

Genotipificación por VNTR de aislados de *Mycobacterium bovis* de ganado sacrificado en Baja California, México

VNTR for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle slaughtered in Baja California, Mexico

Carlos Martínez-Vidal^a, Sawako Hori-Oshima^a, Alfonso De la Mora-Valle^a, Rosa María Bermúdez-Hurtado^b, Tomás Benjamín Rentería-Evangelista^b, Gilberto López-Valencia^b, Leopoldo Javier Galván-Lara^c, Gerardo Enrique Medina-Basulto^a

RESUMEN

En México, la tuberculosis bovina (TBB) es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional. Las diferentes técnicas de genotipificación pueden ayudar a establecer la relación que existe entre las diferentes cepas presentes en una región y determinar algunos factores que incidan posteriormente en los programas de control y erradicación de la enfermedad. En el presente trabajo se aplicó la técnica de número variable de repeticiones en secuencia (VNTR) a 11 aislados provenientes de ganado sacrificado en un rastro de Mexicali BC, y a 10 aislados de ganado sacrificado en un rastro de Tijuana. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar los loci ETR-A, ETR-B, QUB-11a, QUB-11b, QUB-1895, QUB-26, QUB-3232 y QUB-3336, determinándose el parentesco relativo entre las cepas aisladas, así como el poder discriminatorio para cada locus en particular y para todos los loci en su conjunto. Se obtuvieron 14 perfiles alélicos al utilizar los ocho loci con un poder discriminatorio de 0.90 siendo el locus QUB 3336 el que mostró el mayor poder discriminatorio ($h=0.72$) en tanto el locus ETR-B mostró un nulo poder discriminatorio ($h=0.00$). En un dendrograma, se observaron seis grupos genéticos, en los cuales se encuentran indistintamente aislados de Tijuana y Mexicali Baja California; sin embargo, se encontraron genotipos específicos para cada una de las dos regiones. Los resultados sugieren que aunque el movimiento de ganado y la compra-venta en la región han provocado la dispersión de cepas en estas dos áreas, se puede discernir el origen de la mayoría de los aislados.

PALABRAS CLAVE: *M. bovis*, MIRU-VNTR, Genotipificación, México, Baja California.

ABSTRACT

In Mexico, bovine tuberculosis (TB) is one of the main problems which face the national livestock sector. Currently, there are molecular methods for the detection and genotyping of bovine TB, making it possible to determine the relationship between the different strains present in the region and identify some factors influencing the control and eradication programs of the disease in Baja California. In this work the variable-number tandem repeat (VNTR) technique was applied to 11 isolates from cattle slaughtered in a slaughterhouse in Mexicali BC and 10 isolates from cattle slaughtered in a slaughterhouse in Tijuana BC. Specific primers were used to amplify ETR-A, ETR-B, QUB-11a, QUB-11b, QUB-1895, QUB-26, QUB-3232 and QUB-3336 loci, determining the relationship among the isolates, and discriminatory power for each locus in particular and for all loci as a whole. Fourteen allelic profiles were obtained when using eight loci with a discriminatory power of 0.90. The QUB-3336 locus showed the highest discriminatory power ($h=0.72$) and the ETR-B locus showed no discriminatory power ($h=0.00$). In a dendrogram, there were six genetic groups with isolates from Tijuana and Mexicali, but some isolates were observed only in one of these areas. The results showed that the movement of livestock and purchase market in the region has led to the dispersal of strains in these two areas; nevertheless, it is possible to differentiate some isolates exclusive of each region.

KEY WORDS: *M. bovis*, VNTR, Genotyping, Mexico, Baja California.

Recibido el 31 de enero de 2011. Aceptado el 13 de junio de 2011.

^a Lab. Biología molecular, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California. Carretera Mexicali-San Felipe Km. 3.5 S/N Fracc. Laguna Campestre. 21386. Mexicali, Baja California, México. Tel/Fax: (686)5.63.69.06 ext. 133. gerardom@uabc.edu.mx. Correspondencia al último autor.

^b Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California.

^c Rastro TIF 54.

Trabajo apoyado por la 13^{av} Convocatoria interna de apoyo a proyectos de investigación UABC. Carlos Martínez fue estudiante becado por CONACYT durante el periodo de esta investigación.

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infecto contagiosa crónica causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*, la cual se presenta también en fauna silvestre y en humanos, generando fuertes problemas, tanto económicos como de salud pública⁽¹⁾.

La TBB se encuentra en la lista de enfermedades con fuertes repercusiones socioeconómicas y de salud pública según la Organización Mundial de Salud Animal⁽²⁾. La tuberculosis en humanos, causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* es una enfermedad con una prevalencia alta en países en vías de desarrollo, detectándose anualmente hasta 20 millones de casos nuevos en el mundo, de los cuales entre 0.5 y 5 % son debidos a *M. bovis*^(3,4).

En México, la TBB es uno de los principales problemas que enfrenta la ganadería nacional, debido a la alta prevalencia en bovinos productores de leche (16 % en general), provocando pérdidas económicas directas e indirectas⁽⁵⁾.

M. bovis posee un genoma de 4'345,492 pb, con 4,003 genes que codifican para 3,952 proteínas y 50 RNAs estructurales, incluye un profago y 42 secuencias de inserción (IS). Estructuralmente *M. bovis* además, contiene aproximadamente 65 % de G+C, lo que se refleja en el contenido de aminoácidos básicos de sus proteínas, en la mayoría enzimas necesarias para su pared celular. El genoma de *M. bovis* tiene más del 99.95 % de identidad con *M. tuberculosis*^(6,7,8).

La mayoría de los cambios del genoma del complejo de *M. tuberculosis* se han asociado a elementos móviles como las secuencias de inserción (IS), constituidas por fragmentos pequeños de DNA capaces de auto-insertarse dentro del genoma de la micobacteria y conferir polimorfismo entre las cepas⁽⁷⁾. La genotipificación de *M. bovis* tiene una gran importancia en todo el mundo, en especial cuando se tratan de determinar fuentes de infección y diseminación. De este modo, se puede deducir que cepas de *M. bovis* con idéntico genotipo tienen muy probablemente el mismo origen, y que cepas con genotipo diferente provienen de diferentes lugares o fuentes de infección; esto nos permite por ejemplo,

Bovine tuberculosis (TB) is a chronic infectious and contagious disease caused by *Mycobacterium bovis*, which also affects wildlife and humans, generating public health problems and economic impact⁽¹⁾.

According to the World Health Organization, bovine TB is found in the list of diseases which are of serious socio-economic or public health consequence⁽²⁾. Tuberculosis in humans, mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is a disease with high prevalence in developed countries, with an annual detection of 20 million new cases worldwide, of which 0.5 and 5 % are caused by *M. bovis*^(3,4).

In Mexico, bovine TB is one of the main problems which face the national livestock sector, due to high prevalence in dairy cattle (16 % in general), causing direct and indirect economic losses⁽⁵⁾.

M. bovis has a genome of 4'345,492 bp with 4,003 genes that encode for 3,952 proteins and 50 structural RNAs, including a prophage and 42 insertion sequences (IS). Structurally, *M. bovis* has approximately 65 % of G + C, which reflects in the content of basic amino acids of its proteins, in the majority, necessary enzymes for its cellular wall. The genome sequence of *M. bovis* is > 99.95 % identical to that of *M. tuberculosis*^(6,7,8).

The majority of changes of *M. tuberculosis* complex genome have been associated with mobile elements such as the insertion sequences (IS), constituted by small fragments of DNA capable to auto-insert in the genome of the mycobacterium and confer polymorphism among the strains⁽⁷⁾. *M. bovis* genotyping has great importance worldwide, especially when sources of infection and dispersal are trying to be determined. Hence it can be assumed that *M. bovis* strains with identical genotype have very probably the same origin, and that strains with different genotype come from different places or infection sources; this allows, for instance, to determine if a newly arrived animal is the cause of a tuberculosis outbreak⁽⁹⁾.

Spoligotyping and VNTR of *M. bovis* isolates have been the main genotyping techniques used in

determinar si un animal recientemente introducido es causante de un brote de tuberculosis⁽⁹⁾.

En México se han genotipificado aislados de *M. bovis* principalmente por Spoligotyping y VNTR. En un estudio realizado en el norte de México se genotipificaron 58 aislados por spoligotyping, encontrando patrones comunes con otras partes del mundo y diferentes de otros aislados en el país⁽¹⁰⁾, en tanto en otro estudio analizaron 36 aislados de Estados Unidos y 5 aislados de Aguascalientes, Tamaulipas y Chihuahua por VNTR, encontrando concordancia entre algunos aislados de Texas y México, y entre las pruebas de Spoligotyping y VNTR⁽⁶⁾. En otro estudio se tomaron 62 aislados de distintas partes de México y se les aplicó Spoligotyping, reportando que no fue posible establecer patrones específicos por región de procedencia⁽¹¹⁾. Actualmente por la reproducibilidad, precio y rapidez del análisis por VNTR para la genotipificación del complejo *M. tuberculosis*, está siendo ampliamente utilizado para el estudio de brotes epidemiológicos específicos en varios países, contándose además con bases de datos que contienen los perfiles de más de 20 loci en muchos aislados alrededor del mundo, los cuales sirven para la comparación y establecimiento de relaciones filogenéticas y epidemiológicas con los aislados que van analizándose en nuevos estudios^(12,13).

Debido a que aun no existen reportes de análisis por VNTR para aislados de *M. bovis* provenientes de Baja California, y siendo éste un estado fronterizo de importancia bilateral por su colindancia con el estado de California, Estados Unidos, en el presente trabajo se utilizó la técnica de VNTR a diferentes aislados de *M. bovis* provenientes de bovinos de la región, comparándose entre ellos y con los de otros estados del País y de Estados Unidos, obteniéndose datos de genotipificación que aportan información relevante en cuanto a las diferencias genéticas de los aislados, su relación y su distribución.

En este estudio se cultivaron 37 muestras de tejido con lesiones sugestivas de tuberculosis provenientes del rastro TIF No. 54 de Mexicali BC desde junio de 2009 a enero de 2010, obteniéndose 11 aislados. Además se analizaron 10 aislados identificados

Mexico. In a study carried out in the north of Mexico, 58 isolates were analyzed by spoligotyping, finding patterns common to other regions of the world and different to other isolates of the country⁽¹⁰⁾; while in other study, 36 isolates from the United States of America and five isolates from Aguascalientes, Tamaulipas and Chihuahua were analyzed by VNTR, finding concordance between some isolates from Texas and Mexico, and between spoligotyping and VNTR techniques⁽⁶⁾. In other study, 62 isolates were obtained from different entities of Mexico and were analyzed by spoligotyping, reporting that it was not possible to establish specific patterns according to region of origin⁽¹¹⁾. Currently, VNTR genotyping of *M. tuberculosis* complex has been widely used for specific epidemiologic outbreaks in several countries due to its repeatability, rapidness and cost-effectiveness; including database containing profiles of more than 20 loci in many isolates worldwide, which are useful for comparing and establishing phylogenetic and epidemiologic relationships between the isolates that are being analyzed in new studies^(12,13).

Since there are still no reports on analysis by VNTR of *M. bovis* isolates from Baja California, and because this is a state of bilateral importance located at the border with the state of California, United States of America, VNTR technique was used in the present study for different *M. bovis* isolates from bovines of the region, comparing them with each other and with the ones from other entities of the country and the United States of America, obtaining genotyping data that give relevant information in regard to genetic differences of the isolates, their relationship and distribution.

In this study, from June 2009 to January 2010, 37 tissue samples with lesions suggestive to tuberculosis, coming from the slaughterhouse TIF #54 in Mexicali BC, were cultured and 11 isolates were obtained. Also, 10 previously identified isolates that were obtained in 2008 and kept at the Cepario del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV), coming from the slaughterhouse #301 in Tijuana, were analyzed by the same procedure⁽¹⁴⁾. Sampling was carried out and

anteriormente con el mismo procedimiento, provenientes de del rastro 301 de Tijuana, las cuales fueron obtenidas en el año 2008 y mantenidas en el Cepario del IICV⁽¹⁴⁾. El muestreo se llevó a cabo en conjunto y con la supervisión de inspectores sanitarios adscritos a las instalaciones de los rastros en mención, quienes después de la inspección tomaron un pequeño fragmento de nódulos linfáticos de pulmones y cabeza como tejido fresco para el cultivo bacteriológico⁽¹⁵⁾, el cual se realizó en una campana de seguridad clase III siguiendo el protocolo descrito por Payeur *et al*⁽¹⁶⁾.

Dos inclinados en medio Stonebrink se inocularon utilizando aplicadores de algodón estériles y se incubaron a 37 °C durante 4 a 6 semanas. Los medios inoculados se observaron periódicamente para la detección de presencia de colonias, las cuales una vez obtenidas se sometieron a identificación de microorganismos del complejo tuberculoso por vía molecular, mediante la identificación del fragmento de inserción IS6110 como fue previamente descrito⁽¹⁷⁾. Se utilizaron las cepas H37RV, AN5 y BCG Tokio como testigos, las cuales se encuentran en el Cepario del laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis del IICV. Posteriormente se les realizó un PCR para amplificar el gen que codifica para una histona (*hupB*) y hace posible la diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*⁽¹⁸⁾. Todas las muestras positivas a aislamiento y PCR, declaradas como *M. bovis* positivas, se analizaron mediante la técnica de VNTR, utilizando loci anteriormente

supervised by health inspectors attached to the aforementioned slaughterhouses, who after inspection took a small fragment of lung and head lymphatic nodules as fresh tissue to be used as bacteriologic culture⁽¹⁵⁾, which was analyzed under a class III security bell box following the protocol described by Payeur *et al*⁽¹⁶⁾.

Two Stonebrink egg-based slants were inoculated using sterile cotton swabs and were incubated at 37 °C for 4 to 6 wk. These media were periodically observed for detection of colonies which, once obtained, they were subjected to identification of microorganisms of the tuberculosis complex by PCR, identifying the insertion element IS6110-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) as previously described⁽¹⁷⁾. The H37Rv, AN5 and BCG (Tokyo) strains were used as controls, which can be found at the Cepario del Laboratorio de Tuberculosis y Brucelosis del IICV. Afterwards, a PCR was carried out to amplify the *hupB* gene encoding a histone-like protein making possible to differentiate *M. bovis* from *M. tuberculosis*⁽¹⁸⁾. All positive samples to isolation and PCR, declared as positive *M. bovis*, were analyzed by VNTR technique, using previously evaluated loci that are depicted in Table 1. The detection of the obtained fragments for each isolate was also carried out according to the technique described by the authors^(19,20,21). Once VNTR profiles were obtained for each isolate, they were captured in an Excel matrix and they were phylogenetically compared

Cuadro 1. Determinación de locus y oligonucleótidos para VNTR

Table1. VNTR loci and oligonucleotides determination

Name of locus	Oligonucleotide sequence	Reference
ETR-A	AATCGGTCCCATCACCTTCTTATCGAAGCCTGGGGTGCCCCGCGATTT	18
ETR-B	GCGAACACCAGGACAGCATCATGGGCATGCCGGTGATCGAGTGG	18
QUB-3232	CAGACCCGGCGTCATCAACCCAAGGGCGGCATTGTGTT	17
QUB-1895	GGTGCACGGCCTCGGCTCCAAGCCCCGCCAATCAA	17
QUB-3336	ATCCCCGCGGTACCCATCGCCAGCGGTGTGCGACTATCC	17
QUB-11a	CCCATCCCGCTTAGCACATTCTGATTTCAGGGGGGATCCGGGA	19
QUB-11b	CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGCGGAAGTGAATGGTGGCAT	19
QUB-26	AACGCTCAGCTGTCGGATGGCCAGGTCCTTCCCGAT	19

evaluados y referidos en el Cuadro 1. La detección de los fragmentos obtenidos para cada aislado se hizo también conforme a la técnica descrita por los autores referidos^(19,20,21). Una vez obtenidos los perfiles VNTR para cada aislado, se capturaron en una matriz de Excel y se compararon filogenéticamente entre ellos y con los perfiles VNTR de 19 aislados obtenidos en otras partes de México y Estados Unidos^(6,12,13), utilizándose el programa TreeView para editar el diseño de dendrogramas⁽²²⁾. La diversidad alélica (h) de los VNTR's individualmente y en combinación, fue calculada usando la siguiente ecuación: $h=1 - \sum xi^2 [n/(n-1)]$, donde n es el número de aislados y xi es la frecuencia del alelo i de un locus^(23,24).

En el Cuadro 2 se pueden observar los diferentes números de copias obtenidas al analizar las bandas correspondientes de cada locus, corroborando las repeticiones obtenidas para BCG y H37RV en una base de datos⁽²⁵⁾. Los loci que mostraron mayor polimorfismo fueron QUB-3336 y QUB-3232. Se obtuvieron 14 perfiles alélicos (muestras con diferente número de copias en al menos un locus de los analizados) al utilizar los ocho loci con una

between them and with VNTR profiles of 19 isolates obtained from other entities of Mexico and the United States of America^(6,12,13), using the TreeView program for editing the dendrogram design⁽²²⁾. The allelic diversity (h) of the individual and combined VNTR was calculated using the following formula: $h= 1 - \sum xi^2 [n/(n-1)]$, where n is the number of isolates and xi is the frequency of the allele i of a locus^(23,24). Table 2 shows the different number of copies obtained while analyzing the corresponding bands of each locus, corroborating the repetitions obtained for BCG and H37RV in a database⁽²⁵⁾. The loci that showed greater polymorphism were QUB-3336 and QUB-3232. Fourteen allelic profiles were obtained (samples with different number of copies in at least one locus of the ones analyzed) using eight loci with an allelic diversity (discriminatory power) of 0.90 and 0.89 while using only ETR-A, QUB-11a, QUB-11b, QUB-3232 and QUB-3336. From the 21 isolates, a total of 23 different profiles were obtained (number of copies of each locus for all samples) from these eight loci. The allelic diversity (h) obtained for each one of the loci was 0.00 to

Cuadro 2. Número de copias por VNTR de todos los aislados de *Mycobacterium bovis* obtenidos para los ocho loci analizados

Table 2. Number of copies of VNTR for all *Mycobacterium bovis* isolates obtained for the eight loci analyzed

Samples	ETR-B	ETR-A	QUB-11a	QUB-1895	QUB-11b	QUB-26	QUB-3232	QUB-3336
TIJ98	5	6	10	4	4	3	9	8
TIJ457, MXL138 y MXL66	5	7	10	4	4	3	9	8
TIJ550 y MXL132	5	7	10	4	3	3	9	8
TIJ407	5	7	30	4	4	4	9	4
TIJ297	5	7	10	4	4	3	9	7
TIJ118, TIJ411 y MXL160	5	7	10	4	4	3	9	5
TIJ556	5	8	10	4	4	3	8	10
TIJ65	5	8	10	4	4	3	9	10
TIJ274	5	7	10	4	3	3	8	9
MXL202	5	7	10	3	4	3	9	10
MXL2, MXL85 y MXL57	5	7	10	4	4	3	9	10
MXL164	5	7	10	4	4	3	4	5
MXL138-1	5	7	7	4	4	3	4	8
MXL74	5	7	10	4	4	3	3	10

diversidad alélica (poder discriminatorio) de 0.90 y de 0.89 al utilizar solo los loci ETR-A, QUB-11a, QUB-11b, QUB-3232 y QUB-3336. De los 21 aislados, se obtuvieron en total veintitrés diferentes perfiles (número de copias de cada locus para todas las muestras) a partir de estos ocho loci. La diversidad alélica (h) obtenida para cada uno de los loci, fué de 0.00 hasta 0.72 (Cuadro 3). El locus QUB-3336 mostró el mayor poder discriminatorio (h=0.72), en tanto el QUB-3232 mostró un poder discriminatorio moderado (h=0.37) al igual ETR-A (h=0.22) y QUB-11b (h=0.21). Los loci QUB-11a (h=0.14), QUB-26 y QUB-1895 (h=0.05) mostraron un bajo poder discriminatorio, en tanto el locus ETR-B mostró un nulo poder discriminatorio (h=0.00).

Cuando se realizó el análisis filogenético de las 21 cepas aisladas en el estudio, utilizando los seis loci mencionados, se generó un dendrograma en el que se observan seis grupos (Figura 1), uno de los cuales corresponde a solo un aislado de Tijuana, lo cual puede deberse a una cepa poco representada y exclusiva de dicha región, o al bajo número de muestras analizadas. Los otros cinco grupos contuvieron tanto cepas provenientes de Tijuana como de Mexicali; sin embargo se observó un subgrupo de dos cepas provenientes sólo de Mexicali con cuatro aislados, lo cual sugiere que este subgrupo está principalmente circulando en Mexicali. Debido a que de los seis grupos genéticos encontrados, cinco contienen tanto aislados provenientes de Tijuana como de Mexicali, sugiere que históricamente se han compartido las cepas en las dos regiones. Lo anterior puede deberse a que el ganado, principalmente machos Holstein-Friesian provenientes de Tijuana han sido vendidos a corrales para engorda en Mexicali, y a que las vaquillas de reemplazo también han sido vendidas entre estas dos regiones. Al analizar individualmente cada uno de los perfiles alélicos, se observó que 5 (de los 14 totales) corresponden sólo a aislados de Mexicali, 6 a aislados sólo de Tijuana y 3 a aislados compartidos. Lo anterior puede deberse a que actualmente hay mas control en el movimiento de animales entre las regiones analizadas, debido a las restricciones de movimiento aplicadas por la normatividad vigente, por lo que se

0.72 (Table 3). The QUB-3336 locus showed the highest discriminatory power (h=0.72) and the QUB-3232 showed a moderate discriminatory power (h=0.37), as well as ETR-A (h=0.22) and QUB-11b (h = 0.21). The QUB-11a (h = 0.14) QUB-26 and QUB-1895 (h=0.05) loci showed a low discriminatory power and ETR-B locus showed null discriminatory power (h=0.00).

When the phylogenetic analysis of the 21 isolated strains of this study was carried out, using the six mentioned loci, a dendrogram was generated where six groups are observed (Figure 1), one of these corresponds to only one isolate from Tijuana, which may be due to a fairly representative and exclusive strain of this region, or to the low number of analyzed samples. The other five groups contained Tijuana as well as Mexicali origin strains; however, a subgroup of two Mexicali origin strains in four isolates was observed, which suggests that this subgroup is mainly circulating in Mexicali. Since five of the six genetic groups contained Tijuana as well as Mexicali origin isolates, it suggests that historically, the strains from both regions have been shared. This last can be due to the fact that cattle, mainly Holstein-Friesian males from Tijuana, has been sold to beef cattle corrals in Mexicali and replacement heifers also sold between these two regions. Analyzing each one of the allelic profiles,

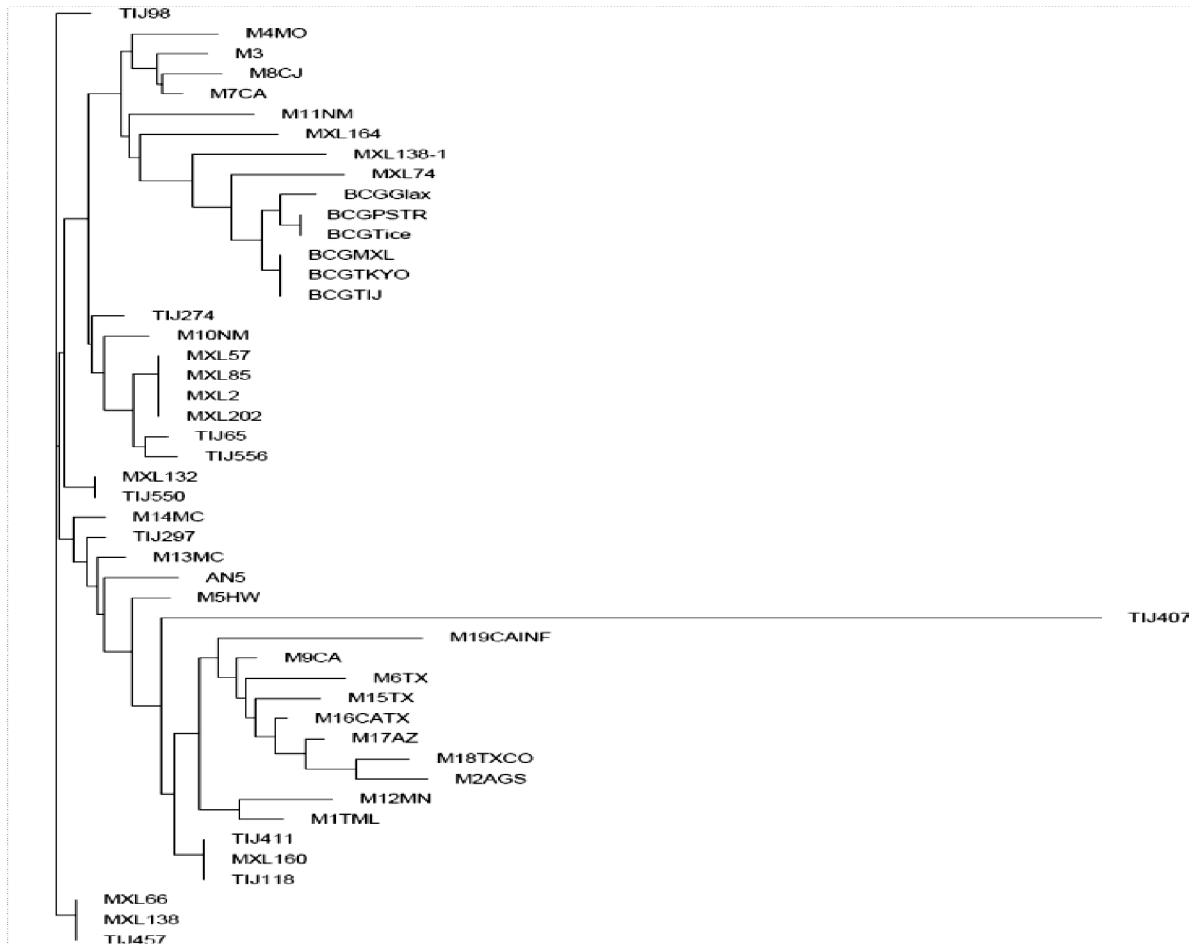
Cuadro 3. Diversidad alélica de cada locus amplificado en los 21 aislados de *M. bovis*

Table 3. Allelic diversity for each amplified locus in the 21 *M. bovis* isolates

Locus	Number of isolates for each allelic profile by locus						Allelic diversity (h)
	1	2	3	4	5	6	
ETR-B	21						0
ETR-A	1	18	2				0.22
QUB-11a	1	19	1				0.14
QUB-1895	1	20					0.05
QUB-11b	3	18					0.21
QUB-26	1	20					0.05
QUB-3232	1	2	2	16			0.37
QUB-3336	1	4	1	7	1	7	0.72

Figura 1. Dendrograma de los 21 aislados de *M. bovis* provenientes de Mexicali y Tijuana B.C. y algunas cepas provenientes de otras partes de México y de Estados Unidos

Figure 1. Dendrogram of the 21 *M. bovis* isolates from Mexicali and Tijuana B.C. and some strains from other entities of Mexico and from the United States of America



Profiles were analyzed using six loci (ETR-A, QUB-11a, QUB-11b, QUB-3232 and QUB-3336). The BCG strains were included as reference.

pueden ahora observar diferencias genéticas menores en la mayoría de los aislados dependiendo de la región de procedencia.

Al comparar los perfiles alélicos obtenidos en este estudio, con otros previamente obtenidos para muestras de otros estados del país y de Estados Unidos⁽⁶⁾, se observó que de los seis grupos genéticos, tres correspondieron sólo a perfiles de la región, y tres fueron compartidos tanto con perfiles de otras regiones del país como de Estados Unidos. Aunque se encontraron perfiles similares, ningún perfil

it was observed that 5 of the 14 total corresponded only to Mexicali, six isolates only from Tijuana and three shared isolates. The afore mentioned can be due to the fact that, nowadays, there is more animal movement control between analyzed regions, due to movement restrictions applied by the norm in force, for which minor genetic differences in the majority of isolates, depending on its origin region, can now be observed.

Comparing the allelic profiles in this study with others previously obtained for samples of other

proveniente de Baja California fue igual a los de las otras regiones incluidas en el análisis.

En el presente estudio se observó que utilizando los loci ETR-A, QUB-11a, QUB-11b, QUB-3232 y QUB-3336 se obtiene un poder discriminatorio adecuado para diferenciar aislados provenientes de la región, y además los perfiles alélicos obtenidos y que se obtengan posteriormente, se pueden comparar con los perfiles de aislados provenientes de otras regiones en todo el mundo^(12,13), ya que la técnica VNTR con estos loci es ampliamente utilizada para la genotipificación de *M. bovis* en muchos países con los que México tiene intereses comerciales y flujo de productos pecuarios y de personas. Los resultados también sugieren que es posible trazar e identificar el lugar de origen de un brote con esta metodología, por lo cual en un futuro podría ser una herramienta útil en casos específicos dentro de la campaña para el control y erradicación de la tuberculosis bovina en México^(17,18,19,22).

Los datos presentados en el presente trabajo son la primera aproximación para conocer los genotipos de *M. bovis* presentes en Baja California, sin embargo faltan estudios más amplios e interdisciplinarios para obtener los datos suficientes que puedan ayudar directamente a la campaña de control y erradicación de la TBB en la región.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado parcialmente por la 13ava. Convocatoria interna de apoyo a proyectos de investigación UABC. El primer autor fue estudiante de maestría con beca CONACYT durante el desarrollo del estudio. Se contó con apoyo técnico del alumno de doctorado Carlomán Herrera y de la alumna de servicio social Olimpia Haro Montenegro.

LITERATURA CITADA

1. Humblett M, Boschirola ML, Saegerman C. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. *Vet Res* 2009;(40):50.

entities of the country and the United States of America⁽⁶⁾, it was observed that out of the six genetic groups, three corresponded only to profiles of the region, and three shared profiles from other regions of the country as well as from the United States of America. Although similar profiles were found, none Baja California origin profile was identical to the ones from other regions included in the analysis.

In the present study it was observed that using ETR-A, QUB-11a, QUB-11b, QUB-3232, and QUB-3336 loci, a discriminatory power adequate for the differentiation of region origin isolates is obtained; also, the allelic profiles obtained and to be subsequently obtained, can be compared with profiles of isolates from other regions worldwide^(12,13), since the VNTR technique with these loci is widely used for *M. bovis* genotyping in many countries with whom Mexico has commercial interests and flow of agricultural products and people. The results also suggest that with this methodology, it is possible to trace and identify the site of origin of an outbreak, for which in the future it can be a useful tool in specific cases within the campaign for control and eradication of bovine TB in Mexico^(17,18,19,22).

Data showed in the present study are the first approximation to know *M. bovis* genotypes present in Baja California; however, broad and interdisciplinary studies are needed to obtain enough data that can directly help the campaign for control and eradication of bovine TB in the region.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was partially financed by the 13th Internal Call for Support to Investigation Projects of the UABC. The first author was a master student with a scholarship granted by Conacyt during the present study. Technical support was given by the PhD student Carloman Herrera and by the social service student Olimpia Haro Montenegro.

End of english version

GENOTIPIFICACIÓN POR VNTR DE AISLADOS DE *Mycobacterium bovis*

2. Comité Mixto, FAO/OMS de expertos en brucelosis y tuberculosis. Sexto informe, serie de informes técnicos. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, Suiza. 1986.
3. Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, Navin TR, Kammerer JS, Morlock GP, Crawford JT, LoBue PA. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis* 2008;(47):168-175.
4. Thoen OC, Steele HJ, Gilsdorf JM. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. 2nd ed. Iowa, EUA: Blackwell Publishing; 2006.
5. Milián-Suazo F, Solman MD, Ramirez C, Payeur JB, Rhyan JC, Santillan M. Identification of tuberculosis in Cattle in Mexico. *Am J Vet Res* 2001;(61):86-89.
6. Martinez LR, Harris B, Black IV WC, Meyer RM, Brennan PJ, Vissa VV, Jones RL. Genotyping North American animal *M. bovis* isolates using multilocus variable number tandem repeat analysis. *J Vet Diagn Invest* 2008;20:707-715.
7. Garnier TK, Eiglmeier JC, Camus N, Medina H, Mansor M, Pryor S, Duthoy. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2003;10013:7877-7872.
8. Acosta- Salinas R, Chavez CE, Milián-Suazo F. Tipificación de cepas de *M. bovis*. Revisión. *Tec Pecu Mex* 2009;47(4):389-412.
9. Aminian M, Shabbeer A, Bennett KP. Determination of major Lineajes of *Mycobacterium tuberculosis* complex using mycobacterial interspersed repetitive units. *IEEE Int Conf Bioinform Biomed* 2009;338-343.
10. Marin LC, Vargas J.M, Zumárraga M, Cataldi A, Romano MI, Garcia IE, Merchand JAG. Spoligotype analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from Northern Mexico. *Can J Microbiol* 2005;51:996-1000.
11. Milián F, Banda V, Ramirez C, Arriaga C. Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geography location within Mexico. *Prev Vet Med* 2002;55:255-264.
12. Weniger T, Krawczyk J, Supply P, Niemann S, Harmsen D. MIRU-VNTR_{plus}: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucl Ac Res* 2010;38:326-331.
13. Allix-Béguec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and user-strategy of MIRU-VNTR_{plus}, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2008;46(8):2692-2699.
14. Bermúdez HR, Rentería ET, Medina BG, Hori-Oshima S, De la mora VA, López VG, Yu WL, et al. Correlation between histopathological, bacteriological and PCR diagnosis of bovine tuberculosis. *J Anim Vet Adv* 2010;9(15):2082-2084.
15. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Campaña nacional contra la tuberculosis bovina. 2009. [en línea]: <http://www.senasica.gob.mx/?id=801>. Accessed Mar 24, 2010.
16. Payeur B, Jarnagin L, Marquardt G, Sharper A, Martin M. Manual of laboratory methods in veterinary Mycobacteriology for the isolation and identification of Mycobacteria. Ames, Iowa: USDA, Anim Plant Health Insp Serv. Vet Serv. 1993;124.
17. Liebana E, Aranaz A, Mateos A, Vilafranca M, Gomez-Mampaso E, Tercero JC, et al. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(1):33-36.
18. Prabhakar SA, Mishra A, Singhal V, Katoch VM, Thakral SS, Tyagi JS, Prasad HK. Use of the hub gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2724-2732.
19. Roring S, Alistair NS, Hewinson RG, Neill SD, Robon AS. Evaluation of variable number tandem repeat (VNTR) loci in molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates from Ireland. *Vet Microbiol* 2004;101:65-73.
20. Frothingham R, Meeker OWA. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiol* 1998;144:1189-1196.
21. Skuce RA, McCorry TP, McCarrroll JF, Roring SM, Scott AN, Brittain D, Hughes SL, Hewinson RG, Neill SD. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiol* 2002;(148):519-528.
22. Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996;(12):357-358.
23. Hunter RP, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988;26(11):2465-2466.
24. Hilty M, Diguimbaye C, Schelling E, Baggi F, Tanner M, Zinsstag J. Evaluation of the discriminatory power of variable number tandem repeat (VNTR) typing of *Mycobacterium bovis* strains. *Vet Microbiol* 2005;109:217-222.
25. Basic local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnology Information [on line]. http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/_Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome. Accessed March 15, 2010.

