



# Evaluación de la Dúplex PCR para el diagnóstico simultáneo de *Mycobacterium* spp. y *Brucella* spp. en bovinos

## Assessment of Duplex PCR for the simultaneous diagnose of *Mycobacterium* spp. and *Brucella* spp. in cattle

Ariel Escobar<sup>1,2</sup>, Orly Cevallos<sup>1,2</sup>, Samir Zambrano<sup>1,2</sup>, Jaime Morante<sup>1,2</sup>, Mercedes Carranza<sup>1,2</sup>, Enrique Nieto<sup>1,2</sup>, María Cadme<sup>1,2</sup>, Edgar Pinargote<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Dirección de Investigación Científica y Tecnológica, Laboratorio de Biotecnología, Laboratorios Básicos.

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Agrarias, Ciencias Ambientales y Zootecnia, Universidad Técnica Estatal de Quevedo

<sup>3</sup> Departamento de Vinculación y Transferencia de Tecnología, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Km 1 ½ vía a Santo Domingo de los Tsáchilas, C.P 73. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

Recibido 22 enero 2013; aceptado 22 marzo 2013

### Resumen

La tuberculosis y la brucelosis siguen siendo causas importantes de morbilidad y mortalidad en muchos países, para la detección de ambas enfermedades se requieren de herramientas eficientes y sensibles para efectivizar el diagnóstico. Este trabajo fue dirigido a evaluar y comparar la técnica de Dúplex PCR frente a la PCR anidada, para la detección de *Brucella* spp. (BR) y *Mycobacterium* spp. (TB). Se utilizó un total de 100 muestras de tejidos a partir de nódulos linfáticos traqueo bronquiales, pulmón de bovinos y, aislados bacterianos de TB y BR como controles positivos. Diez combinaciones de iniciadores dirigidos a flanquear un segmento de la secuencia 16S ARNr (BR) y el gen antígeno MPB70 (TB) fueron evaluados, el mejor resultado para la Dúplex PCR se logró con los iniciadores Bru-2F/Bru-2R para BR y para TB, Tub-1F/Tub-N-R. Los productos de amplificación fueron de 225 y 230-pb respectivamente. A fin de potencializar los resultados de la técnica propuesta, todas las muestras fueron inicialmente analizadas y comparadas entre la PCR simple y la PCR anidada (Kappa,  $k = 0,85$ ) y, la concordancia entre los resultados obtenidos con la PCR anidada y la Dúplex PCR ( $k = 0,88$ ), para las dos bacterias fue muy buena.

**Palabras clave:** Bovinos, brucelosis, detección, tejidos, tuberculosis.

### Abstract

Tuberculosis and brucellosis remain important causes of morbidity and mortality in many countries, for the detection of both diseases requires efficient and sensitive tool for effectuate the diagnosis. This study was aimed to evaluate and compare the duplex PCR versus the nested PCR, for detection of *Brucella* spp. (BR) and *Mycobacterium* spp. (TB). A total of 100 samples of tissues from tracheo-bronchial lymph nodes, bovine lung and bacterial isolate as positive controls were used. Were evaluated ten combinations of primers which were designed to flank the segment of the 16S rRNA sequence (RB) and antigen gen MPB70 (TB), the best result for the Duplex PCR was obtained with the primers Bru-2F/Bru-2R for BR and Tub-1F/Tub-N-R for TB. The amplification of the products was 225 and 230-bp respectively. In order to compare the results of the proposed technique, all samples were initially analyzed and compared between PCR and nested PCR (Kappa,  $k = 0.85$ ) and the concordance between Duplex PCR and nested PCR ( $k = 0.88$ ) for the two bacteria was very good.

**Keywords:** Brucellosis, cattle, detection, tissues, tuberculosis.

### 1. Introducción

La brucelosis y la tuberculosis son enfermedades zoonóticas que pueden

presentarse en animales salvajes y domésticos a nivel mundial (Thoen *et al.*, 2010; Sreevatsan *et al.*, 2000), son de

\* Autor para correspondencia

Email: telarieles@hotmail.com (A. Escobar)

importancia tanto en salud animal como en la salud humana. El Programa de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador en el año 1978, reportó niveles de prevalencia de brucelosis de 1,3 y 10,6%, asumen que dada la ausencia de un programa nacional de control y prevención, la enfermedad habría incrementado su frecuencia de ocurrencia, específicamente en áreas de mayor intensidad de los procesos de producción y comercialización ganadera. Un informe oficial sobre el estado epidemiológico de prevalencia de brucelosis para el 2008 reporto el 1,54% (Agrocalidad, 2012).

Actualmente en la región central de Ecuador según reportes realizados para la detección de *Brucella* spp. con PCR simple han demostrado una alta prevalencia (45%) de la enfermedad en tres zonas estudiadas, además demuestran que la PCR anidada fue 37,9% más sensible que la PCR simple (Cevallos *et al.*, 2011), lo que sugiere que los niveles de contaminación por *Brucella* spp. en la población de bovinos son mayores.

Estos patógenos (TB y BR) son considerados huéspedes especialistas por su capacidad de causar enfermedades en poblaciones limitadas de hospederos. Con el uso de algunas herramientas serológicas, la forma pulmonar de la tuberculosis causada por *Mycobacterium bovis* en los seres humanos era imprecisa de diferenciar con la tuberculosis causada por *M. tuberculosis*, lo que condujo a obtener reacciones cruzadas (Gouzy *et al.*, 2013; De Kantor y Ritacco, 2006; Cosivi *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 1988). Según Sreevatsan *et al.* (1997) sugiere que cuatro especies del complejo *M. tuberculosis* (*M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti* y *M. tuberculosis*) están estrechamente relacionadas a nivel genético (ADN-ADN con una homología del 95%).

Varios estudios moleculares han demostrado que la amplificación por PCR de un fragmento del gen que codifica la proteína MPB70, considerada específica

para el complejo de *M. tuberculosis*, presenta buena especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y ganado (Milián y Harris, 2010; Sreevatsan *et al.*, 1997). En este trabajo se consideró el mismo fragmento de ADN para dirigir su de detección.

Dentro de las limitantes para establecer el diagnóstico específico de las dos enfermedades, es la ausencia de algún síntoma clínico característico que las defina con precisión en sus primeras etapas (Gouzy *et al.*, 2013; Martínez e Irma, 2000; Cousins *et al.*, 1992). El diagnóstico serológico de las dos enfermedades no permite detectar individuos con infecciones primarias asintomáticas (Cousins *et al.*, 1992; Díaz y Moriyón, 1989). Para ambas enfermedades la prueba “de oro” es el aislamiento del agente causal, pero ésta es demorada en el caso de *M. bovis*, con un promedio de hasta seis semanas en cultivos *in vitro* (De Waard y Robledo, 2007; Doran *et al.*, 2009; OIE, 2008). El aislamiento de los microorganismos viables, oscila entre el 20 y 25% para brucelosis y del 22% hasta un 66% para tuberculosis (Gouzy *et al.*, 2013; Savic, 1992). Otros reportes basados en la detección de estas enfermedades con métodos inmunoenzimáticos han sido apuntados como poco confiables, por lo que sugieren el uso de técnicas de diagnóstico más sensibles, rápidas y de mayor especificidad como las pruebas de PCR (Cardoso *et al.*, 2009; Leal-Klevezas *et al.*, 1995b).

El uso de herramientas moleculares para la detección de microorganismos ha dado una nueva perspectiva para el diagnóstico de brucelosis (Hernan y Ridder, 1992; Leal-Klevezas *et al.*, 1995a) y tuberculosis (Pao, 1990; Shankar y Manjunath, 1991), a través de pruebas basadas en variantes de la PCR. La Organización Mundial de la Salud, se ha preocupado por tener un método de diagnóstico rápido, sensible y específico, para aplicar un tratamiento adecuado y oportuno, considerando a la PCR como una técnica altamente confiable

en el análisis de enfermedades (Morales y Loredó, 2000; Martínez e Irma, 2000).

Una de las variantes de la PCR ampliamente utilizada para la detección específica de microorganismos es la PCR Multiplex, mediante la cual se amplifica uno o más segmentos de ADN blanco con el uso de varios iniciadores, los cuales mantienen una alta sensibilidad y especificidad en la detección génica de los patógenos objetivos (Morales y Loredó, 2000). El uso de herramientas de detección a nivel molecular como la PCR, es considerada de costo relativo bajo en comparación con otras técnicas convencionales utilizadas para la detección de estos patógenos y, cuyos resultados han demostrado no ser tan eficaces. Sin embargo, en Ecuador no se registra el uso de este tipo de técnica molecular para la detección simultánea de los dos patógenos en una sola reacción, sólo existen reportes de trabajos con simple y PCR anidada para la detección individual de los patógenos (Cevallos *et al.*, 2011). La Dúplex PCR por su grado de rapidez, sensibilidad y especificidad se convierte en una herramienta viable para el uso en estudios epidemiológicos, control y prevención de enfermedades. El objetivo principal de este trabajo fue evaluar y comparar la PCR anidada versus la técnica de Dúplex PCR basada en la amplificación simultánea de fragmentos específicos de los genomas de *Brucella* spp. y *Mycobacterium* spp. a partir de tejidos de animales bovinos y aislados bacterianos.

## 2. Material y Métodos

### 2.1 Material animal y bacteriano

Un total de 100 muestras de tejidos entre pulmón y, nódulos linfáticos traqueo-bronquiales de bovinos sin registro clínico sobre las dos enfermedades fueron recolectadas a partir de animales faenados en el Camal Municipal de la ciudad de Quevedo (Provincia de Los Ríos-Ecuador), estas fueron sumergidas en tubos de ensayo estériles con etanol al 95%, tapadas

rotuladas y conservadas a -20°C hasta la extracción del ADN. Como controles positivos se utilizaron aislados de *Brucella abortus* biovar 1-C19 en fase lisa, C-119 y *Mycobacterium tuberculosis*, las dos primeras fueron subcultivadas en el laboratorio en el medio de agar de tripticasa de soya y papa (Difco) a 37°C por 48 horas, todos los cultivos fueron facilitados por el Instituto Nacional de Higiene “Leopoldo Izquieta Pérez” de la ciudad de Guayaquil-Ecuador.

### 2.2 Extracción de ADN

Se pesó 0,50 mg de cada uno de los tejidos, se lavó tres veces con 400 µL de solución salina estéril (NaCl 0,9%) luego fueron centrifugadas por 30 segundos a 13000 rpm y, maceradas con nitrógeno líquido, a los tejidos pulverizados se colocó 500 µL de tampón de extracción TENS (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl y 1% de SDS) y 5 µL de proteinasa K (20 mg.mL<sup>-1</sup>), se incubó a 56°C por una hora. Inmediatamente, se adicionó un volumen de fenol/cloroformo/isoamil alcohol (25:24:1) y se homogenizó, posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo.

Para la precipitación del ADN se agregó dos volúmenes de etanol frío al 95%. A continuación se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos, se descartó el etanol (95%) y se resuspendió con etanol al 70%, luego se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos, se descartó el etanol (70%) y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se colocó 50 µL de tampón TE (10 mM tris-HCl pH 8 y, 1 mM Disodiun EDTA) a 55°C. Como control negativo de extracción de ADN, en todo el proceso se incluyó un tubo con agua destilada estéril. Para la extracción de ADN de los aislados bacterianos se utilizó un protocolo estandarizado (Sambrook *et al.*, 1989). La pureza y cuantificación del ADN obtenido se evaluó con el kit Qubit Fluorometer (Invitrogen).

### 2.3 PCR anidada y Dúplex PCR

Se diseñaron diez series de iniciadores dirigidos a flanquear el segmento del gen antígeno MPB70 de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Milián y Harris, 2010; Wards *et al.*, 1995), la secuencia 16S ARNr de *Brucellas* spp. y, para el control de la viabilidad del ADN se utilizó iniciadores dirigidos a amplificar una región del exón III del gen de *beta*-actina humana (Tabla 1). Los iniciadores utilizados en las pruebas de PCR para *Mycobacterium* spp. fueron |Tub-1F|/|Tub-1R| y |Tub-N-F|/|Tub-N-R| para la PCR anidada. En la PCR de *Brucella* spp. se evaluaron los iniciadores |Bru-1F|/|Bru-1R| y, para la PCR anidada |Bru-2F|/|Bru-2R|. En cuanto a las temperaturas de hibridación ( $T_m$ ) se consideraron y, se evaluaron las señaladas por el fabricante para cada serie de iniciadores.

**Tabla 1**

Iniciadores, regiones y productos de amplificación

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Región	Tamaño del producto
Tub-1F	GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA	MPB70	372 pb
Tub-1R	TAG ATG ATT GAC AGC GTG CT		
Tub-N-F	GCT GAC GGC TGC ACT CTC GGG C	MPB70	210 pb
Tub-N-R	CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C		
Bru-1F	GCG ACG ATC CAT AGC TG	16S ARNr	725 pb
Bru-1R	AAC CAT AGT GTC TCC ACT AA		
Bru-2F	GTG GGG AGC AAA CAG GAT TA	16S ARNr	210 pb
Bru-2R	CAA GGG CTG GTA AGG TTC TG		
INTER-F	CGG AAC CGC TCA TTG CC	$\beta$ -Actina	289 pb
INTER-R	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA		

La Dúplex PCR fue evaluada con la combinación de los diez iniciadores seleccionados para la PCR y la PCR anidada de los dos patógenos. En todas las amplificaciones se utilizó 2  $\mu$ L de ADN (1,0  $\mu$ g/50  $\mu$ L); se empleó: 1X (Green Go Taq® Reaction Buffer-Promega), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,0  $\mu$ M de cada uno de los iniciadores (Integrated

DNA Technologies, Inc.), 1X (2,5 mM  $MgCl_2$ )<sup>2</sup>, 2U de Taq polimerasa (GoTaq® DNA Polymerase-Promega) y 36,3  $\mu$ L de agua (libre de nucleasas-Promega), en un volumen total de 50  $\mu$ L.

Para la amplificación de ADN se utilizó un termociclador Techne (Genius Thermocycler Model TGENO2TP), la Dúplex PCR se realizó en el siguiente orden de programado; 94°C por 5 minutos y, 40 ciclos de tres segmentos: 94°C por 45 segundos; 55°C por 45 segundos; 72°C por 60 segundos, la extensión final de 72°C por 6 minutos y conservación a 4°C.

Los productos de amplificación fueron examinados en gel de agarosa al 2,5% (p/v) con bromuro de etidio a 0,5  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup> (Invitrogen) a 75V por 40 minutos. El marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb (Gilco BRL). La mezcla de cada amplicon de ADN fue con 1X BlueJuice™ Gel Loading Buffer-Invitrogen.

### 2.4 Análisis estadístico

Los resultados de concordancia fueron calculados utilizando el programa Graph Pad Prism 2,0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA) en la categoría Kappa, Quantify interrater agreement, considerando la siguiente escala: 1 - 0,81 = óptima; 0,8 - 0,61 = muy buena; 0,6 - 0,41 = regular; 0,4 - 0,21 = mala; 0,2 - 0,0 = pésima.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1 PCR y PCR anidada

El protocolo de extracción del material genómico a partir de los tejidos y cultivos bacterianos proporcionaron un ADN altamente concentrado y de buena calidad, estableciendo un promedio de 70  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> en los tejidos, mientras que en los cultivos fue de 90  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>.

Los ADNs obtenidos a partir de los aislados de *Brucella abortus* biovar 1-C19 y *Mycobacterium tuberculosis* amplificaron en todas las pruebas de PCR y, fueron usados como controles positivos. Para el análisis de *Brucella* spp. las muestras de los tejidos de pulmón y nódulos linfáticos

traqueo-bronquiales de bovinos fueron corridas con la PCR (0% positivos) y la PCR anidada (22,2% positivos), obteniendo dos productos de amplificación bien definidos de 725 y 225-pb respectivamente. Con los mismos tejidos para el análisis de *Mycobacterium* spp. se obtuvieron los productos de amplificación de 372 y 210-pb para la PCR (33,3% positivos) y la PCR anidada (38,8% positivos) respectivamente. Varios reportes sobre el diagnóstico de *Brucella* spp. y *M. bovis* en poblaciones de alta incidencia y utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido ampliamente descritas, algunas de ellas han tenido resultados similares con los obtenidos en este trabajo (Cevallos *et al.*, 2011; Milián y Harris, 2010; Estrada-Chávez *et al.*, 2004; Noredhoek *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1995b).

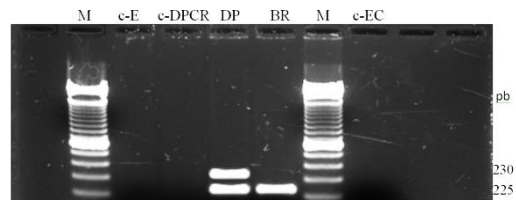
Los resultados positivos y negativos obtenidos en las muestras de tejidos, todos fueron comparados con cada una de las técnicas moleculares. La concordancia global de los datos de las muestras analizadas por la PCR simple y la PCR anidada para la detección de TB y BR en los tejidos fue equivalente a  $k = 0,85$ .

En el laboratorio algunos resultados obtenidos con la PCR anidada en muestras de tejidos de pulmón y nódulos linfáticos traqueo-bronquiales de un mismo animal, presentaron resultados diferentes (4%) en cuanto a la detección de TB, ya que las primeras muestras de tejido fueron positivas y las segundas negativas, lo que concuerda con Doran *et al.* (2009), y otros trabajos relacionados (Thoen y Barletta, 2006), quienes explican que esto se debe probablemente a que inicialmente el patógeno en etapas de ataque temprano se hospeda en la vía respiratoria, siendo el acceso principal de la infección en la mayoría de las especies de animales.

### 3.2 Dúplex PCR

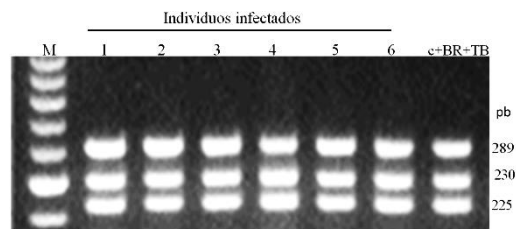
Los mejores resultados en cuanto a la amplificación simultánea más fuerte, específica y, reproducible para BR fueron

obtenidas con los iniciadores internos Bru-2F y Bru-2R, amplificando el producto reconocido de 225-pb, mientras que para TB la combinación de los iniciadores Tub-1F y Tub-N-R externo e interno respectivamente, dio un producto de 230-pb, con la combinación de estos juegos de iniciadores se implementó la Dúplex PCR (Figura 1).



**Figura 1.** Establecimiento de la Dúplex PCR. M, marcador de peso molecular; c-E, control negativo de extracción de ADN; c-DPCR, control de los reactivos de la Dúplex PCR; DP, Dúplex PCR de los aislados de TB y BR; BR, PCR anidada de *Brucella* spp. y c-EC, control con iniciadores de la Dúplex PCR en cepa de *E. coli*.

Subsecuentemente, siguiendo el patrón de resultados obtenidos en la detección de todas las muestras de tejidos y, aislados que fueron analizadas por la PCR simple y la PCR anidada. Se evaluó la concordancia entre los resultados globales obtenidos de la PCR anidada y la Dúplex PCR la cual dio un índice  $k = 0,88$  (Figura 2).



**Figura 2.** Prueba de reproducibilidad de la Dúplex PCR Gel. M, marcador de peso molecular; 1, 2, 3, 4, 5 y 6, animales infectados; c+BR+TB, control positivo (mezcla de ADNs) de bovino, *Brucella* spp. y *Mycobacterium* spp.

Trabajos relacionados en la exploración taxativa molecular del gen MPB70,

conducen a que este gen se presenta con una sola copia en cepas de *M. bovis* y otras micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (Gouzy *et al.*, 2013; Wards *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1988) pero ausente en distintos géneros y, en otras 24 especies de micobacterias. La detección molecular de TB en este trabajo coincide con varios estudios, donde esta secuencia (MPB70) es seleccionada para flanquear y amplificar específicamente la micobacteria que provoca la TB (Milián y Harris, 2010; Estrada-Chávez *et al.*, 2004; Cousins *et al.*, 1992).

Este trabajo se apoyó en la amplificación de una región del gen de  $\beta$ -Actina como marcador interno del genoma animal, para asegurar la integridad del ADN y la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra, lo que permite prevenir posibles resultados falsos negativos por degradación genómica y contaminación. Sin embargo varios resultados de no amplificación obtenidos en el laboratorio, coinciden con los datos de algunos reportes, los cuales demostraron que no fueron siempre semejantes cuando se utilizaba ADN de tejido fresco o de cultivo para la amplificación por PCR, según los autores consideran que en el tejido fresco el ADN del huésped puede interferir con la reacción (Wards, 1995; Eisenach, 1998).

La obtención de los tejidos en el camal por celeridad del faenado, llevaron a que la colección de las muestras sea de manera aleatoria, por lo que no se registró datos clínicos determinados de los animales, sin embargo los resultados obtenidos con el material génico procedente de los aislados de las cepas de BR y TB al derivar de una fuente altamente estricta (Thoen *et al.*, 2010), conducen específicamente para la detección de los patógenos con la Dúplex PCR.

De acuerdo a datos reportados sobre la concordancia con pruebas moleculares para la detección de TB y BR fueron bajas (Wood, 1988), no sucediendo con el trabajo aquí presentado. Similares resultados obtenidos por otros autores

sugieren el uso de esta técnica como una herramienta de diagnóstico viable para la detección de *Brucella* spp. y *Mycobacterium* spp. en bovinos.

#### 4. Conclusiones

Se logró implementar la técnica de Dúplex PCR para la amplificación simultánea de fragmentos específicos de *Brucella* spp. y *Mycobacterium* spp.

Para potencializar el estudio, se evaluaron y compararon todas las muestras entre las técnicas de PCR simple y la PCR anidada (Kappa,  $k = 0,85$ ). La concordancia ( $k = 0,88$ ) entre los resultados obtenidos con la PCR anidada y la Dúplex PCR para las dos bacterias fue considerada como muy buena.

Actualmente, el uso de este tipo de herramienta en el diagnóstico simultáneo de las enfermedades de TB y BR, permite establecer plataformas de estudios epidemiológicos, aunque para nosotros aún hace falta realizar trabajos a gran escala, validaciones en campo, analizar otros tipos de tejidos y fluidos, además las evaluaciones con el tamaño de muestras reportadas son aún reducidas, especialmente para la detección de infecciones crónicas.

#### Referencias bibliográficas

- Agrocalidad. 2012. Programa Nacional de control de la brucelosis. Disponible en [www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/Agrocalidad/Contenido/sanidadAnimal/docs/programa\\_nacional\\_brucelosis\\_bovina.pdf](http://www.agrocalidad.gob.ec/agrocalidad/images/Agrocalidad/Contenido/sanidadAnimal/docs/programa_nacional_brucelosis_bovina.pdf).
- Cardoso, M.; Cardoso, R.; Hirata, R.; Hirata, M.; Leite, C.; Santos, A.; Siqueira, V.; Okano, W.; Rocha, N.; Lonardoni, M. 2009. Direct Detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Lymph Nodes by PCR. *Zoonoses and Public Health* 56 (8): 4655 – 4700.
- Cevallos, O.; Escobar, A.; Carranza, M.; Saucedo, S.; Romero, D.; Reyes, X.; Zambrano, S. 2011. Comparación de las técnicas PCR anidada y Rosa de Bengala para la detección de *Brucella* spp. en bovinos. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 32: 49 – 57.
- Cosivi, O.; Grange, J.; Daborn, C.; Raviglione, M.; Fujikura, T.; Cousins, D.; Robinson, R.; Huchzermeyer, I.; De Kantor, and Meslin, F. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases* 4: 59 – 70.
- Cousins, D.; Wilton, S.; Francis, B.; Gow, B. 1992. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of

- tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 255 – 258.
- De Kantor, I.; Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet Microbiol* 112: 111 – 118.
- De Waard, J.; Robledo, J. 2007. Conventional Diagnostic Methods. Inc: Tuberculosis: From Basic Science to patient care. Palomino J.C., Leaño S., Ritacco V. (Eds). (First edition). Antwerp – Sao Paolo – Buenos Aires Raderschadt.
- Díaz, R.; Moriyón, I. 1989. Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: *Brucellosis: Clinical and Laboratory Aspects*. Young EJ, Corbel MJ (Eds), CRC Press, FL, USA, 73-83.
- Doran, P.; Carson, J.; Costello, E.; More, S. 2009. An outbreak of tuberculosis affecting cattle and people on an Irish dairy farm, following the consumption of raw milk. *Irish Veterinary Journal* 62: 390 – 397.
- Eisenach, K. 1998. Molecular diagnostics, in *Mycobacterium-Molecular Biology and Virulence* (Rutledge, C. and Dale, J., eds.). Oxford, UK: Blackwell Science.
- Estrada-Chávez, C.; Díaz, F.; Arriaga, C.; Villegas-Sepúlveda, N.; Pérez, R.; Gonzáles, D. 2004. Concordancia de la PCR y Métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Veterinaria México*. 35 (3): 225 – 236.
- Gozy, A.; Nigou, J.; Gilleron, M.; Neyrolles, N. 2013. Tuberculosis 2012: biology, pathogenesis and intervention strategies; an update from the city of light. *Research in Microbiology* 164: 270 – 280.
- Herman, L.; Ridder, H. 1992 Identification of *Brucella* spp. by Using the Polymerase Chain Reaction. *Appl Env Microbiol* 58: 2099 – 2101.
- Leal-Klevezas, D.; López, Y.; Martínez, V. 1995a. Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Arch Med Res* 26: 263 – 267.
- Leal-Klevezas, D.; Martínez-Vásquez, I.; López-Merino, O.; Martínez-Soriano, J. 1995b. Single Step PCR for the Detection of *Brucella* spp. From Blood and Milk of Infected Animals. *J Clin Microbiol* 33: 3087 – 3090.
- Martínez, V.; Irma, M. 2000. Diagnóstico simultáneo de brucellosis y tuberculosis mediante PCR-Multiplex. *Bioquímica* 25: 53 – 57.
- Milián, F.; Harris, B.; Arriaga, C.; Thomsenb, B.; Stuberb, T.; González, D.; Álvarez, G.; Santillán, M.; Morales, A.; Estrada, C. 2010. Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. *Rev Mex Cienc Pecu* 1(4): 403 – 415.
- Morales, A.; Loredo. 2000. Detección simultanea de *Brucella* spp. y organismos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR-Multiplex. *Bioquímica* Vol. 25. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.
- Noredhoek, G.; Van-Embden, J.; Kolk, A. 1996. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 34: 2522 – 2525.
- OIE. International Office of Epizootic. 2008. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Sixth Edition. Volume 2. Paris.
- Pao, C. 1990. Detection and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA Amplification. *J Clin Microbiol* 28: 1877 – 1880.
- Romero, C.; Pardo, M.; Grillo, J.M.; Diaz, R.; Blasco, J.M.; Lopez-Goñi, I. 1995b. Evaluation of PCR and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Milk Samples for Diagnosis of Brucellosis in Dairy Cattle. *J Clin Microbiol*. 33: 3198 – 3200.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2da Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York.
- Savic, B. 1992. Evaluation of PCR, tuberculosis acid analysis and direct microscopy for the detection of *Mycobacterium*. *J Infect Dis* 166: 1177 – 1180.
- Shankar, P.; Manjunath, K.K. 1991. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by PCR. *Lancet* 337: 5 – 7.
- Sreevatsan, S.; Bookout, J.; Ringpis, F.; Perumaalla, V.; Ficht, T.; Adams, G.; Haguis, S.; Bricker, B.; Kumar, G.; Rajasekhar, M.; Isloor, S. 2000. A Multiplex Approach to Molecular Detection of *Brucella abortus* and/or *Mycobacterium bovis* Infection in Cattle. *J Clin Microbiol* 38: 2602 – 2610.
- Sreevatsan, S.; Pan, K.; Stockbauer, N.; Connel, B.; Krieswirth, T.; Whittam, S.; Musser, J. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9869 – 9874.
- Thoen, C.; Barletta. 2006. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis*. In: *Mycobacterium bovis* infection in animals and human. Thoen C., Steell J., Gilsdorf M. (Eds). Second edition) USA: Wiley - Blackwell.
- Thoen, C.; Lobue, P.; De Kantor, I. 2010. Why has zoonotic tuberculosis not received much attention?. *Int J Tuberc Lung Dis* 14: 1073 – 1074.
- Wards, B.; Collins De Lisle, G. 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol* 43: 227 – 240.
- Wood, P.; Ripper, J.; Radford, A.; Bundesen, P.; Rylatt, D.; Cottis L.; John, M.; Plackett, P. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium bovis*. *J Gen Microbiol* 134: 2599 – 2604.