

Sensibilidad y especificidad de PCR anidada y Spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco

Sensitivity and specificity of nested PCR and spoligotyping as quick diagnostic tests for bovine tuberculosis in fresh tissue

Feliciano Milián Suazo^a, Beth Harris^b, Camila Arriaga Díaz^c, Bruce Thomsen^b, Tod Stuber^b, Dante González Suárez^c, Genoveva Álvarez Ojeda^d, Marco A. Santillán Flores^c, Alberto Morales Loredó^d, Ciro Estrada Chávez^e

RESUMEN

El diagnóstico rápido de tuberculosis en ganado es crítico para decidir si un hato debe someterse a cuarentena de manera definitiva o despoblarse. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sensibilidad y la especificidad relativa de dos PCR's (MPB70 y IS6110) y spoligotyping como pruebas rápidas de diagnóstico de tuberculosis bovina en tejido fresco. Se usaron 50 muestras de tejido con lesión, provenientes de un hato con 25 % de prevalencia de la enfermedad y 50 muestras de tejido sin lesión, provenientes de un hato libre de la enfermedad. Las muestras se dividieron en dos partes y cada parte analizada en ciego por dos laboratorios diferentes con un mismo protocolo. Las tres pruebas fueron utilizadas para el diagnóstico en tejido macerado tomado inmediatamente antes del cultivo. La sensibilidad y la especificidad relativa de las pruebas diagnósticas se determinaron usando el resultado de presencia/ausencia de lesiones, histopatología y cultivo como "pruebas de oro." La PCR MPB70 demostró de manera consistente mayor sensibilidad (85 a 91 %) y especificidad (77 a 86 %) en uno de los laboratorios con todas las pruebas de oro. Sin embargo, se observaron diferencias inter-laboratorio: en el segundo laboratorio la sensibilidad fue de 89 a 91 %, pero la especificidad fue baja (57 a 63 %). La PCR IS6110 anidada y spoligotyping tuvieron un pobre comportamiento. La sensibilidad y la especificidad relativa para la PCR MPB70 sugiere que esta prueba puede ser de utilidad como prueba complementaria para el diagnóstico rápido.

PALABRAS CLAVE: Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, Diagnóstico, Bovinos, Epidemiología, PCR.

ABSTRACT

Quick diagnosis of tuberculosis in cattle is critical to decide whether or not to quarantine or depopulate a herd. Currently, decisions are based on culture, which takes between four and eight weeks to accomplish. Therefore, the purpose of this study was to evaluate relative sensitivity and specificity of two PCR's (MPB70 and IS6110) and spoligotyping as quick diagnostic tests for cattle tuberculosis in fresh tissue. Fifty tissue samples with TB-suspicious lesions from a herd with 25 % prevalence of the disease and fifty tissue samples with no lesions from a TB-free herd were used in the study. Samples were split into two sets and each set was blind analyzed in two different laboratories under the same protocol. The three tests were used to diagnose tuberculosis in all samples using macerated tissue just before culturing. Relative sensitivity and specificity of all tests were estimated using presence/absence of lesion, histopathology and culture results as gold standards. MPB70 nested PCR showed consistently higher sensitivity (85 to 91 %) and specificity (77 to 86 %) in one of the laboratories with all gold standards; however, inter-laboratory differences occurred, in one of the laboratories sensitivity was from 89 to 91 % and specificity from 57 to 63 %. IS6110 nested PCR and spoligotyping behaved poorly. Relative sensitivity and specificity for MPB70 nested PCR suggest that this test could be useful as a complementary test for quick diagnosis of bovine TB in fresh tissue.

KEY WORDS: Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, Diagnostic tests, Cattle, Epidemiology, PCR.

Recibido el 12 de agosto de 2009. Aceptado para su publicación el 24 de mayo de 2010.

^a CENID-Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP. Km. 1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, Qro. México. Teléfono y Fax: 419 2920036, 2920033. milian.feliciano@inifap.gob.mx. Correspondencia al primer autor.

^b NVSL-APHIS-USDA, United States;

^c CENID-Microbiología, INIFAP México;

^d CE Terán, INIFAP, México.

^e CIATEJ-Guadalajara, Jalisco. México.

Mycobacterium bovis, el agente causante de la tuberculosis bovina (BTB), también infecta a una amplia gama de especies mamíferas, incluyendo al hombre⁽¹⁾. En países en desarrollo la BTB es una zoonosis importante, especialmente entre poblaciones de alto riesgo como son trabajadores de establos y de rastro, veterinarios y personas que consumen leche bronca o queso fresco elaborado con leche bronca proveniente de hatos infectados⁽²⁾. Actualmente la BTB es también importante por las pérdidas económicas que ocasiona a la industria ganadera, así como por los costos de los programas de control y erradicación⁽³⁾ y la limitante que representa para el libre comercio de animales y sus productos⁽⁴⁾.

Los programas de control y erradicación de la BTB se basan en la tuberculinización y la eliminación de los animales reactivos; sin embargo, el comportamiento epidemiológico de la prueba ha sido una preocupación constante por sus parámetros irregulares de sensibilidad (40 a 90 %) y especificidad (78 a 96 %)^(5,6), lo que predispone a la presencia de resultados falsos positivos y falsos negativos. Con frecuencia los animales que reaccionan a la tuberculina no presentan lesiones en rastro, lo que reduce la confianza de los productores en los programas oficiales de control; el desecho de animales falsos negativos es un costo extra para el productor.

La inspección *post-mortem* en rastro se realiza para confirmar el diagnóstico de la tuberculina por la presencia de lesiones compatibles con TB, especialmente en nódulos linfáticos asociados al tracto respiratorio. La inspección de canales como medio de diagnóstico es práctico cuando se combina con histopatología para identificar lesiones microscópicas de tuberculosis o para identificar bacilos ácido-alcohol resistentes^(7,8). Sin embargo, en algunos países, para llegar al diagnóstico definitivo se envían al laboratorio lesiones de tejido sospechoso para el cultivo, el cual toma entre 4 y 8 semanas. Este proceso es poco práctico, caro y tardado; los veterinarios oficiales o el productor tienen que esperar mucho tiempo por los resultados para dictaminar sobre una cuarentena. Afortunadamente, las nuevas técnicas de amplificación de ADN han incrementado de manera importante las alternativas de diagnóstico.

Mycobacterium bovis, the cause of bovine tuberculosis (BTB), also infects a wide range of mammalian species, including man⁽¹⁾. In developing countries BTB is a very important zoonosis, specially in high risk populations, like farm and abattoir workers, veterinarians and people consuming fresh cheese and raw milk from infected herds⁽²⁾. Currently, BTB is also a mayor concern because of the economic cost to the livestock industry due to expenses in control and eradication programs⁽³⁾ and constrains for international trade of animals and their products⁽⁴⁾.

Control and eradication programs are mostly based on tuberculin testing and disposal of reacting animals; however, the epidemiological performance of this test has always been a concern because of the poor sensitivity (70 to 90 %) and specificity (78 to 96 %)^(5,6), which are prone of false positive and false negative results. Frequently, positive tuberculin-reacting animals show no lesions at slaughter, reducing confidence and participation of producers in official eradication programs; disposed of false-negative animals is an extra cost to producers.

Postmortem inspection of carcasses is performed in order to confirm the tuberculin test diagnosis throughout the presence of lesions compatible with TB, especially in lymph nodes associated to the respiratory tract. Carcass inspection as means of diagnosis is practical when combined with histopathology to identify microscopy lesions of TB or to identify acid-fast bacilli^(7,8). However, in some countries, for a definitive diagnosis, tissue-samples with lesions are sent for culture to the bacteriology laboratory, where isolation and biochemical characterization of *M. bovis* might take from 6 to 8 wk. This process is impractical, expensive and time consuming, official veterinarians or farmers have to wait for the laboratory results in order to remove a cautionary quarantine. Recent DNA-amplification based techniques have greatly enhanced diagnostic alternatives.

Diagnostic techniques based on amplification of *M. bovis* DNA throughout the polymerase chain reaction (PCR) have been described⁽⁹⁾. The polymerase chain reaction (PCR)⁽¹⁰⁾ can amplify

Las técnicas de diagnóstico basadas en la amplificación de ADN de *M. bovis* a por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han sido ampliamente descritas⁽⁹⁾. La PCR⁽¹⁰⁾ puede amplificar cantidades extremadamente pequeñas de ADN, aun cuando las cantidades estén en el rango de picogramos⁽¹¹⁾ y hacerlas detectables por medios convencionales. Una PCR que tiene como blanco el gen que codifica la proteína MPB70, considerada específica para *M. bovis*⁽¹²⁾, ha demostrado buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de tuberculosis en humanos y ganado⁽¹³⁾. Una sola copia de este gen está presente en cepas de *M. bovis* y otras micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, pero ausente en otras 24 especies y otros géneros bacterianos. Así mismo, una PCR_{MPB70} anidada demostró alta sensibilidad y especificidad cuando se usó la presencia/ausencia de lesiones sospechosas de TB como “prueba de oro” en 21 animales provenientes de una zona endémica y 20 animales de una zona libre de BTB. Esta prueba también demostró ser muy sensible, detectando cantidades de hasta 10 fg de ADN⁽¹⁴⁾.

La amplificación de secuencias de inserción, tales como IS6110, que se conoce están presentes en diferente número de copias en bacterias del complejo *M. tuberculosis*, también han sido usadas en el diagnóstico de la tuberculosis en humanos y ganado, y se usa en la actualidad para confirmar infección en tejidos fijados en parafina⁽¹⁵⁾. Sin embargo, esta técnica genera resultados falsos negativos si los tejidos permanecen en formol por periodos prolongados de tiempo.

Otra técnica basada en PCR es la de *spoligotyping*. Este es un método que detecta la presencia de espaciadores de secuencias repetidas (DR, por sus siglas en inglés) en un locus del genoma de *M. bovis*. Se encontró que esta región cromosomal contiene un número grande de DRs de 36 pb separadas por espaciadores de ADN variable (DVRs, por sus siglas en inglés) de 35 a 41 pb de longitud. Cuando se compararon las DRs de varios aislados, se observó que el orden de los espaciadores era similar, pero que ocurrían algunas deleciones o inserciones. De este modo, el polimorfismo viene de la ausencia/presencia de uno o más de estos

extremely small amounts of DNA when a target sequence is present in picogram quantities⁽¹¹⁾. PCR targeting the gene that encodes the MPB70, which is considered to be species specific for *M. bovis*⁽¹²⁾, protein has shown good sensitivity and specificity for the diagnosis of tuberculosis in humans and cattle tissue⁽¹³⁾. A single copy of this gene is present in strains of *M. bovis* and other bacteria of the *M. tuberculosis* complex, but absent in 24 other species and other bacteria genera. A nested MPB70-PCR showed high sensitivity and high specificity when using the presence or absence of TB-suspicious lesions as the “gold-standard” in 21 cattle coming from a TB endemic area and 20 from a TB-free area. The test was also highly sensitive, it picks as low as 10 fg of DNA⁽¹⁴⁾.

Amplification of insertion sequences such as IS6110, known to be present in different number of copies in bacteria of the *M. tuberculosis* complex, has also been used in the diagnosis of tuberculosis in humans and cattle, and is currently used to confirm infection in paraffin embedded tissue samples⁽¹⁵⁾. However, this technique is prone to false negative results if tissues are allowed to remain in formalin for extended periods of time.

Spoligotyping is another technique based on PCR. This is a method that detects the presence or absence of spacers of the direct repeat (DR) locus of the *M. bovis* genome. This chromosomal region was found to contain a large number of DRs of 36 bp interspersed by spacer of variable DNA (DVRs) 35 to 41 bp in length. When the DR regions of several isolates were compared, it was observed that the order of the spacers was about the same in all isolates, but deletions and insertions of DVRs occurred. The polymorphism in various isolates comprises the absence or presence of one or more DVRs. Spoligotyping therefore, detects the presence or absence of spacers of known sequence, a characteristic that is used to determine genetic similarity among strains⁽¹⁶⁾. Although this technique is typically used to characterize DNA extracted from sub-cultured isolates, it can also be used for simultaneous detection and typing of *M. tuberculosis* complex strains, including *M. bovis*, directly in clinical samples^(17,18). Because the procedure

espaciadores variables. Así, *spoligotyping* detecta la presencia o la ausencia de estos espaciadores de secuencia conocida, característica que es utilizada para determinar similitud genética entre cepas⁽¹⁶⁾. Aunque esta técnica es básicamente utilizada para la tipificación de cepas extraídas de cultivo, también ha demostrado su utilidad para simultáneamente detectar y tipificar cepas del complejo *M. tuberculosis* directamente de muestras clínicas^(17,18). Dado que el procedimiento involucra la amplificación de la región DR por PCR, seguido de la hibridación con oligonucleótidos específicos para cada espaciador, supuestamente esta técnica muestra mayor sensibilidad y especificidad que otros métodos basados en PCR. Así, el objetivo del presente estudio fue evaluar la sensibilidad y la especificidad de una PCR anidada, utilizando como blanco el gen MPB70 y la secuencia IS6110, así como también *spoligotyping* como métodos de diagnóstico rápido de la tuberculosis bovina en tejido fresco.

Para el estudio se utilizaron 50 muestras de tejido con lesiones macroscópicas sospechosas de tuberculosis proveniente de una zona endémica con 25 % de prevalencia y 50 muestras de tejido sin lesión proveniente de una zona libre de tuberculosis, colectadas por la inspección de canales en rastro. Cada muestra fue dividida en dos partes y cada parte fue congelada y enviada de manera codificada y en ciego para su análisis a uno de dos laboratorios: México (Lab 1) y Estados Unidos de Norteamérica (Lab 2), donde ambos usaron el mismo protocolo de trabajo.

A cada una de las muestras se les realizó histopatología y cultivo para confirmar el diagnóstico por la presencia de lesiones sugestivas de BTB y la presencia del bacilo, respectivamente. El cultivo se realizó siguiendo el método descrito por Payeur *et al.*⁽¹⁹⁾. En el caso de México, la histopatología y el cultivo fueron realizados en el laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-Micro) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias (INIFAP) en Palo Alto, D.F. La sensibilidad y la especificidad relativa para las tres pruebas fue estimada utilizando la presencia/ausencia de lesiones y los resultados de histopatología y

involves amplification of the DR region by PCR followed by hybridization with specific spacer oligonucleotides, it is expected to show higher sensitivity and specificity than other PCR-based diagnostic techniques. Therefore, the objective of this study was to evaluate the sensitivity and specificity of nested PCR, with the MPB70 gene and the IS6110 sequence as targets, and *spoligotyping* as quick diagnostic tools in fresh tissue.

Fifty tissue samples with gross TB-suspicious lesions from tuberculin-reacting cattle in an endemic area with 25 % prevalence, and 50 tissue samples with no lesions from cattle in TB-free herds, collected by carcass inspection at abattoirs, were used in the study. All samples were split into two parts, and each part sent frozen, identified with a code number, blind to technicians, to any of two diagnostic laboratories, one in Mexico (Lab 1) and one in the United States of America (USA) (Lab 2), for analysis. Both laboratories followed the same protocol of analysis.

Histopathology and culture were performed in all samples to confirm diagnosis by the presence of TB-compatible micro-lesions and the presence of *Mycobacterium*, respectively. Culture was performed following the protocol described by Payeur *et al.*⁽¹⁹⁾. In the case of Mexico, histopathology and culture were performed in the laboratory of Microbiology at INIFAP in Palo Alto, DF. Relative sensitivity and specificity for the three tests under evaluation were estimated using presence or absence of lesions, culture and histopathology results as “gold standard.” All samples were handled in the same way at all times.

DNA for the PCR tests was obtained from the tissue following the cetyl trimethyl ammonium (CTAB) method⁽²⁰⁾. Briefly, about 0.5 ml from each sample of tissue homogenate was transferred to a micro-centrifuge tube (1.9 ml), and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and the supernatant decanted. After centrifugation the pellet was homogenized with 400 μ l of TE (100 mM tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA), and 50 μ l of lisozyme (100 mg/ml, Sigma Cat. # L6876) to break the cells wall, and incubated for 1 h at 37 °C. Then, 70 μ l of 10% SDS was added, followed by 6 μ l of a proteinase K solution (10 mg/ml Sigma Cat. # P4850) to

cultivo como “pruebas de oro.” Todas las muestras se manejaron en las mismas condiciones en todo momento.

El ADN para las pruebas de PCR se obtuvo a partir del tejido siguiendo el método del amonio acetil-trimetil (CTAB, por sus siglas en inglés)⁽²⁰⁾. De manera resumida, 0.5 ml de cada homogenado de muestra de tejido fue transferido a un tubo de microcentrífuga (1.9 ml) y centrifugado a 10,000 rpm por 10 min, de donde posteriormente se decantó el sobrenadante. Después de la centrifugación, el pellet fue homogenizado con 400 μ l de TE (100 mM tris-HCL, pH 8.0, 10 mM EDTA) y 50 μ l de lisosima (100 mg/ml, Sigma No. de Cat. L6876) para romper la pared celular e incubado a 37 °C por 1 h. Posteriormente se añadieron 70 μ l de SDS al 10%, seguido por 6 μ l de una solución de proteinasa K (10 mg/ml Sigma No. de Cat. P4850) para inactivar las proteínas e incubado a 65 °C por 10 min. Después de la incubación, a cada muestra se le agregaron 10 μ l de 5 M NaCl, seguido por 80 μ l de una solución de 5M NaCl con 5% N-cetyl-N, N, N, -bromuro de trimetil amonio, así, la mezcla se incubó a 65 °C por 10 min.

La extracción de ADN se hizo utilizando un volumen de fenol/cloroformo/isoamil (24:1) y la precipitación posterior con 0.6 volúmenes de isopropanol absoluto, lavado con 1 ml de 70% de etanol. Posteriormente fue resuspendido en 200 μ l de agua (MILI-Q) y cuantificado con el uso de diluciones de 1:50 con un espectrofotómetro GeneQuant II. Las lecturas se hicieron a 260 y 280 nm para estimar la concentración y la pureza. El ADN genómico, purificado y homogenizado a 100 ng/ μ l se observó por electroforesis en un gel de agar a 0.7% teñido con bromuro de etidio y corrido a 120 volts durante 50 min. Los geles fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados con una cámara instantánea.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 20 μ l. La mezcla de PCR tuvo una concentración final de 10 mM de tris-HCL (pH 8.3); 50 mM de KCl; 250 μ M de cada dNTP; 0.4 μ M de cada oligonucleótido; 0.5 U de Taq polimerasa, 1% de trito X-100; 0.15 mg/ml de albúmina bovina sérica (el Lab 2 no usó este aditivo)

inactivate proteins, and incubated at 65 °C for 10 min. After incubation, 100 μ l of 5 M NaCl were added to each sample followed by 80 μ l of a 5 M NaCl solution with 5% N-cetyl- N, N, N, -trimethyl ammonium bromide and the mix incubated at 65 °C for 10 min.

DNA was extracted with one volume of phenol/chloroform/isoamyl (24:1), and then precipitated with 0.6 volumes of absolute isopropanol, washed with 1 ml of 70% ethanol. It was then re-suspended in 200 μ l of water (MILI-Q) and quantified using 1:50 dilutions with a GeneQuant II spectrometer. Readings were performed at 260 nm and at 280 nm to estimate concentration and pureness. Genomic DNA, purified and homogenized a 100 ng/ μ l was visualized by electrophoresis in a 0.7% agar gel stained with 0.005% ethidium bromide, run at 120 volts during 50 min. Gels were observed in a UV transilluminator and photographed with an instant camera.

PCR reactions were carried out in a final volume of 20 μ l. The PCR mix had a final concentration of 10 mM of tris-HCl (pH 8.3); 50 mM of KCl; 250 μ M of each dNTP; 0.4 μ M of each oligonucleotide; 0.5 U of Taq polymerase, 1% of triton X-100; 0.15 mg/ml of bovine serum albumin (Lab 2 did not use this additive) and 500 ng of DNA. PCR programs were run in a Gene Amp PCR system 2400 (Lab 2 used the 9700 system) and the products analyzed in 3% agarose gels.

In order to eliminate PCR inhibitors and to show the viability of the DNA, a control PCR was performed with specific oligonucleotides for amplification of a 375 base-pair fragment (bp) of the cyb gene, which codifies cytochrome b in the bovine mitochondrial DNA. Primers and amplifying protocol were: (CYBI 5' CCA TCC (TCA) AAC ATC (ATT) TCA GCA (TCA) TGA TGA AA 3' and CYB2 5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA 3'; 24 cycles (30 cycles) of 94 °C for 30 sec, 60 (58 °C) for 30 sec, and 72 °C for 30 sec. Differences between laboratories in primers sequences and number of cycles are indicated in parenthesis.

Once the DNA samples were optimized by PCR amplification, a simple PCR was run for diagnosis

y 500 ng de ADN. Los programas de PCR se corrieron en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 (el Lab 2 usó el sistema 9700) y los productos se analizaron en gel de agarosa al 3%.

Para eliminar los inhibidores en la reacción de PCR y para mostrar la viabilidad del ADN, se incluyó un control con oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento de 375 pb del gen *CyB*, el cual codifica el citocromo b del ADN mitocondrial. Los iniciadores y el protocolo de amplificación fueron: CYBI 5' CCA TCC (TCA) AAC ATC (ATT) TCA GCA (TCA) TGA TGA AA 3' y CYB2 5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA 3'; 24 ciclos (30 ciclos) a 94 °C por 30 seg, 60 °C (58 °C) por 30 seg y 72 °C por 30 seg. Las diferencias entre laboratorios en la secuencia de los iniciadores y el número de ciclos se indican en paréntesis.

Una vez que las muestras de ADN fueron optimizadas con la amplificación de ADN, se corrió una PCR simple para hacer el diagnóstico de TB por medio de la amplificación de un segmento de 372 pb del gen *MPB70* de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (TB1F 5' GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA 3' and TB1R 5' TAC ATG ATT GAC AGC GTG CT 3'); El protocolo de amplificación fue: 24 ciclos a 94 °C por 45 min, 60 °C (58 °C) por 30 seg y 72 °C por 1 min⁽²¹⁾. Posteriormente se usó un décimo del producto para amplificar un fragmento de 208 pb dentro de la región del fragmento de 372 pb del gen *MPB70* por medio de un PCR anidado con los oligonucleótidos diseñados para este estudio (M22/3 5' GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC 3' y M22/4 5' CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3'); 35 ciclos de 94 °C por 30 seg y 1 min a 72 °C, usando la misma temperatura para la hibridación y la extensión⁽¹⁴⁾.

El PCR para la secuencia IS6110 se realizó de acuerdo al procedimiento original desarrollado para *M. bovis*⁽¹⁵⁾. El ADN se extrajo del macerado de tejido por el método de CTAB. De manera alternativa, se preparó un extracto crudo de tejido a partir de dos secciones de parafina (5 mm cada uno) que fue puesto en un tubo de microcentrífuga

of TB by amplifying a 372 bp segment of the *MPB70* gene of the *M. tuberculosis* bacteria complex (TB1F 5' GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA 3' and TB1R 5' TAC ATG ATT GAC AGC GTG CT 3'); The amplifying protocol was: 24 cycles at 94 °C for 45 min, 60 °C (58 °C) for 30 sec, and 72 °C for 1 min⁽²¹⁾. Then, one tenth of the product was used to amplify a 208 bp fragment, within the 372 bp region of the *MPB70* gene by a nested PCR with the oligonucleotides designed for this study (M22/3 5' GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC 3' and M22/4 5' CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3'); 35 cycles of 94 °C for 30 sec and 1 min at 72 °C, using the same temperature for annealing and extension⁽¹⁴⁾.

PCR for the IS6110 sequence was carried out according to the original procedure developed for *M. bovis*⁽¹⁵⁾. DNA was extracted from macerated tissue by the CTAB method. Alternatively, a crude tissue extract was prepared from two paraffin sections (5 mm each) that was placed in a 1.5 ml microcentrifuge tube and pelleted by centrifugation at 16,000 rpm for 2 min, followed by the addition of 200 µl water containing 0.5% Tween 20. The tube was then placed to two cycles 10 min boil followed by snap freezing (liquid nitrogen). After a third 10 min boil, the sample was centrifuged at 7,000 rpm for 20 min, and 70 µl of the supernatant was used for each PCR test.

An initial amplification using external primers that amplify a 583 bp fragment of the insertion sequence IS6110, as reported by Wilson⁽²²⁾, was performed, followed by a second amplification of a fragment of 200 bp. Amplifications were performed with a hot-start method. The reaction mix (final volume of 25 µl) had 25 pmoles primers, 2.5 U DNA polymerase (Promega Inc.), 1.0 mM MgCl₂, and 0.2 mM nucleotides (PCR Nucleotide Mix, Bioline, Inc.). Positive control DNA was obtained from extracts of bacterial cultures of reference strains AN5 and BCG. Each PCR was run including a negative (reagent only) control, and at least one negative tissue control (bovine lymph node) for every 20 samples (Laboratory one did not use this control parameters). Amplification protocol for external primers were: one cycle 2 min at 93 °C, 35 cycles

de 1.5 ml y peleteado por centrifugación a 1,600 rpm por 2 min, seguido de la adición de 200 μ l de agua con 0.5% de Tween 20. Este tubo se puso entonces a dos ciclos de 10 min de ebullición seguido por congelación rápida (nitrógeno líquido). Después de un tercer ciclo de ebullición, la muestra se centrifugó a 7,000 rpm por 20 min y 70 μ l del sobrenadante fue utilizado para la PCR.

Posteriormente se realizó una amplificación usando los iniciadores externos que amplifican un fragmento de 583 pb de la secuencia de inserción IS6110, según lo reportado por Wilson⁽²²⁾, seguida de una segunda amplificación de un fragmento de 200 pb. Las amplificaciones fueron realizadas con un método de "inicio-caliente". La mezcla de la reacción (volumen final de 25 μ l) contenía 25 pmoles de iniciadores, 2.5 U ADN polimerasa (Promega Inc.), 1.0 mM MgCl₂ y 0.2 mM de nucleótidos (mezcla de nucleótidos para PCR, Bioline, Inc.). El control positivo de ADN se obtuvo de extractos de cultivo bacteriano de las cepas de referencia AN5 y BCG. En cada PCR se incluyó un control negativo (sólo reactivo) y al menos un control de tejido negativo (linfonodo de bovino) por cada 20 muestras (el Lab 1 no usó estos controles). El protocolo de amplificación para los iniciadores externos fue: un ciclo de 2 min a 93 °C, 35 ciclos a 93 °C por 45 seg, 65 °C por 1 min, 72 °C por 45 seg y 10 min finales de extensión a 72 °C. Cinco μ l del producto de esta PCR se utilizaron para la segunda reacción. El protocolo de amplificación de los iniciadores internos fue: un ciclo a 93 °C, 35 ciclos a 93 °C por 45 seg, 45 seg a 48 °C (el Lab 2 usó 50 °C) y 45 seg a 72 °C, con un periodo de extensión final de 10 min a 72 °C. El producto de amplificación fue teñido con bromuro de etidio y analizado por electroforesis en gel de agarosa.

Spoligotyping se realizó tal como lo describe Kamerbeek *et al*⁽¹⁷⁾. De manera resumida, la amplificación del ADN se corrió en una mezcla de PCR de 50- μ l, la cual contenía: 5 μ l of 10X buffer de reacción (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCl), 4 μ l de una mezcla de dNTP (10 mM cada uno), 2.5 μ l de 25 mM MgCl₂, 20 pmol de cada iniciador (DRa 5' -GGT TTT GGG TCT GAC GAC- 3' marcado con biotina en la terminal 5', y

at 93 °C 45 sec, 65 °C, 1 min, 72 °C 45 sec and a final 10 min extension at 72 °C. Five μ l of this PCR product was used for the second reaction. The protocol for the internal primers was: one cycle at 93 °C, 35 cycles of 45 sec at 93 °C, 45 sec at 48 °C (laboratory two used 50 °C) and 45 sec at 72 °C, with a final extension period of 10 min at 72 °C. The amplification products were stained with ethidium bromide and analyzed by gel electrophoresis.

Spoligotyping was performed essentially as described by Kamerbeek⁽¹⁷⁾. Briefly, amplification of DNA was run in a 50- μ l PCR mix containing 5 μ l of 10X reaction buffer (100 mM Tris-HCL, pH 8.3, 500 mM KCl), 4 μ l of dNTP mixture (10 mM each), 2.5 μ l of 25 mM MgCl₂, 20 pmol of each oligonucleotide primer (DRa 5' -GGT TTT GGG TCT GAC GAC- 3' marked with biotin at the 5' end, and DRb 5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC -3'), 0.625 U of Amplitaq polymerase (Perkin-Elmer), and 5 μ l of template DNA. Amplifications were obtained in a thermal cycler by using 1 cycle at 96 °C for 3 min, 30 cycles at 96 °C for 1 min, followed by 55 °C for 1 min, and 72 °C for 30 sec. Hybridization was performed as recommended by the manufacturer (Isogen). Hybridized DNA was detected with either the ECL chemiluminescent detection liquid (Amersham International), or using the CDP-Star detection liquid (Roche Applied Sciences; Indianapolis, IN) followed by exposure to X-ray film (Eastman Kodak) for 12 min, or electronically captured, digitalized, and normalized for analysis using a ChemiDoc EQ gel documentation system (Bio-Rad; Hercules, CA). *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* BCG and AN5 were included in the molecular analysis as controls of known spoligo patterns.

To estimate relative sensitivity and specificity of the tests, presence or absence of lesions in tissue, culture and histopathology results were used as "gold standard." The kappa test was used to evaluate concordance between tests. All statistical analyses were carried out in SPSS version 16.

Results show that the proportion of samples positive to histopathology from those with TB-gross lesions was 91 and 93 %, for laboratory one and laboratory

DRb 5' -CCG AGA GGG GAC GGA AAC -3'), 0.625 U de Amplitaq polymerase (Perkin-Elmer) y 5 µl de ADN blanco. Las amplificaciones se obtuvieron en un termociclador usando: 1 ciclo a 96 °C por 3 min, 30 ciclos a 96 °C por 1 min, seguido por 55 °C por 1 min y 72 °C por 30 seg. La hibridización se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Isogen). El ADN hibridado se detectó con alguno de los siguientes métodos, líquido quimiluminiscente de detección ECL (Amersham International), o líquido de detección CDP-Star (Roche Applied Sciences; Indianapolis, IN) seguido por exposición a rayos X (Eastman Kodak) por 12 min, o por captura electrónica, digitalizado y estandarizado en un sistema foto documentador (ChemiDoc EQ gel documentation system: Bio-Rad; Hercules, CA). Se incluyó en el análisis molecular *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG y AN5 como controles de espoligotipo conocido.

Para estimar la sensibilidad y la especificidad relativa de las pruebas, se utilizó la presencia/ausencia de lesiones macroscópicas en tejido, el resultado del cultivo y de histopatología como "pruebas de oro". Se utilizó también la prueba de kappa para evaluar el nivel de concordancia entre

two, respectively, while the proportion of negatives in the TB-lesion free samples was 100 % in both laboratories. The proportion of culture positive samples in the TB-gross lesions group was 84 and 93 %, for Lab 1 and Lab 2, respectively, while the proportion of negatives in the TB-negative lesions group was 98 % for both laboratories (Table 1). Surprisingly, one of the animals from the lesion free set of samples came out to be infected.

Relative sensitivity and specificity of the three quick diagnostic tests was estimated using presence or absence of lesions in tissue, culture and histopathology as "gold standards." When using presence/absence of lesions, sensitivity for the MPB70 nested PCR was 85 vs 91 %, for laboratory one and two, respectively; however, specificity was different, 86 vs 63 %, with different kappa values: 72 vs 54 % for laboratories one and two, respectively. In the case of IS6110 PCR, results were poor in both laboratories, 3 and 70 % for sensitivity and 94 and 79 % for specificity, with extremely low kappa values (29 and 50, for laboratory one and two, respectively). Finally, when using spoligotyping, results were also poor: sensitivity went from 47 to 51 % and specificity

Cuadro 1. Sensibilidad y especificidad relativa y valores de kappa para las diferentes pruebas de diagnóstico rápido de TB en tejido fresco en relación a las tres "pruebas de oro" (%)

Table 1. Relative sensitivity, specificity and kappa values for the different bovine-TB quick diagnosis tests in fresh tissue in relation to three different "gold standards" (%)

Test		Gold standard					
		Presence of Lesion		Isolation		Histopathology	
		Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2
MPB70	Sensitivity	85	91	86	90	87	89
	Specificity	86	63	77	60	84	57
	Kappa	72	54	62	48	71	44
IS6110	Sensitivity	35	70	38	75	36	71
	Specificity	94	79	93	79	94	76
	Kappa	29	50	33	56	30	47
Spoligotyping	Sensitivity	47	51	40	51	47	54
	Specificity	89	80	80	76	87	77
	Kappa	36	31	21	28	34	32

las pruebas. Todos los análisis estadísticos se realizaron en SPSS versión 16.

Los resultados muestran que la proporción de muestras positivas a histopatología de aquéllas con lesión macroscópica fue de 91 y 93 %, para los laboratorios 1 y 2, respectivamente, mientras que la proporción de muestras negativas del grupo de tejido sin lesión fue de 98 % para ambos laboratorios (Cuadro 1). De manera sorpresiva una de las muestras del grupo de “libre de lesiones” resultó positiva al cultivo.

La sensibilidad y la especificidad relativas de las tres pruebas diagnósticas en estudio se estimaron usando la presencia/ausencia de lesiones en tejido y los resultados del cultivo y el análisis histopatológico como “pruebas de oro”. Cuando se usó la presencia/ausencia de lesiones, la sensibilidad de la PCR MPB70 anidada fue de 85 vs 91 % para los laboratorios uno y dos, respectivamente. Sin embargo, la especificidad fue diferente: 86 vs 63 %, con valores de kappa también diferentes: 72 vs 54 % para los laboratorios 1 y 2, respectivamente. En el caso de la PCR IS6110, los resultados fueron muy pobres para los dos laboratorios: 35 y 70 % para sensibilidad y 9 y 97 % para especificidad, con valores extremadamente bajos de kappa (29 y 50 (%), para los laboratorios 1 y 2, respectivamente). Finalmente, cuando se usó *spoligotyping*, los resultados también fueron pobres:

from 89 to 80 %, with a kappa value from 36 to 31 % (Table 1). Positive predictive value was good for all tests (73 to 86 %).

When using isolation of *Mycobacterium* and histopathology results as “gold standards,” results were quite similar to those observed with TB-lesion status: sensitivity for PCR_{MPB70} was 86 and 90 % for Lab 1 and 2, respectively. When histopathology was used, sensitivity was 87 to 89 %, respectively. In the case of specificity, it was 77 % for Lab 1 and 60 % for Lab 2. Values for sensitivity and specificity were always low when using IS6110 and spoligotyping PCR's (Table 1).

Performance of the traditional diagnostic tests compared to each other is presented in Table 2. Presence of lesion, histopathology and culture show excellent concordance in the diagnosis (kappa = 82 to 100 %).

It is known that real sensitivity and specificity of a screening test for the diagnosis of tuberculosis in cattle can only be estimated in populations where all epidemiological situations are possible: infected, exposed and non-infected. Further than that, when the test under evaluation is *in vivo*, animals have to be killed to obtain a definitive diagnosis: gross lesions by carcass inspection, TB-compatible lesions by histopathology and isolation of the

Cuadro 2. Relación entre las diferentes “pruebas de oro” usadas en la evaluación de tres pruebas de diagnóstico rápido de la tuberculosis bovina (MPB70, IS6110 PCR anidada y spoligotyping) (%)

Table 2. Relationship between the different “gold standard” tests used in evaluating three quick diagnosis tests (MPB70, IS6110 nested PCR and spoligotyping) for bovine tuberculosis (%)

Tests		Tests			
		Presence of lesion		Isolation	
		Lab 1	Lab 2	Lab 1	Lab 2
Isolation	Sensitivity	84	93		
	Specificity	98	98		
	Kappa	82	91		
Histopathology	Sensitivity	96	90	95	97
	Specificity	100	100	87	94
	Kappa	100	92	81	91

la sensibilidad fue de 47 a 51 % y la especificidad de 89 a 80 %, con valores de kappa de 36 y 31 % (Cuadro 1). No obstante, el valor predictivo positivo fue bueno para todas las pruebas (73 a 86 %).

Cuando se utilizó el resultado del cultivo del *Mycobacterium* y el resultado de la histopatología como “pruebas de oro,” los resultados fueron muy similares a los observados cuando se utilizó la presencia/ausencia de lesión: la sensibilidad para PCR_{MPB70} fue de 86 y 90 %, para laboratorio uno y dos, respectivamente. Cuando se usó histopatología, la sensibilidad fue de 87 y 89 %, respectivamente. En el caso de la especificidad, esta fue de 77 % para el Lab 1 y de 60 % para el Lab 2. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron muy bajos para las PCRs que utilizaron la secuencia IS6110 y *spoligotyping* (Cuadro 1).

El comportamiento de los métodos tradicionales de diagnóstico se muestra en el Cuadro 2. La presencia de lesión, histopatología y el cultivo mostraron excelente concordancia (kappa = 82 a 100 %).

Se conoce que la sensibilidad y la especificidad reales de las pruebas de tamizado para el diagnóstico de tuberculosis en el ganado, sólo pueden ser estimadas en poblaciones donde todas las situaciones epidemiológicas son posibles: infectados, expuestos y no infectados. Más que eso, cuando la prueba en evaluación es *in vivo*, los animales deben ser sacrificados para tener un diagnóstico definitivo: presencia de lesiones por inspección de la canal, presencia de lesiones compatibles con tuberculosis por histopatología y el aislamiento del *Mycobacterium* por cultivo. Sin embargo, cuando la prueba en evaluación es una prueba *post-mortem*, el uso de muestras de “segunda mano” es una buena alternativa, en especial si la prevalencia de la enfermedad en la población es conocida. En nuestro estudio se conocía de antemano que las muestras con presencia de lesiones macroscópicas venían de ganado productor de leche en hatos con una prevalencia de TB del 25 %, mientras que las muestras libres de lesiones venían de ganado de carne en un área libre de tuberculosis.

En este estudio se ha demostrado que la prueba PCR_{MPB70} anidada en tejido fresco tiene una

Mycobacterium by culture. However, when the test under evaluation is a *post-mortem* test, the use of “second hand” samples seem like a reasonable good alternative, especially if the prevalence of the disease in the population is known. In our study, we knew that samples with TB-gross lesions came from a dairy herd with high prevalence of BTB (25 %), while TB-lesion free samples came from beef cattle in a TB-free area.

It has been shown here that nested MPB70-PCR in fresh tissue has reasonably good sensitivity and specificity; therefore, they have the potential to be used as a complementary test for a quick diagnosis of tuberculosis in cattle. This fact is critical in at least two situations: when a producer is waiting for the results in order to move retained suspicious carcasses from the slaughterhouse or when both, producer and official veterinarian need to decide whether or not to quarantine or to do additional testing in a suspicious herd.

Sensitivity and specificity with the MPB70 antigen in our study is lower than that reported by Cousins⁽¹³⁾; however, in that study the authors knew in advanced the real status of the samples based on conventional methods. Therefore, the nested MPB70-PCR is an additional quick diagnostic test that can be used in parallel or in series, with histopathology for example, to increase precision in the diagnosis in a short period of time.

Sensitivity and specificity of IS6110-PCR was low. Differences might have been due to the size of the initial PCR fragment amplified for the nested PCR. For MPB70, the PCR product is a 372 bp, while that for IS6110 is 583 bp. Although both of these products are very large for diagnostic PCR's, the IS6110 product is about 200 bp larger –For nested PCR's, the initial amplification of products generally occurs prior to exponential expansion. Thus, if there is a huge dilution effect due to a large quantity of background host DNA, it is possible that the initial cycles of the PCR reaction are very inefficient, leading to false negative results. In this case, further laboratory work is needed to improve accuracy.

It has been mentioned that *spoligotyping* has the potential to do both, diagnostics and typing of *M.*

razonablemente buena sensibilidad y especificidad; por lo tanto, tiene el potencial para ser usada como una prueba complementaria rápida para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. La rapidez en el diagnóstico es crítica en al menos dos situaciones: cuando el productor está esperando los resultados para mover canales retenidas en rastro o cuando, ambos, el productor y el Veterinario oficial necesitan decidir sobre la aplicación de una cuarentena definitiva o la liberación de una cuarentena precautoria, o bien para aplicar pruebas adicionales al hato sospechoso; casos todos, en que la PCR_{MPB70} es una buena alternativa.

La sensibilidad y la especificidad encontradas con el antígeno MPB70 en este estudio son menores a las reportadas por Cousins *et al*⁽¹³⁾; sin embargo, es ese estudio los autores sabían de antemano el estatus real de las muestras con base en los métodos tradicionales de diagnóstico. Por lo tanto, la PCR_{MPB70} anidada es una prueba adicional de diagnóstico que puede ser utilizada en paralelo o en serie, con histopatología, por ejemplo, para incrementar la precisión en el diagnóstico de la TB en un periodo corto de tiempo.

La sensibilidad y la especificidad de la prueba de PCR que utiliza la secuencia IS6110 como blanco fueron bajas. Esto pudo ser debido al tamaño del fragmento de la PCR inicial amplificado por la PCR anidada. Para MPB70, el producto de la PCR fue de 372 pb, mientras que para la IS6110 fue de 583 pb. Aunque ambos productos son muy grandes para diagnóstico por PCR, el producto de la IS6110 es mayor por aproximadamente 200 pb; para la PCR anidada, la amplificación inicial de los productos generalmente ocurren previo a la expansión exponencial. De este modo, si hay un efecto grande de dilución debido a la gran cantidad de ADN del animal en el ambiente, es posible que los ciclos iniciales de la reacción de la PCR sean muy ineficientes, llevando a resultados falsos negativos. En este caso, es necesario realizar trabajo de laboratorio adicional para incrementar la eficacia del método.

Se ha mencionado que *spoligotyping* tiene el potencial, tanto de hacer el diagnóstico como la

bovis in fresh tissue. In our study, it failed in both, it showed especially poor sensitivity and the molecular patterns were not always the same when fresh tissue and culture was used in the PCR, it seems that in fresh tissue host DNA interferes with the reaction. Also, it might be due to the many PCR reactions required to amplify efficiently. False-positive and false-negative results, particularly in specimens containing low numbers of bacilli, have reduced the reliability of this test. Variability in results has been attributed to decontamination methods, DNA extraction procedures, techniques for the elimination of polymerase enzyme inhibitors, internal and external controls and procedures for the prevention of cross-contamination. As a matter of fact, some of the spoligotypes did not show *M. bovis* pattern, indicating that a high level of non-specific reactions did occur. Furthermore, the spoligotyping results obtained from the direct tissues did not necessarily match those obtained from the isolated culture (data not shown), indicating host DNA involved, which makes the technique inappropriate for fresh tissue. Improvement in the reliability of nested IS6110-PCR and spoligotyping as practical tests for the detection of *M. tuberculosis* complex in clinical specimens will require the development of standardized and more robust procedures.

Some PCR methods have previously been suggested for the identification of *M. bovis* in Veterinary and human diagnosis⁽²³⁾; however, those methods require the culture of tissue, which takes between 4 and 8 wk to accomplish. Our concordance results for the nested MPB70 PCR and histopathology are similar to those previously reported⁽¹⁴⁾ with kappa values from 0.44 to 0.71. However, in our study concordance between MPB70 and isolation of *Mycobacterium* was a little better; kappa values 0.48 to 0.72 vs 0.52. Considering presence/absence of lesions as a confirmation diagnosis, our nested PCR showed lower sensitivity (85 to 91 % vs 100 %) but better specificity (63 to 86 % vs 77 %).

The conclusion of this study is that nested MPB70-PCR has the potential to be used as a complementary test for the quick diagnosis of tuberculosis in cattle using macerated fresh tissue just before culturing.

tipificación de *M. bovis* en tejido fresco al mismo tiempo. En este estudio, mostró baja sensibilidad y los patrones moleculares no fueron siempre los mismos cuando se usó tejido fresco o cultivo como fuente de ADN para la PCR; parece ser que en tejido fresco el ADN del huésped interfiere con la reacción. Esto puede también deberse a las varias reacciones de PCR requeridas para amplificar el ADN en forma eficiente. Los resultados falsos positivos y falsos negativos, particularmente en especímenes con bajo número de bacilos, reduce la confiabilidad en esta prueba. La variabilidad en los resultados ha sido atribuida a los métodos de descontaminación, el procedimiento de extracción de ADN, los métodos de eliminación de inhibidores de la polimerasa, los controles internos y externos y los procedimientos de prevención de contaminación cruzada. De hecho, algunos de los espoligotipos no mostraron patrón de *M. bovis*, indicando que se presentó un alto nivel de reacciones no específicas. Más que eso, los resultados del *spoligotyping* obtenidos directamente de tejido fresco no necesariamente fueron similares a aquellos obtenidos de ADN a partir de cultivo (datos no mostrados), indicando la presencia de ADN del huésped, lo que hace a esta técnica poco apropiada en tejido fresco. Esto indica que es necesario hacer mejoras en los procedimientos para incrementar la confiabilidad de la PCR-IS6110 y de *spoligotyping* como pruebas prácticas para la detección de bacilos del complejo *M. tuberculosis*.

Algunos métodos de PCR han sido previamente mencionados como útiles en la identificación de *M. bovis* para el diagnóstico de TB en animales y humanos (23); sin embargo, esos métodos requieren el cultivo de tejido, el cual toma entre 4 y 8 semanas. Nuestros resultados de concordancia para la PCR_{MPB70} e histopatología son similares a aquellos previamente reportados⁽¹⁴⁾ con valores de kappa de 0.44 a 0.71. Sin embargo, en nuestro estudio, la concordancia entre la PCR_{MPB70} y el aislado de cultivo fue un poco mejor; con valores de kappa de 0.48 a 0.72 vs 52. Considerando la presencia/ausencia de lesiones como método de confirmación del diagnóstico, nuestras PCR anidadas mostraron sensibilidades menores (85 a 91 % vs 100 %) pero mejores especificidades (63 a 86 % vs 77 %).

This test, in combination with histopathology can be used in series or in parallel to improve the precision of the diagnosis in a short period of time. Nested IS6110-PCR and spoligotyping did not provide a good alternative in this study; however, improvements in the quality of the DNA from the sample and more stringent conditions of amplification could increase both, sensitivity and specificity.

End of english version

La conclusión de este estudio es que la prueba PCR_{MPB70} anidada tiene el potencial para ser usada como prueba complementaria para el diagnóstico rápido de tuberculosis en el ganado usando macerado de tejido fresco. Esta prueba, en combinación con histopatología puede ser usada en serie o en paralelo para mejorar la precisión del diagnóstico en un periodo de tiempo corto. La prueba anidada de PCR-IS6110 y spoligotyping no proporcionaron una buena alternativa de diagnóstico rápido en este estudio; sin embargo, mejoras en el ADN de la muestra y condiciones más estrictas de amplificación podrían incrementar ambas, la sensibilidad y la especificidad.

LITERATURA CITADA

1. Moda G, Daborn CJ, Grange JM, Cosivi O. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease* 1996;(77):103-108.
2. Daborn CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for the control of animal's tuberculosis. *British Vet J* 1993;(149):05-417.
3. Krebs JR, Andersen R, Clutton-Brock T, Morrison I, Young D, Donnelly C. *Bovine tuberculosis in cattle and badgers*. London: MAFF publications; 1997.
4. Milian SF, Harris B, Arriaga DC, Romero TC, Stuber T, Alvarez OG, *et al.* Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: Usefulness in international trade. *Prev Vet Med* 2008;(87):261-271.
5. Francis J, Seiler RJ, Wilkie IW, O'Boyle D, Lumsden MJ, Frost AJ. The sensitivity and specificity of various tuberculin tests using bovine PPD and other tuberculin. *Vet Rec* 1978;(103):420-425.
6. Costello E, Egan JW, Quigley FC, O'Reilly PF. Performance of the single intradermal comparative tuberculin test in identifying

PRUEBAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA

- cattle with tuberculous lesions in Irish herds. *Vet Rec* 1997;(141):222-224.
7. Whipple DL, Bolin CA, Miller JM. Distribution of lesions in cattle infected with *Mycobacterium bovis*. *J Vet Diagn Invest* 1996;(8):351-354.
8. Corner LA. Postmortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 1994;(40):53-63.
9. Noredhoek GT, van Embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996;(34):2522-2525.
10. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;(155):335-351.
11. Oste C. Polymerase chain reaction. *BioTechniques* 1988;(6):162-167.
12. Wood PR, Ripper J, Radford AJ, Bundesen PG, Rylatt DB, Cottis LE, John M, Plackett P. Production and characterization of monoclonal antibodies to *Mycobacterium bovis*. *J Gen Microbiol* 1988;(134):2599-2604.
13. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR, Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1992;(30):255-258.
14. Estrada-Chávez C, Díaz OC, Arriaga DC, Villegas-Sepúlveda N, Pérez GR, González SD. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Vet Méx* 2004;(35):225-236.
15. Miller J, Jenny A, Rhyan J, Saari D, Suarez D. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *J Vet Diagn Invest* 1997;(9):244-249.
16. Aranaz A, Liebana E, Mateos A. Spoligotyping of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996;(34):2734-2740.
17. Kamerbeek J, Schouls L, Folk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;(35):907-914.
18. Roring S, Hughes MS, Skuce RA, Neill SD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Vet Microbiol* 2000;(74):227-236.
19. Payeur J, Jarganin J, Marquart J, Schaper IY, Martin B. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. National Services Laboratories Iowa, USA: United States Department of Agriculture. 1993:1-48.
20. Wards BJ, Collins DM, de Lisle GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995;(43):227-240.
21. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR. Use of ADN amplification for the rapid identification of *Mycobacterium bovis*. *Vet Microbiol* 1991;(27):187-195.
22. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel R, Brent RE, Kingston DD, Mooere JG, Seidman JG, Smith JA editors. *Current protocols in molecular biology*. New York, USA: Greene Publishing and Wiley-Interscience; 1998.
23. Cobos-Marín L, Montes-Vargas J, Rivera-Gutiérrez S, Licea-Navarro JA, Gonzalez-y-Merchand JA, Estrada-García I. A novel multiplex-PCR for the rapid identification of *Mycobacterium bovis* in clinical isolates of both veterinary and human origin. *Epidemiol Infect* 2003;(130):485-490.