantis J, Ramirez C, Payeur J, Torres M. Molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Mexico. Am J Vet Res 2000;61(1):90-95.
6. Perumaalla VS, Adamas LG, Payeur JB, *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Texas and Mexico. J Clin Microbiol 1996;34(9):2066-2071.
7. Aranaz A, Liébana E, Mateos A, Dominguez L, *et al.* Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996;34(11):2734-2740.
8. Milián-Suazo F, Banda-Ruiz V, Ramírez CC, Arriaga DC. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within México. Prev Vet Med 2002;55:255-264.
9. Cousins D, Williams S, Liébana E, *et al.* Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 1998;36(1):168-178.
10. Van Embden JD, Cave D, Crawford JT, Dale JW, Eisenach D, Gicquel B, Hermans P, *et al.* Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993;31:406-409.
11. Romano MI, Alito A, Fisanotti JC, Bigi F, Kantor Y, *et al.* Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. Vet Microbiol 1996;50:59-71.
12. Kamerbeek J, Schouls M, van Agterveld M, Kolk A, *et al.* Simultaneous strain detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997;35:907-914.
13. Payeur JB, Jarnagin JL, Marquardt JJ, Schaper LA, *et al.* Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for isolation and identification of mycobacteria, NVSL, USDA, APHIS, Ames, Iowa. 1992.
14. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetical variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci (USA) 1979;74:5267-5273.
15. Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy: the principals and practice of numerical classification. CA, USA: W.H. Freeman & Co; 1973.

