



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE DOS SECUENCIAS GENÓMICAS
COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis*

NATALY OLLAN QUEZADA TAPIA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL MERINO

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



COMPARACIÓN DE DOS SECUENCIAS GENÓMICAS
COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO
MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis*

NATALY QUEZADA TAPIA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PATRICIO RETAMAL MERINO
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO LUCERO
PROFESOR CONSEJERO: EDUARDO KESSI CAMPOS

SANTIAGO, CHILE
2011

MEMORIA DE TÍTULO

“COMPARACIÓN DE DOS SECUENCIAS GENÓMICAS COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Mycobacterium bovis*”

“COMPARISON OF TWO GENOMIC SEQUENCES AS BIOMARKERS FOR MOLECULAR DIAGNOSIS OF *Mycobacterium bovis*”.

Nataly Ollan Quezada Tapia *

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Financiamiento

Proyecto FIV 121014019102003

Servicio Agrícola y Ganadero de Chile

RESUMEN

Mycobacterium bovis es el microorganismo zoonótico causante de la tuberculosis bovina, patología infectocontagiosa de distribución mundial responsable de graves problemas económicos y de salud en el sector ganadero. Debido a que varios estudios han establecido la utilidad de las secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081* en la identificación y tipificación de cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el objetivo de este estudio fue establecer protocolos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la amplificación de las secuencias *IS6110* e *IS1081* y determinar la existencia de diferencias en su capacidad de detectar *Mycobacterium bovis* en tejidos bovinos. El análisis estadístico de los resultados sugirió que no existen diferencias significativas entre los ensayos de PCR convencional basados en *IS1081* e *IS6110*, lo que contrasta con lo señalado por otros autores, quienes postulan que *IS1081* está presente en mayor número de copias en cepas de *Mycobacterium bovis*, y por tanto, su utilidad en el diagnóstico es mayor. Debido a que la concordancia de ambas pruebas fue baja, se requieren nuevos estudios destinados a determinar la aplicabilidad de ambas secuencias en conjunto, por ejemplo en una prueba de PCR múltiple, ya que este trabajo sugiere que son complementarias para el diagnóstico de tuberculosis bovina.

Palabras claves: *Mycobacterium bovis*; secuencias de inserción; PCR

ABSTRACT

Mycobacterium bovis is a zoonotic organism that causes bovine tuberculosis, an contagious-infectious disease of worldwide distribution responsible for economic and health problems in the livestock sector. Because of several studies have established the usefulness of insertion sequences *IS6110* and *IS1081* in the identification and typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains, the aim of this study was to establish PCR protocols (polymerase chain reaction) for the amplification of *IS6110* and *IS1081* sequences and to determine statistical differences in their ability to detect *Mycobacterium bovis* in bovine tissues.

Our results suggests no significant differences between conventional PCR assays based on *IS1081* and *IS6110*, in contrast with those reported by other authors, who postulate that *IS1081* is present in more copies within *Mycobacterium bovis* strains, and therefore its usefulness for diagnosis is higher.

Because the concordance of both tests was low, new studies are needed to determine the applicability of both sequences together, for example in a multiplex PCR test, as this work suggests that they are complementary for the diagnosis of bovine tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium bovis*; Insertion sequences; PCR

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina (TBB) es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que afecta al ganado bovino, produciendo un cuadro generalmente crónico, que además de causar problemas económicos y de salud en el sector pecuario, constituye un peligro para la salud pública, ya que el agente causal se transmite al ser humano, los animales domésticos y a la fauna silvestre [8, 13]. La infección es causada por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), bacteria perteneciente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, que incluye además a *M. tuberculosis*, *M. microti* y *M. africanum*, responsables de la tuberculosis humana, en pequeños roedores y humana en África tropical respectivamente [26].

Estos agentes son bacilos ácido-alcohol resistentes, Gram positivos, inmóviles, aerobios estrictos y de lento crecimiento en medios de cultivo; además, pueden sobrevivir por varios meses en el ambiente [19, 25].

La enfermedad se desarrolla generalmente en animales adultos sometidos a condiciones de estrés, por lo que el período de incubación es de meses o años, y las vías de infección más importantes descritas en bovinos corresponden a la aérea y digestiva [18].

Tras la infección, se pueden desarrollar granulomas nodulares no vascularizados conocidos como tubérculos, que aumentan gradualmente de tamaño y se presentan con mayor frecuencia en pulmones y nódulos linfáticos retrofaríngeos, bronquiales y del mediastino. A medida que los tubérculos crecen se produce necrosis en su parte central, formando una masa caseosa que finalmente tiende a calcificarse [13]. Estas lesiones pueden permanecer latentes o progresar dependiendo de la relación entre el agente infeccioso y el hospedero [2].

La infección del ganado con este organismo suele ser crónica y puede permanecer subclínica durante un largo período [8]. En ocasiones puede cursar de manera aguda y presentar signos clínicos inespecíficos, tales como debilidad, anorexia, extenuación, disnea, inflamación de los ganglios linfáticos y tos, particularmente en cuadros de tuberculosis avanzada [17].

En Chile la enfermedad es de carácter endémica, pero su distribución no se presenta en forma homogénea, identificándose diversas zonas epidemiológicas, donde

la zona II, que comprende desde la región de Valparaíso a la del Bío Bío, posee la mayor incidencia a nivel nacional [22] .

El control de la TBB está basado en un diagnóstico oportuno y eliminación de los animales infectados, junto con la prevención de la diseminación de la infección tanto dentro como hacia fuera de los rebaños [1].

Para el diagnóstico de TBB existen varias alternativas, entre las que destacan por su mayor uso la prueba de tuberculina, el análisis histológico y el aislamiento bacteriano. Sin embargo, todas estas técnicas presentan ciertas desventajas que las hacen menos eficientes en sus diagnósticos. En este sentido, se destaca el cultivo bacteriano, que siendo la prueba confirmatoria por excelencia de infección por *M. bovis*, genera resultados tardíos debido al lento crecimiento de esta bacteria (alrededor de 8 semanas), además de requerir medios de cultivo especiales [25].

Es por esto que existe la necesidad de contar con un procedimiento altamente sensible que facilite la identificación del patógeno en forma rápida y específica; así, la amplificación de secuencias genómicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) surge como una herramienta de gran potencial en el campo diagnóstico de enfermedades producidas por agentes biológicos.

Esta técnica de biología molecular se basa en la amplificación o replicación *in vitro* de una secuencia del DNA, limitada por un par de oligonucleótidos específicos, mediante la utilización de una polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Como resultado de los ciclos de amplificación se obtiene un aumento exponencial del número de copias del fragmento deseado, considerándose una técnica rápida, específica y sensible, que permite trabajar a partir de muestras de tejidos, secreciones respiratorias, leche, sangre, heces y orina, aunque las lesiones granulomatosas son la muestra ideal [20].

Del mismo modo, Romero *et al.* [21] describieron que la técnica de PCR es 28 veces más sensible en el diagnóstico del complejo *Mycobacterium tuberculosis* que el cultivo tradicional y microscopía directa.

En el diagnóstico molecular de *M. bovis* se han utilizado con éxito las secuencias de inserción IS6110 e IS1081 como blanco genético en la técnica de PCR [5]. Estas secuencias se encuentran repetidas varias veces en el genoma y corresponden a la

clase de transposones más simples, que codifican sólo para una transposasa, responsable de su propia transposición[10].

Ambas secuencias son específicas de las especies bacterianas que pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, pero su presencia y número de copias varía entre cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* [3]. En este sentido, estudios realizados en otros países describen que *IS6110* se encontraría en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* y en mayor número de copias, mientras que *IS1081* estaría generalmente con mayor frecuencia y en mayor número en cepas de *M. bovis* [4,23,28]. Sin embargo se desconocen las características de estas secuencias en las cepas de *M. bovis* presentes en Chile, y por lo tanto su utilidad para el diagnóstico de TBB en el país.

En este trabajo se postula que las pruebas de PCR que utilizan como marcadores las secuencias de inserción *IS6110* e *IS1081*, tienen diferencias significativas en su capacidad de detectar la infección por cepas nacionales de *M. bovis*. Mediante la implementación de una prueba de PCR para la detección de ambas secuencias, el objetivo de este estudio fue comparar ambos marcadores genéticos y posteriormente determinar la presencia de diferencias en su capacidad de detectar este agente.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Enfermedades Infecciosas y Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET).

➤ Muestras

- Las muestras fueron facilitadas por el Laboratorio de Biotecnología de la Estación de Laboratorios y Cuarentena Lo Aguirre, del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG). Éstas consistieron en DNA extraído desde tejidos con lesiones sospechosas de TBB (lesiones granulomatosas de diversas zonas del cuerpo), que llegan rutinariamente al Laboratorio de Bacteriología del SAG desde zonas de todo el país para su análisis. Para ello, en este laboratorio se homogenizaron los tejidos de cada animal por separado en presencia de buffer Tris-EDTA pH 8,0 mediante disrupción mecánica por 160s. a 4800 rpm, utilizando perlas de zirconia/sílica en el equipo Bead-Beater (Cole-Palmer®). Luego se utilizó el “kit” comercial High Pure PCR template preparation (Roche®), para la extracción de DNA de cada muestra, para finalmente ser analizado mediante la prueba oficial de PCR en tiempo real (RT-PCR) para el diagnóstico confirmatorio de la infección. Una vez determinadas las muestras positivas y negativas, éstas fueron congeladas y enviadas a FAVET para su análisis en este trabajo.

- Adicionalmente para la comparación de ambas secuencias se consideraron muestras de tejidos bovinos con lesiones sospechosas, es decir con lesiones granulomatosas compatibles a un cuadro de TBB [13], que fueron enviadas por particulares al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de FAVET en el marco de las actividades de servicio.

- El tamaño muestral utilizado fue de 75 muestras provenientes de animales con antecedentes de infección por *M. bovis* y 75 muestras de animales negativos. Este tamaño muestral consideró un nivel de confianza del 95%, una diferencia de 20% y potencia de 80%.

- De las 75 muestras provenientes de animales con antecedentes de infección, 68 fueron confirmadas por RT-PCR (SAG), y las 7 restantes corresponden a las enviadas desde particulares, siendo estas últimas consideradas sólo en el análisis comparativo entre la técnica de PCR convencional utilizando IS1081 e IS6110.

➤ Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

- El PCR se basó en la amplificación de segmentos de las secuencias *IS1081* (306 bp) e *IS6110* (123 bp), según se describió previamente [9, 27] e incorporando algunas modificaciones. Brevemente, las reacciones fueron efectuadas en volúmenes finales de 12,5 uL conteniendo: buffer PCR (Invitrogen ®), 1,6 mM de MgCl₂ (Invitrogen ®), 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de los partidores y 0,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Invitrogen ®), por cada reacción. Después de la evaluación de varias temperaturas y tiempos de amplificación, el protocolo final consistió en una denaturación inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos consistentes en denaturación a 95 °C por 30 s, hibridación a 67 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s, para realizar una extensión final a 72 °C por 5 min.

- Los productos del PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta, comparándolos con marcadores de tamaño molecular, cuyas bandas se encuentran separadas por 100 bp (Invitrogen ®).

➤ Análisis de resultados:

- Se procedió a realizar una prueba McNemar(G) para establecer la existencia de asociación entre las pruebas de PCR. Esta prueba es aplicable a los diseños experimentales con un solo grupo que se somete a observación con dos instancias de una variable, y se basa en la aplicación de la Formula de X^2 en relación únicamente a las casillas de la tabla 2 x 2 que representan cambios[24].

- El contraste se hizo por la tabla de chi-cuadrado (X^2) para un grado de libertad.

- Finalmente se determinó el grado de concordancia mediante el índice de Kappa de cohen (K), utilizando la tabla de valoración señalada por López de Ullibarri *et al*[12].Este índice también es aplicable a las tablas de contingencia 2x2 que relacionan dos variables dicotómicas . Sus valores van de 1 a -1.

RESULTADOS

Del total de muestras analizadas para detectar la presencia de las secuencias IS1081 e IS6110, todas ellas generaron un fragmento de ADN del tamaño esperado, siendo éste de 306bp y 123bp respectivamente, sin obtener en ninguna de las pruebas amplificadas inespecíficos o no concordantes a lo señalado en la bibliografía para *M. bovis*.

A continuación en la figura 1 se muestra la amplificación de la secuencia IS1081 en algunas de las muestras analizadas; y en las tablas 1, 2, 3 y 4 se observan las tablas de contingencia de las distintas comparaciones que permitieron los cálculos del análisis estadístico.



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de la secuencia IS 1081(306pb) amplificada por PCR convencional. Líneas 1 a 9 representan cada una de las muestras analizadas, comparadas con un marcador de tamaño molecular, como se señala en Material y Métodos).

Tabla 1: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación RT-PCR / PCR-IS1081.

RT-PCR/ PCR-IS1081	PCR-IS1081		
	Neg	Pos	
G=33.03 (p≤0.05)	75	0	75
K= 0.55 (C=78.32%)	31	37	68
	106	37	143

G = Prueba de McNemar; k = índice de concordancia; C= % de resultados concordantes.

En la tabla 1 se observa que de un total de 68 animales confirmados infectados por la técnica RT-PCR, 37 lograron ser detectadas por PCR-IS1081, existiendo diferencias significativas (p≤0.05) entre ambas y un índice de concordancia moderado (K) [12].

Tabla 2: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación RT-PCR / PCR-IS6110

RT-PCR/ PCR-IS6110	PCR-IS6110			
		Neg	Pos	
	Neg	75	0	75
Pos	36	32	68	
RT-PCR		111	32	143
G=38.02 (p≤0.05)				
K= 0.48 (C=74.82%)				

G = Prueba de McNemar; k = índice de concordancia; C= % de resultados concordantes.

En la tabla 2 se observa que de un total de 68 animales confirmados infectados por la técnica RT-PCR, 32 lograron ser detectadas por PCR-IS6110, existiendo diferencias significativas (p≤0.05) entre ambas y un índice de concordancia moderado(K) [12].

Tabla 3: Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación RT-PCR/PCR-IS1081+IS6110

RT-PCR/PCRIS1081+IS6110	PCR-IS1081+IS6110			
		Neg	Pos	
	Neg	75	0	75
Pos	16	52	68	
RT-PCR		91	52	143
G=18.06 (p>0.05)				
K= 0.77(C=88.81%)				

G = Prueba de McNemar; k = índice de concordancia; C= % de resultados concordantes.

En la tabla 3 se observa que de un total de 68 animales confirmados infectados por la técnica RT-PCR, 52 lograron ser detectadas por PCR-IS6110 + IS6110, en donde no fueron detectadas diferencias (p>0.05) y se determinó un índice de concordancia bueno(K) [12].

Tabla 4 : Análisis estadístico y tabla de contingencia para la comparación PCR-IS1081/PCR-IS6110

PCR-IS1081 / PCR-IS6110	PCR-IS1081			
		Neg	Pos	
	Neg	92	24	116
G=1.64 (p>0.05)	Pos	15	19	34
K= 0.32(C=74%)		107	43	150

G = Prueba de McNemar; k = índice de concordancia; C= % de resultados concordantes.

En la tabla 4 se observa que de un total de 75 animales sospechosos de la infección, 15 individuos lograron ser detectados sólo por la técnica PCR-IS1081 , 24 sólo por PCR-IS6110, y 19 por ambas secuencias, logrando detectar 58 animales infectados en conjunto; no existiendo diferencias significativas entre ambas (p>0.05) y presentando un índice de concordancia bajo (K)[12].

En las tablas antes señaladas además se logra evidenciar que de los 75 animales confirmados libres de infección por RT-PCR, la totalidad arrojó iguales resultados con la técnica de PCR convencional utilizando las secuencias (IS) descritas (Tablas 1,2,3); y por su parte, de los 75 animales sospechosos de infección, 17 individuos no fueron detectados por ninguna de estas secuencias, agrupándolos también como negativos (tabla 4)

DISCUSIÓN

La inexistencia de diferencias ($p > 0,05$) entre las pruebas de PCR-IS1081 y PCR-IS6110 (Tabla 4) sugiere que las cepas nacionales difieren de lo señalado por otros trabajos que postulan que IS1081 presentaría mayor número de copias que IS6110 en cepas de *Mycobacterium bovis* [4,23,28], y por tanto, su utilidad para el diagnóstico resultaría mayor, pues en nuestro estudio ambas secuencias fueron capaces de detectar un número semejante de animales infectados. Sin embargo, la baja concordancia (K)[12] implica que a pesar de esta equivalencia en el número de detectados infectados por ambos ensayos, éstos no corresponden a los mismos animales, si no que más bien cada una de las secuencias (IS1081 e IS6110) es capaz de detectar distintos individuos infectados, pero en similar número.

Esto podría sugerir que en las cepas nacionales ambas secuencias se encontrarían en una proporción similar dentro del genoma de *Mycobacterium bovis*, aunque no siempre se encontrarían ambas presentes en una misma cepa. Adicionalmente, existen autores que señalan que IS6110 resultaría más sensible en el diagnóstico del complejo *Mycobacterium. tuberculosis*, ya que al ser detectado a través de la amplificación de un segmento más corto que el utilizado para detectar IS1081 (123 bp v/s 306 bp), se vería menos afectada en caso de existir degradación del DNA durante el desarrollo de la prueba [11].

Otra posible explicación a este hallazgo es que la técnica de PCR convencional utilizada no posee la sensibilidad suficiente para detectar las secuencias de inserción (IS), cuando éstas se encuentran en un bajo número dentro del genoma de la bacteria, como podría haber ocurrido en algunas de las cepas utilizadas en nuestro estudio.

Debido a la baja concordancia entre ambas pruebas (PCR IS6110 v/s PCR IS1081), se requieren nuevos estudios destinados determinar la aplicabilidad de ambas secuencias en conjunto, por ejemplo en una prueba de PCR múltiple, ya que este trabajo sugiere que son complementarias para el diagnóstico de tuberculosis bovina [12], pues al analizar los resultados en conjunto de ambas secuencias y compararlos con los obtenidos por RT-PCR (PCR-IS1081+IS6110 v/s RT-PCR) no se detectaron diferencias significativas y su índice de concordancia resultó alto (Tabla 3).

Además, debido a que el PCR convencional no logró identificar a todos los animales positivos a la infección detectados previamente por RT-PCR (Tablas 1,2 y 3), se podría sugerir que esta última técnica es de mayor sensibilidad en el diagnóstico de Tuberculosis bovina, tal como lo señalan diversos autores [6,14,15,16]. Junto con esto la RT-PCR resulta ser más rápida, y permite la cuantificación de la carga inicial de bacterias en muestras de tejido, razones que la potencian como una de las técnicas de diagnóstico molecular de elección en un futuro. Sin embargo, su alto costo ha restringido su uso a sectores aún muy reducidos de la ciencia.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que los ensayos de PCR que utilizan los marcadores genéticos IS1081 e IS6110 no presentan diferencias significativas en su capacidad de detectar *Mycobacterium bovis*. Debido a la baja concordancia de ambas pruebas, son necesarios nuevos estudios destinados a establecer un protocolo de PCR utilizando ambas secuencias en conjunto, mejorando la sensibilidad potencial de esta prueba para el diagnóstico de Tuberculosis bovina.

AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Consuelo Borie, del Laboratorio de Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva de FAVET, por facilitar los equipos necesarios para la realización de este ensayo.

- A la Dra. Patricia Ávalos, Jefa del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), por su colaboración en la obtención de las muestras de DNA utilizadas en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ABALOS, P.; RETAMAL, P.** 2004. [Tuberculosis: a re-emerging zoonosis?]. *Rev Sci Tech.* 23(2): p. 583-94.
2. **ABDALA, A.** 1998. Tuberculosis Bovina. *Rev. Sancor.* 56(604): p. 26-30.
3. **ARYAN, E.; MARKVANDI, M.; FARAJZADEH, A.; HUYGEN, K.; BIFANI, P.; MOUSAVI, S. ; FATEH,A. ;JELODAR ,A.; GOUYA, M. ; ROMANO, M.** 2010. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol Res.* 165(3): p. 211-20.
4. **BLAZQUEZ, J.; ESPINOZA DE LOS MONTEROS, L.; SAMPER, S.; MARTIN, C.; GUERRERO, A.; COBO, J.; VAN EMBDEN, J.; BAQUERO, F.; GOMEZ-MAMPASO, E.** 1997. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol.* 35(6): p. 1390-3.
5. **COLLINS, D.; STEPHENS, D.** 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol Lett,* 67(1): p. 11-5.
6. **DAGHER, H.; DONNINGER, H.; HUTCHINSON, P.; GHILDYAL,R. ;BARDIN,P.** 2004. Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *J Virol Methods.* 117(2): p. 113-21.
7. **DE LA RUA-DOMENECH, R.; GOODCHILD, A.; VORDERMEIER, H. ; HEWINSON , R. ; CHRISTIANSEN, K. ;CLIFTON-HADLEY, R.** 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Res Vet Sci.* 81(2): p. 190-210.
8. **DUARTE, E.;DOMINGOS, M.;AMADO, A.;CUNHA, M; BOTELHO, A.** 2009. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Vet Microbiol.* 143(2-4): p. 299-306.
9. **EISENACH, K. ; SIFFORD,M.; CAVE,M. ; BATES,J.; CRAWFORD,J.**1991. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples using a polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis,* 144(5): p. 1160-3.
10. **FERNÁNDEZ, J.; FERNANDEZ,M.; HERNÁNDEZ,J; GONZÁLEZ,J.** 2002. *Genética.* Ariel S.A. Barcelona, España. p: 375-385.

11. **GARBACCIO, S. ; CATALDI ,A.** 2010. Evaluation of an immunomagnetic capture method followed by PCR to detect *Mycobacterium bovis* in tissue samples from cattle. *Rev Argent Microbiol.* 42(4): p. 247-53.
12. **LÓPEZ DE ULIBARRI, I. ; PITA, S.** 1999. Medidas de concordancia: El Índice Kappa, in *Unidad de Epidemiología clínica y Bioestadística.* 1999, Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo.: España. p. 169-171.
13. **MICHEL, A.; MULLER ,B.; VAN HELDEN, P.** 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not?. *Vet Microbiol.* 140(3-4): p. 371-81.
14. **MORTARINO, M.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F.; BAZZOCCHI, C.; GENCHI,C.; BANDI, C.** 2004. [Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania]. *Parassitologia,* 46(1-2): p. 163-7.
15. **NAGARAJ, T.;VASANTH,J.;DESAI,A.; KAMAT,A.; MADHUSUDANA,S.; RAVI,V.** 2006 Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol.* 36(1): p. 17-23.
16. **NAGY,B.;BAN,Z.;BEKE,A.;NAGY,G.;LAZAR,L.;PAPP,C.;TOTH-PAL,E.; PAPP,Z.** 2006. Detection of *Toxoplasma gondii* from amniotic fluid, a comparison of four different molecular biological methods. *Clin Chim Acta,* 368(1-2): p. 131-7.
17. **OIE.** 2004 Manual de la OIE sobre animales terrestres [En línea].Tuberculosis bovina<http://www.oie.int/esp/es_index.htm> [consulta:17 julio 2010].
18. **POLLOCK, J.M. ; NEILL, S.D.** 2002 *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *Vet J.*163(2): p. 115-27.
19. **QUIÑONES, S.** 2008. Actividad micobacteriana de extractos de árboles popularmente utilizados para infecciones pulmonares. Memoria de título Química Biológica. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. p. 3-10.
20. **RIPOLI, M.; VILLEGAS, C.** 2010. Marcadores genéticos. Material didáctico. Centro de Investigaciones en Genética básica y aplicada (CIGEBA)., Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. p: 8-11.
21. **ROMERO,R.;GARZON,D.;MEJIA,G.;MONROY,W.;PATARROYO,M.;MURILLO,L.** 1999 Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species-specific primers. *Can J Vet Res.*63(2): p. 101-6.

22. **SAG.** 2010. Ministerio de Agricultura, Chile [En línea].<<http://www.sag.gob.cl>> [Consulta:20 julio 2010].
23. **SAVELKOUL, P.; CATSBURG, A.; MULDER,S; OOSTENDORP, L.; SCHIRM, J.; WILKE, H.; VAN DER ZANDEN, A.; NOORDHOEK, G.** 2010 Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. J Microbiol Methods,.66(1): p. 177-80.
24. **SIERRA, R.** 1985. Técnicas de investigación social, teoría y ejercicios. 4 ed. Paraninfo. Madrid, España. p: 602 - 603.
25. **SOO,P.;HORNG,Y.;CHANG,K.;WANG,J.;HSUEH, P.;CHUANG, C.;LU, C.;LAI,C.** 2009. A simple gold nanoparticle probes assay for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* complex from clinical specimens. Mol Cell Probes. 23(5): p. 240-6.
26. **VAN SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; DE HAS, P.; HERMANS, P.; KOEDAM, M.; TEPPEMA, K.; BRENNAN, P.; BESRA, G.; PORTAELS, F.; TOP, J.** 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. Int J Syst Bacteriol. 47(4): p. 1236-45.
27. **WARDS, B.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.** 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. Vet Microbiol, 43(2-3): p. 227-40.
28. **YANG,Z.;BARNES,P.;CHAVES,F.;EISENACH,K.; WEIS,S.; BATES,J.; CAVE,M.** 1998. Diversity of DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the United States. J Clin Microbiol. 36(4): p. 1003-7.