

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

AISLAMIENTO DE *Mycobacterium bovis* DE QUESOS NO
PASTEURIZADOS EN LA REGIÓN DE TIJUANA, TECATE Y
ROSARITO, B.C.

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

CHRISTIAN GIOVANI PACHECO NEGRETE

Director de Tesis
MSP. Luis Alberto Alcántara Jurado

Co-Director
Dr. Rafael Laniado Laborín

Tijuana, Baja California; noviembre de 2016.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el favor que me a dado.

A mis padres, hermanos, familia y amigos por su apoyo, buenos deseos y mostrar interes en las actividades que emprendo para retarme y mejorar cada día.

A mi asesor de Tesis, MSP. Luis Alberto Alcantara Jurado, por su esfuerzo, paciencia y dedicación.

A mi comité de tesis por sus observaciones y consejos que fueron de guía a lo largo de mi formación como investigador.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California por mi formación académica.

A CONACYT por el financiamiento para la realización de la investigación “AISLAMIENTO DE *Mycobacterium bovis* DE QUESOS NO PASTEURIZADOS EN LA REGIÓN DE TIJUANA, TECATE Y ROSARITO, B.C.”

A la Clínica y Laboratorio de Tuberculosis del Hospital General Tijuana encabezado por el Dr. Rafael Laniado Laborín por abrir las puertas a las instalaciones y poder llevar a cabo la investigación.

A la Dra. Raquel Muñiz Salazar por su colaboración en esta investigación para la identificación de las muestras de *M. bovis* en el Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de la UABC Ensenada B.C.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 189

Tijuana, B. C., a 17 de octubre de 2016

C. Christian Giovanni Pacheco Negrete
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud
Presente

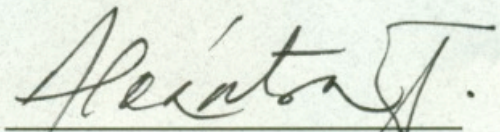
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por los C. MSP. Luis Alberto Alcántara Jurado y Dr. Rafael Laniado Laborin

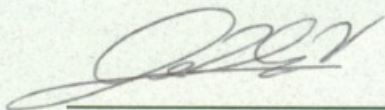
Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente, referido al
tema: "AISLAMIENTO DE *Mycobacterium bovis* DE QUESOS NO PASTEURIZADOS EN LA REGIÓN DE TIJUANA, TECATE Y ROSARITO, B.C."

el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- RESUMEN
- II.- ANTECEDENTES
- III.- JUSTIFICACION
- IV.- OBJETIVO GENERAL
- V.- PARTE EXPERIMENTAL
- VI.- RESULTADOS
- VII.- DISCUSION
- VIII.- CONCLUSIONES



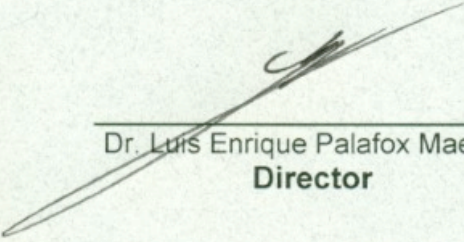
MSP. Luis Alberto Alcántara Jurado
Director de Tesis



Dr. José Luis González Vázquez
Secretario



Dr. Rafael Laniado Laborin
Co-Director de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA

RESUMEN

Antecedentes: *Mycobacterium bovis* produce tuberculosis zoonótica que afecta principalmente al ganado bovino, pero existen casos de infección en el hombre. La infección con *M. bovis* se asocia por consumir leche o queso fresco no pasteurizado de ganado infectado, y de persona a persona por vía aérea. El logro del aislamiento reside en el uso del medio de cultivo adecuado y del tratamiento preanalítico a la muestra sólida.

Objetivo: Aislar *Mycobacterium bovis* de quesos no pasteurizados mediante el cultivo en medio sólido Stonebrink para asociar la fuente de infección a los casos de *M. bovis* reportados en pacientes que acuden en la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana, B.C.

Métodos: Estudio transversal realizado en la ciudad de Tijuana, B.C. Se utilizó un muestreo por conveniencia en expendios no controlados distribuidos por delegación y todos los pequeños establecimientos localizados en la carretera libre Tijuana-Rosarito y Tijuana-Tecate. Se obtuvieron muestras de queso fresco y de tipo panela, para la descontaminación de las muestras se utilizó NaOH, un buffer de fosfatos y se adicionó al final del tratamiento eritromicina. Para la identificación de *Mycobacterium bovis*, se seleccionaron las cepas que hayan desarrollado colonias en el medio Stonebrink y con tinción Ziehl-Neelsen positiva, se identificaron por PCR-multiplex.

Resultados: De 81 muestras de queso, se obtuvieron tres aislamientos de *M. bovis* y dos aislamientos de *Mycobacterium spp.*, se identificaron mediante la técnica de PCR-multiplex.

Conclusiones: Los productos lácteos no pasteurizados son una fuente de contaminación para infecciones de tuberculosis por *M. bovis* y constituyen un riesgo de salud al ser consumidos sin una descontaminación previa sistematizada. Lo cual incrementa la posibilidad de que los pacientes que acudieron a la clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana, B.C., consumieron productos lácteos no pasteurizados contaminados de la región.

Las muestras de queso tienen una extensa microflora que afectan el crecimiento de micobacterias, por lo que se debe seleccionar el método preanalítico de descontaminación adecuada de la muestra que garantice el aislamiento de *M. bovis*.

Palabras clave: *Mycobacterium bovis*, productos lácteos no pasteurizados, queso

ABSTRACT

Background: *Mycobacterium bovis* causes zoonotic tuberculosis mainly affecting cattle, but there are cases of infection in humans. Consuming milk or fresh cheese unpasteurized by infected cattle and from person to person by air associates the infection with *M. bovis*. The achievement of isolation lies in the use of the means of appropriate cultivation and pre-tests the solid simple treatment.

Objective: Isolate *Mycobacterium bovis* of unpasteurized cheese by cultivating solid Stonebrink medium to associate with the source of infection cases of *M. bovis* reported in patients who come into the clinic for Tuberculosis of the Hospital General de Tijuana, B.C.

Methods: Cross-sectional study carried out in the city of Tijuana, B.C. We used a sampling by convenience in distributed non-controlled outlets by delegation and all small settlements located on the free road Tijuana-Rosarito and Tijuana-Tecate. We obtained fresh and panela type cheese samples, NaOH and phosphate buffer were used for the decontamination of the samples and erythromycin is added at the end of the treatment. The strains that have developed colonies in the Middle Stonebrink and with stain Ziehl-Neelsen positive were selected, for the identification of *Mycobacterium bovis* they were identified by PCR-multiplex.

Results: Three isolates of *M. bovis* and two isolates of *Mycobacterium spp.* were obtained from 81 samples of cheese; they were identified by PCR-multiplex technique.

Conclusions: Unpasteurized dairy products are a source of pollution for tuberculosis by *M. bovis* infections and they constitute a health risk to be consumed without a systematized previous decontamination. Which increases the possibility that patients who came to the Tuberculosis clinic at the Tijuana General Hospital of B. C., were consumed contaminated unpasteurized dairy products in the region.

Samples of cheese have an extensive microflora that affect the growth of Mycobacteria, so is should select the pre-test method of proper decontamination of the sample that ensures the isolation of *M. bovis*.

Key words: *Mycobacterium bovis*, unpasteurized dairy products, cheese.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ANTECEDENTES	1
Historia	1
Epidemiología.....	6
Transmisión	7
Diagnóstico.....	7
Prevención	12
JUSTIFICACIÓN	¡Error! Marcador no definido.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
PARTE EXPERIMENTAL	24
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN	35
LIMITACIONES.....	37
FORTALEZAS	38
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Condiciones para el tratamiento preanalítico de las muestras de queso fresco y/o tipo panela (Método Modificado de Petroff con Eritromicina)	26
2	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación San Antonio de los Buenos.	27
3	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación Playas de Tijuana.	27
4	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela carretera Tijuana-Rosarito.	28
5	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela carretera Tijuana-Tecate.	29
6	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación La Presa Rural.	29
7	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación Otay Centenario.	30
8	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación Sánchez Taboada.	30
9	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación La mesa.	31
10	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación Cerro colorado.	31
11	Aislamiento de <i>M. bovis</i> en queso fresco y panela de la delegación La presa.	32
12	Aislamiento de micobacterias por sitio de muestreo y tipo de queso en la ciudad de Tijuana, B.C. y la zona metropolitana Tijuana-Tecate-Rosarito.	33
13	Relación de micobacterias aisladas por tipo de queso.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	PCR-Multiplex para la identificación de <i>M. bovis</i> .	34

ANTECEDENTES

Historia

Se tienen pruebas de que la tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha afectado al ser humano desde hace 3 000 años, en Egipto se han encontrado momias con TB extrapulmonar con la “enfermedad de Pott”, donde la columna vertebral está afectada por este microorganismo; y una momia peruana fechada en 700 años D.C., en ambas mediante el análisis molecular del DNA del microorganismo se identificó de *M. tuberculosis* como el agente causal (Carlos Martínez et al., 2008; Ducati et al., 2006).

En la época de Hipócrates, a la TB se le conocía como “tisis” del griego Φθίσις (phthisis) que se refiere a consumido. En la edad media en Europa, se le describe como una manifestación de TB extrapulmonar que afecta a los ganglios linfáticos del cuello en niños, por consumir leche de vacas infectadas sin pasteurizar. En el siglo XVII, fue conocida como la “Peste Blanca” y hasta finales del siglo XIX, se convirtió en la principal causa de muerte. La TB ya había llamado la atención por ser una enfermedad que la padecían muchas personas, podía ser mortal y no se tenía el suficiente conocimiento como para evitar su propagación y encontrar una cura. En este lapso, varios investigadores destacaron por sus aportaciones con el fin de detener esta enfermedad y salvar las vidas que ya estaban infectadas. En 1680 el francés Franciscus Sylvius, analizó los nódulos pulmonares con TB que los llamó “pequeños nódulos”, y a las úlceras pulmonares como cavidades. El creía que se trataba de tumores o glándulas anormales. En 1722 Benjamín Marten, propuso que la TB puede ser transmitida por el aliento de una persona enferma de TB (Doetsch et al., 1978; Ducati et al., 2006).

En 1819 el doctor francés René Laennec, identifica por primera vez las manifestaciones clínicas de la TB. En 1865 el cirujano militar Jean Antoine Villemin, demuestra que la TB es una enfermedad contagiosa (Ducati et al., 2006).

A finales del siglo XVII, en 1882 Robert Koch, aísla y cultiva a *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) a partir de tubérculos e identifica al microorganismo como agente etiológico, que se bautizó como “bacilo de Koch” (López et al., 2006; Ducati et al., 2006). También empieza a desarrollar técnicas para teñir al bacilo que posteriormente fueron mejoradas por el doctor y bacteriólogo alemán Paul Ehrlich, cuyo método sentó las bases para el desarrollo de la tinción de Ziehl-Neelsen. En 1884 Edward Livingston Trudeau, establece el primer sanatorio en EE.UU. por la falta de investigaciones para encontrar un tratamiento efectivo, se limitó a recomendar solo descanso, aire fresco y dieta saludable. En 1896 el bacteriólogo Theobald Smith, demostró que la TB bovina no fue causada por *M. tuberculosis* si no por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*). En 1902 Ravenel demuestra que *M. bovis* estaba presente en un niño con tuberculosis meníngea (Davies et al., 2006). En 1908 Albert Calmette y Camille Guérin, aislaron a *M. bovis*, se creyó que no era virulento para varios animales, sin embargo sí desencadenaba protección inmunológica contra *M. tuberculosis* (Ducati et al., 2006).

Hoy en día hay investigaciones que demuestran que el ganado bovino es el hospedero principal de *M. bovis*, pero pueden infectarse la mayoría de los mamíferos domésticos y silvestres (Spickler, 2009; Good & Duignan, 2011; Malama et al., 2014).

En 1921 comenzó a ser empleada la vacuna BCG (Bacilo de Calmette y Guérin) en humanos en diferentes países brindando una protección del 50% para la TB pulmonar

(López et al., 2006). Hoy en día se sigue empleando como medida de prevención, que tiene eficacia profiláctica de 60-80% contra las formas graves de TB, como la meningitis en niños, pero no así al administrarse a personas ya infectadas (Roy et al., 2014; Ducati et al., 2006).

En 1930, se empleó la prueba de la tuberculina al ganado en el Reino Unido, con la pasteurización se empezó a controlar la infección por tuberculosis bovina. Entre 1931 y 1937 las muertes bajaron de 6.5 a 5.6% (Davies et al., 2006). Antes de 1940 la tuberculosis era una enfermedad incurable, hasta que llega en 1947 la estreptomina (Ducati et al., 2006; Iseman et al., 2002), y baja la tasa mundial de mortalidad, sin embargo, el uso de monoterapia se asoció rápidamente a resistencia a estreptomina. En 1952 se empezó a aplicar un tratamiento triple que incluía estreptomina, ácido para-amino salicílico e isoniazida y mejorando la tasa de curación y disminuyendo el desarrollo de resistencia. En 1970 se reconoce que isoniazida y rifampicina pueden reducir la duración del tratamiento de 18 a 9 meses y en 1980 se añade pirazinamida permitiendo reducir el tratamiento a 6 meses (Iseman et al., 2002).

A pesar de que ya se tenía tratamiento, la duración de la terapia era muy prolongada volviéndose costosa, aumentando el riesgo de que la micobacteria se volviera resistente por pacientes que abandonaban su tratamiento o no podían seguir pagándolo; y las cepas resistentes a estos medicamentos empiezan a surgir, sin embargo la carrera a su erradicación fue mas rápida que la aparición de casos reincidentes. Hasta 1980 reanuda su aparición la TB, con la pandemia del VIH/SIDA, prevaleciendo el numero de infecciones y de resistencias (SINAVE, 2012).

La tuberculosis está lejos todavía de su erradicación y la aparición de micobacterias atípicas surgen entre la población por tener un sistema inmune comprometido.

La tuberculosis es un problema de salud a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que, en el 2012, 8.6 millones de personas fueron afectadas por la tuberculosis y 1.3 millones murieron por esta causa (OMS, 2013). Para el 2013, se calcula que 9 millones contrajeron la enfermedad de los cuales 1.5 millones fallecieron por esta enfermedad (OMS, 2014). Y para el 2014 se estimó cerca de 9.6 millones de nuevos casos y 1.5 millones murieron por esta causa (OMS, 2015). La tuberculosis solo puede ser causada por las micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), siendo *M. tuberculosis* la más frecuente (Pérez et al., 2008).

Por otro lado *M. bovis* produce una tuberculosis zoonótica que afecta principalmente al ganado bovino, pero se ha demostrado la infección en el ser humano. Se sabe que personas con *M. bovis* se infectan por consumir leche o queso fresco no pasteurizado de ganado infectado, y de persona a persona por vía aérea (Pérez et al., 2008; LoBue et al., 2004).

M. bovis tiene una amplia gama de animales hospederos tanto domésticos como salvajes, lo que favorece su prevalencia en diferentes países. Existen investigaciones donde muestran que *M. bovis* se ha encontrado en regiones de Europa, Asia, África y América Latina (Malama et al., 2014; Müller et al., 2013; López et al., 2006; OIE, 2014). En países desarrollados se estima que el 1% del total de casos reportados por tuberculosis son afectados por *M. bovis*, se cree que existe una incidencia superior al 10% en la región de América Latina y el Caribe (Laniado et al., 2014).

La tuberculosis zoonótica por *M. bovis* se considera un problema a nivel mundial y es causante de grandes pérdidas económicas por el impacto a la salud humana y en ganadería. Para prevenir y reducir su prevalencia, se han tomado varias medidas, como la creación de organizaciones que se dedican a vigilar el ganado, por ejemplo: OIE, por sus siglas en inglés (Organización Mundial de la Sanidad Animal), SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) estos dos últimos en el caso de México, que vigilan de cerca a los productores ganaderos mexicanos. Estas organizaciones vigilan que se emplee la pasteurización a fin de eliminar al microorganismo, así como el buen estado de salud del animal para su consumo como lo señala la NOM-031-ZOO-1995 y la OIE en su portal en línea (NOM-031-ZOO, 1995). Se ha documentado la eliminación de *M. bovis* con pasteurización a 62°C por 30 minutos o a 71.7°C por 15 minutos (Harrington et al., 1965; OIE, 2014; NOM-035-SSA1-1993). Países desarrollados como Estados Unidos y el Reino Unido han bajado el índice de infecciones por implementar la pasteurización (Evans et al., 2007).

En México no se tienen muchos datos sobre la incidencia de *M. bovis*, por lo que es necesario implementar técnicas de diagnóstico en los centros de salud, salvo en estudios especializados donde se pueda analizar una determinada población que permita calcular la incidencia del lugar donde se realice el estudio, como en el caso de Querétaro, que el 1.96% del total de casos de tuberculosis son atribuidos a *M. bovis* (Pérez et al., 2008).

En Baja California se ha confirmado la aparición de *M. bovis* (Laniado et al., 2014), pero se desconoce el foco de infección. Tijuana es una ciudad fronteriza y es una de las ciudades más visitadas en todo el mundo, existe una gran migración del sur al norte del país, trayendo consigo sus costumbres que se han integrado a los hábitos cotidianos de la población, entre ellos, la ingesta de alimentos preparados de manera artesanal, como los productos derivados de la leche no pasteurizada y que pueden ser un foco de infección para la adquisición de tuberculosis por *M. bovis* (SINAVE, 2012).

Epidemiología

Se tiene registro de países que están libres de tuberculosis por *M. bovis* como: Australia, Islandia, Dinamarca, Suecia, Noruega, Finlandia, Australia, Suiza, Luxemburgo, Letonia, Eslovaquia, Lituania, Estonia, República Checa, Canadá, Singapur, Jamaica, Barbados e Israel. Los países que tienen programas para erradicarla son Japón, Nueva Zelanda, EE. UU., México y algunos países de América Central y del Sur (Spickler, 2009).

Entre los países con mas carga de casos activos en América Latina son:, Brasil, Perú y México (López et al., 2006). En el Reino Unido, en el 2008, tenían una incidencia anual de TB por *M. bovis* de 0.047 con base a 100 000 habitantes (Mandal et al., 2011); en Estados Unidos aproximadamente el 1.0% de la tuberculosis es causada por *M. bovis*; en Argentina en el 2006, de 0.22 a 1.02% (Kantor et al., 2010). En Malawi en el sureste de África, se tiene un 42.8%, Egipto con un 45%. En México, el estado de Baja California con un 4.5% del total de casos de TB (Laniado et al., 2014), y Querétaro con un 1.96% (Pérez et al., 2008). Según datos de SINAVE los estados

con mayor tasa de incidencia de TB son; Baja California, Tamaulipas y Guerrero (SINAVE, 2012), sin embargo, en la revisión bibliográfica no se encontró datos de la incidencia de TB por *M. bovis* de los demás estados.

Transmisión

El hospedero principal de *M. bovis* es el ganado bovino, pero muchos autores refieren que *M. bovis* tiene una gama amplia de hospederos y se ha diagnosticado en todo el mundo, incluye a animales tanto domésticos como salvajes (Good & Duignan et al., 2011; Fernandes et al., 2014).

Se han hecho estudios donde se muestra que la mayoría de las personas se infectan por consumir un producto infectado, como la leche o queso fresco no pasteurizado contaminado con *M. bovis* (Evans et al., 2007; Pérez et al., 2008, Rowe et al., 2008). Por eso es importante el trabajo que desempeñan las organizaciones sanitarias y la participación de los ganaderos, ya que con un organismo que se encargue de monitorear los lugares donde se dediquen al trato de bovinos o sus derivados, se facilita la detección del ganado o producto infectado para descartarlo para evitar que sea empleado para su consumo y así bajar la incidencia y propagación de la enfermedad.

Diagnóstico

Existen dos tipos de métodos, los fenotípicos y los genotípicos. La confirmación de un caso por tuberculosis es acompañada por la clínica y uno o varios métodos, que a continuación se mencionarán, según el profesional de salud lo indique. La baciloscopía es la herramienta mas barata y sencilla con la que se cuenta, sin

embargo, puede reportar falsos negativos debido a que necesita al menos 5000 bacilos/ml de expectoración, además de que no permite distinguir entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* aun cuando es positiva (Couto et al., 2007).

El cultivo microbiológico es también un método confirmatorio y la OMS recomienda el medio de cultivo Lowenstein-Jensen (LJ) para el aislamiento de *M. tuberculosis*, en la actualidad hay marcas comerciales que ofrecen cultivos líquidos con la ventaja de crecimiento mas rápido que en un medio sólido, pero siempre debe de respaldarse con un LJ (OMS, 2013, Parisaca et al., 2015). LJ es un medio a base de huevo que contiene glicerol y que puede servir para el aislamiento de algunas micobacterias, sin embargo no a todas les favorece ya que el glicerol actúa como inhibidor para el crecimiento de *M. bovis*, para el aislamiento de este microorganismo se recomienda utilizar un medio donde se sustituya el glicerol por piruvato de sodio como el medio Stonebrink (Grange et al., 1996).

La sensibilidad de medicamentos anti-TB es importante para detectar casos de TB multirresistente, este estudio se lleva a cabo cultivando a la micobacteria en un medio donde se encuentra el medicamento o medicamentos, si hay crecimiento se dice que es resistente y cuando no, sensible.

Por otro lado, las pruebas moleculares como lo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tiene una alta sensibilidad que puede confirmar un caso positivo a partir de 100 bacilos o menos por muestra y realiza el diagnóstico a partir de horas. A pesar de que se necesita un laboratorio y personal especializado, su gran sensibilidad y rapidez hace de esta técnica la mas adecuada, pero si no se tiene cuidado, por su

gran sensibilidad puede reportar falsos-positivos (Cuevas-Córdoba y Zenteno-Cuevas et al., 2009).

Para el aislamiento de *M. bovis* en quesos frescos no pasteurizados como fuente de contaminación de tuberculosis Harris et al. (2007), identificaron las micobacterias aisladas mediante el biotipado con pruebas bioquímicas estándar, posteriormente se confirmó mediante pruebas moleculares basadas en PCR, pruebas bioquímicas de niacina y nitrato, así como un kit para la identificación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados mostraron que siete fueron de *M. fortuitum*, una de *M. bovis*, una de *M. moriokaense* y una fue de *Mycobacterium* sp. (Similar a *M. moriokaense*). Seis muestras se contaminaron. Además, se determinó sensibilidad a antibióticos, donde todos fueron resistentes a Pirazinamida. Se genotipificó con la técnica de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica o en sus siglas en inglés RFLP para realizar rastreo epidemiológico, mostrando a Baja California, Sonora y Durango como los estados de donde provenían los microorganismos.

Fetene y colaboradores en el 2011 analizaron la morfología colonial para la identificación de micobacterias, así como patrones de crecimiento y pruebas bioquímicas con reducción de nitrato. Del total de muestras, en cuatro de ellas se aisló *M. tuberculosis* y en diez *M. bovis*. Tomaron como control a los que dieron la prueba de tuberculina negativo y como casos a los que dieron positivo. La prevalencia de tuberculosis fue significativamente mayor $p < .001$ en el ganado de los pacientes con tuberculosis que en el ganado de dueños sin tuberculosis. Y la infección por tuberculosis fue tres veces mayor en el ganado de los propietarios positivos (Fetene et al. 2011).

En otro estudio realizado por Srivastava y colaboradores utilizaron 50µl de muestra tratada para inocular los medios de cultivo Lowenstein Jensen con piruvato y sin piruvato, los tubos inoculados se incubaron a 37°C por 8 semanas. Para los cultivos positivos se le realizó tinción Zihel-Neelsen y pruebas bioquímicas con producción de niacina, reducción de nitratos, actividad de la catalasa a 68°C, hidrólisis de tween, arilsulfatasa e hidracida del ácido tiofenol-2-carboxílico (TCH). Se logró aislar en 40 muestras a *M. bovis* (19 en ganglios, nueve en sangre, seis en leche, dos en exudado faríngeo, tres en biopsia rectal y uno en muestra de excremento) y en 14 muestras a *M. tuberculosis* (cinco en ganglios, cuatro en muestras de sangre, otras cuatro en leche y una en exudado faríngeo). Se identificó a *M. tuberculosis* con actividad positiva para niacina, reducción de nitrato, TCH y actividad negativa para catalasa a 68°C y arilsulfatasa. A *M. bovis* una actividad negativa para niacina, reducción de nitrato, catalasa a 68°C, hidrólisis de tween, arilsulfatasa y TCH (Srivastava et al. 2006).

Un estudio encabezado por Kahla y colaboradores realizado en el 2011 a los aislamientos positivos les realizaron tinción Ziehl-Neelsen, analizaron la morfología colonial, la tasa de crecimiento e identificación molecular por PCR con Secuencias Repetidas en Tándem de Número Variable o en sus siglas en inglés VNTR y spolygotiping. Lograron el aislamiento de *M. bovis* en cinco cultivos, en una muestra aislaron *M. flavescens*, en cinco muestras aislaron Micobacterias no tuberculosas que no se logró identificar y 28 cultivos se les contaminaron (Kahla et al. 2011).

Zarden y colaboradores realizaron un estudio en el 2013 donde el sedimento fue inoculado en el medio de cultivo Lowenstein Jensen con piruvato al 0.5%. Solo en un

cultivo aislaron *M. bovis* y fue identificado por el Método de multiplex-PCR que emplea dos sets de primers simultáneamente: RvD1Rv2031c (500pb) específico para *M. bovis* y IS6110 (245pb) presentes en todas las especies del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. De 77 vacas analizadas 17 fueron positivas, en siete muestras no obtuvieron resultados. En cinco de las ocho muestras de leche de vacas con PPD negativos aislaron e identificaron a *M. bovis* (cuatro por PCR y uno por biotipado), (Zarden et al. 2013).

Franco y colaboradores en el 2013 realizaron un estudio donde los aislamientos sospechosos se les hacía un frotis para teñirlo con la tinción Ziehl-Neelsen. Se aislaron micobacterias en 24 muestras de las cuales se les hizo diagnóstico molecular con la técnica de PCR- Análisis de Patrones de Restricción Enzimática (PRA). Como resultado seis se confirmaron como *M. gordonae*, tres se identificaron como *M. haemophilum*, dos fueron *M. immunogenum*, dos *M. novocastrense*, uno se identificó como *M. bovis*, uno más como *M. duvalii*, uno fue identificado como *M. flavescens*, uno como *M. fortuitum*, en una muestra se aisló *M. intracellulare*, en otra muestra se identificó *M. lentiflavum*, una muestra contenía *M. mucogenicum*, un bacilo fue identificado como *M. parafortuitum*, se aisló una especie de *M. smegmatis*, uno más de *M. terrae* y uno se identificó como *M. vaccae*. (Franco et al. 2013).

En otro estudio Sgarioni y colaboradores en el 2014 tomaron 200 µl del sedimento y lo inocularon en los medios de cultivo Lowenstein Jensen y Stonebrink. Después incubaron los medios a 35°C en una atmosfera de CO₂ con una concentración del 5 al 10% y a 30°C en una atmosfera aerobia por tres meses en ambas condiciones ambientales de crecimiento. A las colonias sospechosas les realizaron tinción Ziehl-

Neelsen para observar los bacilos ácido alcohol resistente. Lograron aislar e identificar cinco cepas de *M. nonchromogenicum*, cuatro especímenes se identificaron como *M. peregrinum*, tres fueron *M. flavescens*, en tres muestras se identificó a *M. smegmatis*, una cepa aislada fue identificada como *M. kansasii*, una como *M. neoaurum*, una más como *M. scrofulaceum* y en una muestra se aisló e identificó a *M. chelonae*. Las micobacterias fueron identificadas considerando sus características morfológicas, análisis de ácidos micólicos. Y confirmadas por el método PCR-Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-PRA), (Sgarioni et al. 2014).

Prevención

Existen varios factores que influyen en gran medida para que una persona se infecte por tuberculosis y de los que debemos estar conscientes para disminuir y prevenir la enfermedad. Un riesgo es la TB zoonótica como el caso de el ganado bovino para *M. bovis*, el consumir alimento contaminado (como producto lácteo no pasteurizado en el caso de *M. bovis*), el cursar con enfermedades que afecten el funcionamiento óptimo del sistema inmune como el VIH/SIDA, diabetes mellitus, el alcoholismo, drogadicción, lugares en sub-desarrollo que no cuentan con atención médica, entre otros. Una medida para prevenir la tuberculosis es el diagnóstico oportuno de pacientes infectados para su rápida atención, el adecuado tratamiento, en caso de ser una TB multidrogo resistencia (MDR) y la vacunación que brinde una protección inmunológica.

Se realizó una revisión sistemática (Pacheco-Negrete et al., 2016), con el propósito de analizar estudios sobre el tratamiento preanalítico de la muestra en el proceso de aislamiento de *Mycobacterium bovis* en productos lácteos no pasteurizados, y se incluyeron estudios publicados de 2005 a 2015, se encontraron 7 artículos que cumplieron los criterios de inclusión tales como aislamiento de *Mycobacterium bovis* de leche y/o productos lácteos no pasteurizados como queso fresco y tipo panela, de esta revisión, Beth Harris et al. (2007), llevaron a cabo un estudio en el que se analizaron 203 muestras de queso fresco. Para el tratamiento pre analítico se tomaron 5 g de queso, se aplicó el método de Kubica con cisteína y NaOH para su descontaminación y se inoculó 0.5 ml de el sobrenadante en BACTEC 12B (se le adicionó 0.2 ml de BACTEC PANTA PLUS, 6.3 mg/ml de eritromicina) y en BBL MGIT 960 (se le adiciono 0.8ml de BBL MGIT PANTA y 7.0 mg/ml de eritromicina). Fetene et al. (2008), realizaron un estudio caso-control en Etiopía en un periodo de seis meses, se estudiaron 210 ganaderos y 1,220 vacas, se formaron dos grupos para determinar el grado de la infección por tuberculosis, uno fue el ganado de los pacientes con tuberculosis y el otro fueron los pacientes con tuberculosis; como criterio de inclusión para el ganado bovino se realizó la prueba cutánea de la tuberculina, con resultado positivo en 72 animales. Se tomaron 30 ml de muestra de leche, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su procesamiento. El tratamiento de descontaminacion fue el metodo original de Petroff, se analizó una parte del sedimento con tinción Ziehl-Neelsen para observarlo al microscopio y se inoculó en dos medios Lowenstein Jensen, uno con piruvato de sodio al 1% y el otro con glicerol. Srivastava et al. (2008), realizaron un estudio en el norte de la India para aislar *M.*

bovis y *M. tuberculosis* de ganado infectado, de un total de 768 muestras, 162 fueron de sangre de ganado, 160 de ganglios, 154 muestras de leche, 98 muestras de exudado faríngeo del ganado, 97 muestras de biopsia de recto y 97 muestras de excremento. La muestra se homogenizó, se resuspendió, centrifugó y se descontaminó de acuerdo al método estandarizado de Petroff. El tratamiento preanalítico de las muestras fue el siguiente, para la biopsia rectal se utilizaron 50 mg y se suspendieron en 1 ml de agua inyectable, para la muestra de excremento se tomaron 100 mg y se resuspendieron en 1 ml de solución salina, el aplicador para el exudado faríngeo se humedeció sumergiéndolo en 1 ml de solución salina estéril, para la muestra de leche se tomaron 2 ml, para los ganglios y la sangre heparinizada con EDTA se emplearon 0.5 ml de muestra. Kahla et al. (2011), realizaron el aislamiento y la caracterización molecular de *M. bovis* en muestras de leche de 102 vacas en Túnez al norte de África, se muestreo en 3 ocasiones dando un total de 306 muestras, de octubre de 2005 a enero de 2006. Se tomaron 10 ml de muestra de leche no pasteurizada y el tratamiento preanalítico fue utilizando el método original de Petroff. El sedimento se inoculó en el medio de cultivo Lowenstein Jensen y Coletsos. Se incubó a 37°C por ocho semanas. Zarden et al. (2012), realizaron una investigación en Brasil a 77 vacas consideradas libres de tuberculosis en los últimos cinco años, donde se les inyectó 0.1 ml de derivado proteico purificado o en sus siglas en inglés PPD (1 mg de proteína por ml de *M. bovis* cepa AN5) en el área cervical de cada vaca y 0.1 ml de PPD aviar (0.5 mg de proteína por ml de *M. avium*) a 20 cm de distancia cada una aproximadamente. Se analizaron las muestras de leche de ocho vacas con PPD negativo. Cada muestra se mezcló con Tween 80 al 0.1%, se tomaron

alícuotas de 5 ml de cada muestra y se descontaminó utilizando tres métodos diferentes: con NaOH al 4% (Método de Petroff), con H₂SO₄ al 12% y cloruro de cetilpiridinio al 1.5% de acuerdo a Medeiros (2012). Franco et al. (2013), analizaron la presencia de micobacterias en muestras de leche bovina almacenadas en tanques, se recolectaron 300 muestras de leche no pasteurizada, de las cuales 100 fueron de tanques individuales, 100 de tanques colectivos y 100 de puntos de venta informal en la misma región de Brasil. De cada muestra se tomó una alícuota de 8 ml. La muestra se concentró a 10,000 rotaciones por minuto por 20 min. Se descontaminó con el método modificado de Petroff. Sgarioni et al. (2014), evaluaron la presencia de *M. bovis* y micobacterias no tuberculosas (MNT) en leche pasteurizada y no pasteurizada en Paraná, Brasil. Se analizaron 52 muestras de leche, 20 muestras de leche pasteurizada (mediante un muestreo al azar) y 32 muestras de leche no pasteurizada (de establos) entre abril a mayo de 2011 en la región de Maringá, estado de Paraná, Brasil. Las muestras se procesaron el mismo día que se muestrearon. El tratamiento preanalítico de las muestras fue con el método de Corper y Uyei.

En general, se observa heterogeneidad en los métodos que cada autor emplea para la descontaminación de sus muestras, el método de Petroff es el más recurrente tal vez por ser económico.

JUSTIFICACIÓN

En el año 2014, se estima que 9.6 millones de personas desarrollaron tuberculosis y se atribuye 1.5 millones de muertes a esta enfermedad. En la región de África se estima una tasa de incidencia de 255 por 100,000 habitantes, en Asia sudoriental con 187, el Mediterráneo Oriental con 109, en el Pacífico Occidental con 87, en Europa 40 y en América de 29 por cada 100,000 habitantes (OMS, 2015).

La tuberculosis puede ser causada por diferentes tipos de micobacterias que infectan exclusivamente a humanos, las más comunes son *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium canetti* (López et al., 2006). Sin embargo, existen otras micobacterias que producen tuberculosis en animales llamadas también tuberculosis zoonóticas, a nivel mundial la mayoría son causadas por *M. bovis* y su principal reservorio es el ganado bovino. En el Reino Unido entre el 2005 y el 2008 se registraron 129 casos de tuberculosis por *M. bovis*, con una disminución anual de la incidencia de 0.065 a 0.047 casos por 100,000 habitantes (Mandal et al., 2011). En los Estados Unidos aproximadamente el 1% de la tuberculosis es originada por *M. bovis* (Kantor et al., 2010).

En México se ha incrementado el interés por la identificación de las micobacterias causantes de tuberculosis, y es difícil tener un dato global ya que no en todos los estados se le da la importancia suficiente, sumándole a esto el no contar con los recursos y herramientas para llevar a cabo la identificación, el no tener el personal capacitado o el simple hecho de ignorar que pueden existir más especies de micobacterias causando la enfermedad.

En Querétaro, México, se han confirmado casos de tuberculosis por *M. bovis* en humanos por el consumo de productos de ganado bovino infectado, se cree que es por la falta de participación de los establos lecheros y por comercializar la leche no pasteurizada (Pérez et al., 2008; Kantor et al., 2010).

En el estado de Baja California, México en la Clínica y Laboratorio de Tuberculosis en el Hospital General de Tijuana entre el 2011 y 2013, se tiene un registro de 2,699 muestras clínicas cultivadas, 600 fueron cultivos positivos y posteriormente se realizó la identificación molecular, 27 fueron confirmadas como *M. bovis* (Laniado et al., 2014).

Se sabe que personas con *M. bovis* se infectan principalmente por consumir leche o queso fresco no pasteurizado de ganado infectado (Pérez et al., 2008). Por lo anterior es posible el aislamiento de *M. bovis* de leche no pasteurizada proveniente de ganado infectado, la importancia de realizar este estudio es conocer si el queso que se produce en la región es un factor de riesgo para la infección por *M. bovis* y adquirir la enfermedad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La tuberculosis (TB) continúa siendo un importante problema de salud global. Hasta el 2014, de acuerdo a los reportes emitidos por la Organización Mundial de la Salud se estimaba que el número de casos ascendía a más de nueve mil y el número de muertes por esta causa estaba por arriba del millón. En el 2014, se estima que 9.6 millones de personas desarrollan la tuberculosis y 1.5 millones de muertes se atribuyen a esta enfermedad (OMS, 2015).

Las tres entidades federativas en México con mayor tasa fueron: Baja California, Tamaulipas y Guerrero (SINAVE, 2012).

Mycobacterium tuberculosis, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium canetti* son miembros del complejo *M. tuberculosis* que infectan exclusivamente a humanos. Sin embargo, existe otra micobacteria que tiene varios hospederos como *Mycobacterium bovis*, que incluye bovinos, perros, gatos, cerdos, conejos y humanos entre otros (López et al., 2006). La tuberculosis en el ganado es frecuente en casi todos los principales países ganaderos en desarrollo con poca vigilancia sanitaria (Müller et al., 2013), por lo que representa un riesgo de salud pública, así como también un serio problema económico (López et al., 2006).

En el estado de Baja California, se reportaron 27 casos de tuberculosis por *M. bovis* en población abierta de la ciudad de Tijuana, lo que representan nuevos casos de tuberculosis por un agente causal diferente a *M. tuberculosis*, esta investigación sugiere la identificación de la micobacteria mediante técnicas moleculares, lo que

permite establecer nuevas tendencias para la confirmación de *M. bovis* (Laniado et al., 2014).

Es difícil tener la incidencia real del tipo de micobacterias en Baja California ya que no es común su identificación, y solo con estudios especializados se logra tener una cifra aproximada. Se cree que la incidencia de *M. bovis* puede llegar a ser mayor que en otros países desarrollados, es importante encontrar el origen de la infección, por esta razón se hace necesario realizar un estudio que permita el aislamiento y la identificación de *Mycobacterium bovis* en quesos no pasteurizados, mediante el cultivo e identificación molecular por PCR, para asociar el agente causal con la enfermedad, teniendo como referencia que la aparición de casos de *M. bovis* reportados por la clínica de tuberculosis del Hospital General Tijuana, BC., son de origen desconocido.

HIPOTESIS

Mycobacterium bovis se encuentra como contaminante en quesos no pasteurizados en las muestras de la región de Tijuana, Tecate y Rosarito B.C., representando un riesgo de adquirir tuberculosis por consumir producto contaminado.

HIPOTESIS NULA

Mycobacterium bovis no se encuentra como contaminante en quesos no pasteurizados en las muestras de la región de Tijuana, Tecate y Rosarito B.C., por lo que no representa un riesgo de adquirir tuberculosis.

HIPOTESIS ALTERNATIVA

En las muestras de quesos no pasteurizados analizadas de la región de Tijuana, Tecate y Rosarito B.C., se encuentran otras especies de micobacterias.

OBJETIVO GENERAL

Aislar *Mycobacterium bovis* de quesos no pasteurizados mediante el cultivo en medio sólido Stonebrink para asociar la fuente de infección a los casos de *M. bovis* reportados en pacientes que acuden en la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana, B.C.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar quesos no pasteurizados para aislar e identificar *Mycobacterium bovis* en muestras de la región de Tijuana, Tecate y Rosarito B.C., mediante la inoculación en medio selectivo e identificación molecular por VNTR, para asociar la fuente de contaminación de los casos de *M. bovis* aislados en pacientes que acuden en la Clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana, B.C.

METODOLOGÍA

Es un estudio transversal realizado en la ciudad de Tijuana, B.C., se utilizó un muestreo por conveniencia en los expendios no controlados (conocidos como mercados soberruedas) distribuidos por delegación y todos los pequeños establecimientos localizados en la carretera libre Tijuana-Rosarito y Tijuana-Tecate. El objetivo de esta investigación es aislar *Mycobacterium bovis* de quesos no pasteurizados, mediante el análisis microbiológico de muestras obtenidas entre febrero a mayo de 2016.

MATERIALES Y EQUIPO

Toma de muestra. Se obtuvieron muestras de queso fresco y de tipo panela, cada muestra se colecta en bolsa de plástico individual estéril, se etiquetó con los datos pertinentes y se transportó en una hielera a temperatura de 7-9°C con hielo y/o gel para conservar las muestras durante el traslado del sitio de muestreo al laboratorio.

Tratamiento Pre-analítico. Para la descontaminación de las muestras se utilizó NaOH al 4%, un buffer de fosfatos y se adicionó al final del tratamiento eritromicina en 6.9 mg/ml (ver procedimiento), para el cultivo se utilizó medio Stonebrink.

Tratamiento analítico. Las muestras se manipularon en una campana de flujo laminar LABCONCO de bioseguridad tipo dos, se descontaminaron con el método de Petroff modificado, se les añadió eritromicina y se incubaron a 37°C en una incubadora marca Riossa. Las colonias con tinción Ziehl-Neelsen positivo se mandaron a su identificación molecular en el Laboratorio Biología Molecular de la UABC Campus Ensenada.

Variables. Como variables independientes se consideraron el pH, la concentración de Cloruro de Sodio (NaCl) y la temperatura. Y como variables dependientes se consideraron la concentración bacteriana. El muestreo estuvo sujeto a los criterios de

aceptación o rechazo, para la exclusión de muestras, no se consideraron productos lácteos pasteurizados, leche entera, baja en grasa, deslactosada, yogurth, bebidas fermentadas, etc. Se incluyen como muestras, queso fresco y queso tipo panela. Para la identificación de *Mycobacterium bovis*, se seleccionaron las cepas que hayan desarrollado colonias en el medio Stonebrink y con tinción Ziehl-Neelsen positiva.

La incubación de las muestras se llevó a cabo en una incubadora marca Riossa a 37°C durante ocho semanas.

Para la centrifugación se utilizó una centrifuga marca Eppendorf 5810R con tubos cónicos boca ancha y tapa con rosca, este proceso se realizó en una campana LABCONCO de flujo laminar tipo 2.

Análisis de resultados. Se agruparon los datos por la procedencia de la muestra, tipo de muestra y especie. Se describe la frecuencia de aislamiento de micobacterias en porcentajes.

PARTE EXPERIMENTAL

PROCEDIMIENTOS

Toma de muestras en Tijuana

Se realizó la toma de muestras de quesos en las nueve delegaciones de la ciudad: Playas de Tijuana, San Antonio de los Buenos, Centro, Sánchez Taboada, La mesa, Otay-Centenario, Cerro Colorado, La Presa y La Presa rural. Muestreando un mercado soberruedas por delegación.

Toma de muestras en Tijuana-Rosarito

Se recolectaron muestras de queso en todos los establecimientos pequeños que se encontraron en la carretera libre Tijuana-Rosarito.

Toma de muestras en Tijuana-Tecate

Se recolectaron muestras de queso en todos los establecimientos pequeños que se encontraron en la carretera libre Tijuana-Tecate.

Para su transporte las muestras de queso se colocaron en una hielera con hielo y/o gel congelado, y se conservaron en refrigeración para procesarse al día siguiente.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Tratamiento de Muestra

Se tomó un gramo de queso en bolsa con cierre hermético, se le añade nueve mililitros de NaOH al 4 %. Manualmente se homogeniza la muestra y se deja reposar 10 min. Después se pasa la muestra a un tubo cónico de boca ancha con taparrosca para centrifugarla por 15 min a 3,000 g a 25-30 °C. Una vez centrifugado, se decanta y al sedimento se le añade 15 ml de solución buffer de fosfatos pH 6.8 y agitar en

vortex hasta homogenizar. Volver a centrifugar por 15 min con las mismas condiciones anteriores, decantar el sobrenadante y al sedimento se le añade un mililitro de eritromicina 6.9 mg/ml. Homogenizar en vortex y por último se neutraliza el pH con HCl al 1N para finalmente inocular dos a tres gotas de muestra en medio Stonebrink. Se inocula cada muestra por duplicado y se difunde de manera oscilatoria hasta cubrir el pico de flauta para posteriormente ser incubados a 37°C y monitorearse semanalmente hasta las 8 semanas o 56 días.

A los aislamientos se les realizó tinción Ziehl-Neelsen y las colonias que resultaron bacilos alcohol ácido resistentes positivos se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular de la UABC Campus Ensenada, para su identificación molecular.

RESULTADOS

A. Condiciones para el tratamiento preanalítico de las muestras

Las condiciones preanalítica de la muestra se establecieron una vez que se realizó la revisión sistemática que permitió encontrar las mejores condiciones de tratamiento de la muestra.

Tabla 1. Condiciones para el tratamiento preanalítico de las muestras de queso fresco y/o tipo panela (Método Modificado de Petroff con Eritromicina)

Descripción	Condiciones
Cantidad muestra	1 gr.
NaOH al 4%	9 ml.
Maceración	Homogenización
Tiempo de reposo	10 min.
Centrifugación	3,000g/15 min.
Buffer de Fosfatos	15 ml.
Centrifugación	3,000g/15 min.
Eritromicina (6.9 mg/ml)	1ml
HCl 1N	Neutralizar

B. Aislamiento de *Mycobacterium bovis* de muestras de queso fresco y/o tipo panela

Después de aplicar el tratamiento preanalítico a las muestras se inocularon en medio Stonebrink se incubaron por 63 días de acuerdo al Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis (OPS, 2008) en la Tabla 2 se muestra que los tubos 1A, 1B y 3B presentan crecimiento con tinción Ziehl Neelsen positivo e identificado como *M. bovis* por PCR-Multiplex. El tubo 5A y 5B presentaron crecimiento en la primera semana con tinción Ziehl Neelsen positivo. El resto de las muestras no presentaron crecimiento.

Tabla 2. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación San Antonio de los Buenos.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
1	Fresco	1	1	+	+	Positivo
2	Fresco	-	-	-	-	Negativo
3	Panela	-	1	+	+	Positivo
4	Fresco	-	-	-	-	Negativo
5	Fresco	> 50	> 50	+	-	<i>Mycobacterium spp.</i>
6	Panela	-	-	-	-	Negativo

Una vez procesadas las muestras de la delegación de Playas de Tijuana la muestra del tubo 8B presentó contaminación la primera semana, el tubo 12B presentó crecimiento la primera semana, con tinción Ziehl Neelsen negativo. En los tubos 13A, 14A y 14B se acidificaron. El resto de las muestras no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación Playas de Tijuana.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
7	Panela	-	-	-	-	negativo
8	Panela	-	cont	-	-	contaminado
9	Panela	-	-	-	-	negativo
10	Panela	-	-	-	-	negativo
11	Fresco	-	-	-	-	negativo
12	Fresco	-	1	-	-	bacilos
13	Fresco	A	-	-	-	negativo
14	Fresco	A	A	-	-	negativo
15	Fresco	-	-	-	-	negativo

A= Medio ácido, K= Medio alcalino

Al finalizar el proceso de las muestras de la carretera Tijuana-Rosarito el tubo 23A presentó medio alcalino. Los tubos 28, 29 y 31-33 A y B presentaron medio ácido. El resto de las muestras no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela carretera Tijuana-Rosarito.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
16	Fresco	-	-	-	-	negativo
17	Fresco	-	-	-	-	negativo
18	Fresco	-	-	-	-	negativo
19	Fresco	-	-	-	-	negativo
20	Fresco	-	-	-	-	negativo
21	Fresco	-	-	-	-	negativo
22	Fresco	-	-	-	-	negativo
23	Fresco	K	-	-	-	negativo
24	Fresco	-	-	-	-	negativo
25	Fresco	1	1	+	-	<i>Mycobacterium</i> <i>spp.</i> negativo
26	Fresco	-	-	-	-	negativo
27	Panela	-	-	-	-	negativo
28	Panela	A	A	-	-	cocos
29	Panela	A	A	-	-	cocos
30	Panela	-	-	-	-	negativo
31	Panela	A	A	-	-	cocos
32	Panela	A	A	-	-	cocos
33	Panela	A	A	-	-	cocos

A= Medio ácido, K= Medio alcalino

Al término del procesamiento de las muestras de la carretera Tijuana-Tecate, el tubo 40A presentó contaminación. El resto de las muestras no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela carretera Tijuana-Tecate.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
34	Fresco	-	-	-	-	negativo
35	Fresco	-	-	-	-	negativo
36	Fresco	-	-	-	-	negativo
37	Fresco	-	-	-	-	negativo
38	Fresco	-	-	-	-	negativo
39	Fresco	-	-	-	-	negativo
40	Panela	*	-	-	-	contaminado
41	Panela	-	-	-	-	negativo
42	Panela	-	-	-	-	negativo

*= contaminado

Al concluir el proceso de las muestras de la delegación La Presa Rural, el tubo 43B se acidificó. El tubo 44B se contaminó en la primera semana. El resto de las muestras no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación La Presa Rural.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
43	Fresco	-	A	-	-	negativo
44	Fresco	-	*	-	-	contaminado
45	Fresco	-	-	-	-	negativo
46	Panela	-	-	-	-	negativo

A= Medio ácido, K= Medio alcalino, *= contaminado

Una vez procesadas las muestras de la delegación de Otay-Centenario los tubos 47A, 47B, 48A y 48B se contaminaron en la primera semana. El resto de las muestras no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación Otay-Centenario.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
47	Panela	*	*	-	-	contaminado, cocos
48	Panela	*	*	-	-	contaminado, cocos
49	Fresco	-	-	-	-	negativo
50	Fresco	-	-	-	-	negativo

*= contaminado

Al procesar las muestras de la delegación de la Sánchez Taboada, no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación Sánchez Taboada.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
51	Panela	K	-	-	-	negativo
52	Panela	-	-	-	-	negativo
53	Fresco	-	-	-	-	negativo
54	Fresco	-	-	-	-	negativo

K= Medio alcalino

Al finalizar las muestras de la delegación La Mesa, el tubo 57A presentó crecimiento pero con tinción Zihel-Neelsen negativa, las demás muestras no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación La Mesa.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
55	Panela	-	-	-	-	negativo
56	Fresco	-	-	-	-	negativo
57	Panela	1	-	-	-	cocos
58	Fresco	-	-	-	-	negativo

Al término del procesamiento de las muestras de la delegación Cerro Colorado, no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación Cerro Colorado.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
59	Panela	-	-	-	-	negativo
60	Panela	-	-	-	-	negativo
61	Fresco	-	-	-	-	negativo
62	Fresco	-	-	-	-	negativo

Al concluir el proceso de las muestras de la delegación La Presa, el tubo 63A y 63B tuvo tinción Zihel-Neelsen positiva, el tubo 64A se alcalinizó, el tubo 65B, 68A, 72A y 78A presentó crecimiento, pero con tinción Zihel-Neelsen negativa, el tubo 66A, 66B, 67A, 67B, 68B, 69B, 73B y 78B se acidificó, el resto de los tubos no presentaron crecimiento. Como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Aislamiento de *M. bovis* en queso fresco y panela de la delegación La Presa.

No. muestra	Tipo de Queso	Tubo		ZN	<i>M. bovis</i>	Observaciones
		No. Colonias A	B			
63	Panela	1	2	+	+	positivo
64	Panela	K	-	-	-	negativo
65	Panela	-	5	-	-	cocos
66	Panela	A	A	-	-	cocos
67	Panela	A	A	-	-	cocos
68	Panela	2	A	-	-	cocos
69	Panela	-	A	-	-	cocos
70	Panela	-	-	-	-	negativo
71	Fresco	-	-	-	-	negativo
72	Fresco	1	-	-	-	cocos
73	Fresco	-	A	-	-	cocos
74	Fresco	-	-	-	-	negativo
75	Fresco	-	-	-	-	negativo
76	Fresco	-	-	-	-	negativo
77	Fresco	-	-	-	-	negativo
78	Fresco	5	A	-	-	cocos
79	Fresco	-	-	-	-	negativo
80	Fresco	-	-	-	-	negativo
81	Fresco	-	-	-	-	negativo

A= Medio ácido, K= Medio alcalino

Para la delegación Centro se recorrió los expendios informales y no hubo locales para la adquisición de quesos que sirvieran como muestras para el estudio.

En el soberruedas de la delegación Centro, no se encontraron vendedores de muestras de queso por esa razón no existe registro para esta zona.

Tabla 12. Aislamiento de micobacterias por sitio de muestreo y tipo de queso en la ciudad de Tijuana, B.C. y la zona metropolitana Tijuana-Tecate-Rosarito.

Carretera libre	Tipo de queso	
	Fresco	Panela
San Antonio de los Buenos	2	1
La Presa	-	1
Tijuana-Rosarito	1	-
TOTAL	3	2

- Sin aislamientos de micobacterias.

Tabla 13. Relación de micobacterias aisladas por tipo de queso.

Tipo de Queso	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>
Fresco	1	2
Panela	2	0
TOTAL	3	2

C. Identificación molecular de *Mycobacterium bovis*.

Mycobacterium bovis se identificó mediante la técnica molecular PCR-Multiplex, en gel de agarosa al 2%, con 40 min. a 70mV.

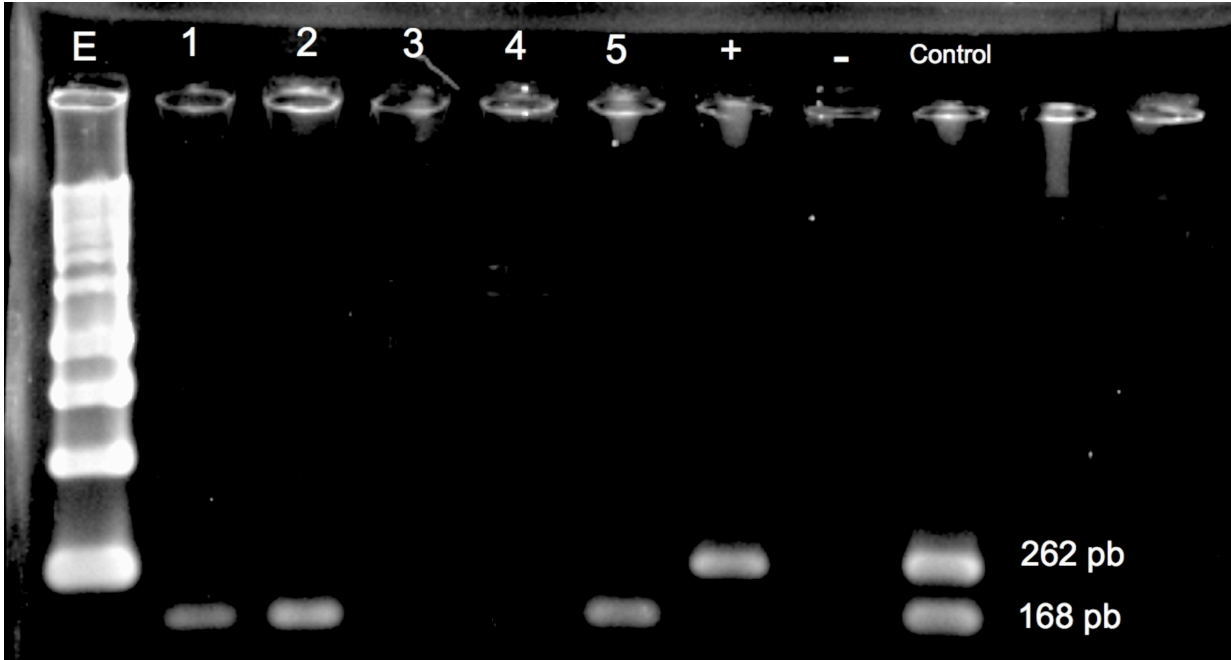


Figura 1. PCR-Multiplex para la identificación de *M. bovis*. E: Escalera de 100pb., 1: 1A, 2: 3B, 3: 5A, 4: 25A, 5: 65B, +: Control positivo a *M. tuberculosis*, -: Control negativo (H₂O nanopura), Control: *M. tuberculosis* 262pb. y *M. bovis* 168pb.

DISCUSIÓN

En las 81 muestras analizadas se obtuvo una incidencia del 6.17% de micobacterias, de estas el 60% corresponde a *M. bovis*, en contraste Beth Harris et al. (2007) analizaron 203 quesos frescos de los cuales aislaron el 4.9% de micobacterias, de estas el 10% se identificó como *M. bovis*. Comparado con el estudio realizado se obtuvo una mayor incidencia en el aislamiento de micobacterias por arriba del 1.27% y para el aislamiento de *M. bovis* del 50%. Ambos estudios analizaron quesos, pero varió en su método de descontaminación, Harris et al. emplearon el método de Kubica adicionado con eritromicina y en este estudio se utilizó el método modificado de Petroff adicionado con eritromicina. También existen diferencias en la utilización del medio de cultivo, Harris et al. utilizaron medios líquidos BACTEC 12B y BBL MGIT 960 y para este estudio se utilizó el medio sólido Stonebrink para el aislamiento.

En otro estudio realizado por Renata Cezar et al. (2016) en Pernambuco, Brasil, analizaron 107 quesos, el 2.8% fueron positivos a *M. bovis* mediante la identificación de las cepas por la técnica de PCR en tiempo real. Comparado con los resultados de esta investigación se obtuvo una mayor incidencia en el aislamiento de *M. bovis* por arriba del 0.9% ambos estudios analizaron quesos, pero Renata et al. preparó la muestra para analizar con PCR y en estudio se realizaron cultivos antes de identificarla con métodos moleculares.

Otro estudio realizado por Fetene et al. (2008) en Etiopia, analizaron 72 muestras de leche no pasteurizada y tuvieron una incidencia del 13.88% de micobacterias, de estas el 50% corresponde a la identificación de *M. bovis*, comparado con este estudio Fetene obtuvo 10% menos en la tasa de incidencia. Fetene et al. trabajaron con

muestras de leche y en este estudio se trabajó con quesos; ellos realizaron el estudio con el método original de Petroff. Para su aislamiento lo inocularon en medios Lowenstein Jensen (LJ), LJ con piruvato de sodio al 1% y LJ con glicerol, esta investigación utilizó el medio Stonebrink para el aislamiento de *M. bovis*. Para su identificación ellos no emplearon técnicas moleculares, solo se analizó la morfología colonial, sus patrones de crecimiento y pruebas bioquímicas con reducción de nitrato, fueron pruebas insuficientes para las tres micobacterias sin identificar.

Sirvastava et al. (2008) realizaron su estudio en India, analizaron 154 muestras de leche no pasteurizada logrando obtener una incidencia del 6.49% de micobacterias y el 60% correspondieron a *M. bovis*, a diferencia su incidencia de micobacterias fue 0.32% mayor que la encontrada en este estudio e igual porcentaje para muestras contaminadas por *M. bovis*. Sirvastava et al. descontaminaron con el método de Petroff modificado e incubaron con LJ con y sin piruvato.

Kahla et al. (2011) realizó un estudio en la región de Tunisia donde analizaron 306 leches no pasteurizadas, obteniendo 3.59% de micobacterias aisladas y de estas el 45.45% correspondieron a *M. bovis*. En contraste con este estudio realizado se obtuvo 2.58% más de incidencia y 14.45% más para *M. bovis* como el responsable contaminante. Kahla et al. descontaminaron sus muestras con el método de Petroff modificado e inocularon sus muestras en medio LJ y Coletsos.

LIMITACIONES

Una de las limitaciones de este estudio fue el no poder analizar leche no pasteurizada, debido a la nula cooperación por parte de la Asociación Ganadera de Tijuana A.C., este tipo de acciones no permite realzar análisis en los sitios de relevancia para el aislamiento de microorganismos que pueden afectar la salud humana, esto condicionó el tipo de muestra para el estudio que permitió el aislamiento de microorganismos de productos elaborados con leche no pasteurizada.

Al inicio del estudio, el tratamiento preanalítico de la muestra según referencias, no permitió la eficiente descontaminación, debido a que estos tratamientos se referían principalmente a muestras líquidas, en el caso de este estudio, se determinó por las condiciones de la investigación tomar muestras sólidas de queso fresco y panela elaborados de manera artesanal en la región de Tijuana, Tecate y Rosarito, B.C.

FORTALEZAS

Una vez resuelto el problema del tratamiento preanalítico de la muestra, este se convirtió en una fortaleza para el estudio, debido a que la eficiencia del método permitió el análisis de las muestras de queso.

Otra fortaleza es la metodología propuesta en este estudio, para el aislamiento de micobacterias de muestras sólidas que servirá para futuras investigaciones.

La infraestructura del Laboratorio de la Clínica de Tuberculosis del Hospital General Tijuana para el proceso preanalítico y el aislamiento microbiológico y el Laboratorio de Biología Molecular de la UABC Ensenada para la identificación molecular, de las muestras aisladas, constituyen una importante fortaleza para la realización de esta investigación.

CONCLUSIONES

Las muestras de queso tienen una extensa microflora que afectan el crecimiento de micobacterias, por lo que se debe seleccionar el método preanalítico de descontaminación de la muestra que garantice el aislamiento de *M. bovis*. En este estudio fue necesario adicionar eritromicina para incrementar la eficacia de la descontaminación con el método de Petroff modificado.

El lograr el aislamiento de *M. bovis* de quesos en la región sugiere que los quesos no pasteurizados son una fuente de contaminación para infecciones de tuberculosis y constituyen un riesgo de salud al ser consumidos sin una descontaminación de la leche previa sistematizada. Lo cual incrementa la posibilidad de que los pacientes que acudieron a la clínica de Tuberculosis del Hospital General de Tijuana, BC., consumieron productos lácteos no pasteurizados contaminados de la región. La otra explicación es que un humano polirresistente haya contagiado a una vaca y los productos lácteos de esta a otro humano. Si aplicamos la regla de la navaja de Okham, probablemente la primera sea la correcta.

Se obtuvieron cinco aislamientos de micobacterias entre los dos tipos de queso, tres se identificaron como la especie *Mycobacterium bovis* y en dos no se identificó el patrón de especie, y se describen como *Mycobacterium spp.* Los aislamientos de otras micobacterias en quesos no pasteurizados pueden contribuir en el incremento de riesgo para la salud de la población que los consume.

De los tres aislamientos de *M. bovis* dos se aislaron de muestras de queso tipo panela y uno de queso fresco.

RECOMENDACIONES

Hacer cumplir la NOM-031-ZOO-1995 donde establece que su campo de aplicación serán todas las explotaciones pecuarias que manejen bovinos, inclusive para aquellas personas que posean únicamente un animal, con el fin de disminuir el riesgo de contaminación por micobacterias.

Emplear herramientas para la detección de ganado infectado de acuerdo a la NOM-031-ZOO-1995 en la sección número siete a través de tuberculinización, análisis bacteriológico e histopatológico.

Para una descontaminación eficiente de muestras de queso, se recomienda el uso de eritromicina de acuerdo al método utilizado por Harris et al. (2007) y en esta investigación.

REFERENCIAS

1. Couto H, Abramo C, Munk M.E. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. *J. Bras Pneumol.* 2007; 33(3): 328-334.
2. Cuevas-Córdoba B, Zenteno-Cuevas. R. Tuberculosis drogorresistente: mecanismos moleculares y métodos diagnósticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2009; 28(9): 624-625.
3. Davies P.D. Tuberculosis in humans and animals: are we a threat to each other?. *Journal of the Royal Society of Medicine.* 2006; 99:539
4. Doetsch R.N. Benjamin Marten and His "New Theory of Consumptions". *Microbiological Reviews* 1978; 42 (3):521.
5. Ducati R.G., Ruffino A.N., Basso L.A., Santiago D. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2006; 101(7): 697-699.
6. Evans J.T., Grace E., Banerjee A., Smith R., Dale J., Innes J., Hunt D., Tweddell A., Wood A., Anderson C., Hewinson RG., Smith N.H., Hawkey P.M., Sonnenberg, P. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *The Lancet.* 2007; 369:1270.
7. Fetene T., N. Kebede and G. Alem. Tuberculosis Infection in Animal and Human Populations in Three Districts of Western Gojam, Ethiopia. *Zoonoses public health.* 2011; 58:47-53.

8. Fernandes D., Tavares L., Almeida P.E., Dellagostin O.A. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014; 45 (2): 369-370.
9. Franco M.M.J., A.C. Paes, M.G. Ribeiro, J.C.F. Pantoja, A.C.B. Santos, M. Mayata, C.Q.F. Leite, R.G. Motta and F.J.P. Listoni. Occurrence of *Mycobacteria* in Bovine Milk Samples from Both Individual and Collective Bulk Tanks at Farms and Informal Markets in the Southeast Region of Sao Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*. 2013; 9:1-8.
10. Good M, Duignan A. Perspectives on the History of Bovine TB and the Role of Tuberculin in Bovine TB Eradication. *Veterinary Medicine International*. 2011; 1,2,4.
11. Harrington R. & Karlson A. Destruction of Various Kind of *Mycobacteria* in Milk by Pasteurization. *Applied Microbiology*. 1965; 13(3):1y2.
12. Harris N.B., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T., Farrell D., Paulson D., Treviso S., Mikolon A., Rodriguez-Laniz A., Cernek-Hoskins Shannon., Rast R., Ginsberg M. and Kinde H. Recovery of *Mycobacterium bovis* from Fresh Cheese Originating in Mexico. *Environmental Microbiology*. 2007; 73(3): 1025-1028.
13. Iseman M.D. Tuberculosis therapy: past, present and future. *European Respiratory Journal*. 2002; 20(36): 87.
14. Kahla Ben I., M.L. Boschioli, F. Souissi, N. Cherif, M. Benzartin, J. Boukadida, S. Hammami. Isolation and Molecular Characterisation of *Mycobacterium bovis* from Raw Milk in Tunisia. *African Health Sciences*. 2011; 11(1):2-5.

15. Kantor I.N., LoBue P.A., Thone C.O. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in the United States, Latin America and the Caribbean. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2010; 14(11):1369-1373.
16. Laniado R., Muñiz R., García R.A., Vargas A.C., Villa C., Ocegüera L. Molecular Characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, México. *Infeccion, Genetics and Evolution*. 2014; 1-4.
17. LoBue P., LeClair J., Moser K. Contact investigation for cases of pulmonary *Mycobacterium bovis*. *Int. J. Tuberculosis Lung Dis*. 2004; 8(7):868–872.
18. López L.M., Díaz F., Vallecillo A.J., Esquivel H., Gutiérrez J.A. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2006; 48(2); 173-175.
19. Malama S., Bjordal T., Bwaya J., Munyeme M., Mbulo G., Muwonge A., Djonne B., Godfroid J. Characterization of *Mycobacterium bovis* from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. *Veterinary Medicine International*. 2014; Art ID 187842[1].
20. Mandal S., Bradshaw L., Anderson L.F., Brown T., Evans J.T., Drobniewski F., Smith G., Magee J.G., Barrett A., Blatchford O., Laurenson I.F., Seagar A.L., Ruddy M., White P.L., Myers R., Hawkey P., Abubakar, I. Investigating Transmission of *Mycobacterium bovis* in the United Kingdom in 2005 to 2008. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(5): 1943.

21. Martínez C.A. Diagnóstico Molecular de *Mycobacterium bovis* en Ganado Bovino de la Zona Centro del Estado de Veracruz. 2008; 3.
22. Modificación a la Norma Oficial Mexicana. NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.
23. Montagnani C., Chiappini Elena, Galli L., Martino M. Vaccine against tuberculosis: what's new? BMC Infectious Diseases. 2014; 14(1):6.
24. Müller B., Salome D., Alonso S., Hattendorf J., Laisse C.J.M., Parsons S.D.C., Helden P.D., Zinsstag J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced Tuberculosis in Humans. CDC. 2013; 19 (6): 899-904.
25. Norma Oficial Mexicana. NOM-031-ZOO-195. Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).
26. Norma Oficial Mexicana. NOM-035-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Quesos de Suero. Especificaciones Sanitarias.
27. OMS, World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2013; 9, 87, 139-144.
28. OMS, World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2015.
29. Pacheco-Negrete Giovani, Alcántara-Jurado Luis, Pérez-Morales Eugenia, Hurtado-Ayala Lilia, Laniado-Laborín Rafael, Carmen Jauregui-Romo. Tratamiento preanalítico para el aislamiento de *Mycobacterium bovis* en productos lácteos. Revista Iberoamericana de Ciencias. 2016. ISSN 2334-2501
30. Parisaca Mamani Sandra, Bautista Angela, Vasquez Michel Aneth. Comparación del rendimiento del medio de cultivo Löwenstein-Jensen in house y Löwenstein-Jensen comercial, para el aislamiento de *Mycobacterium*

tuberculosis de paciente con tuberculosis pulmonar. Revista conciencia. 2015; 1 (3): 69-76.

31. Pérez L., Milián F., Arraiga C., Romero C., Escartin M. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en zona endémica de Querétaro, México, Salud Pública de México. 2008; 50 (4):286-288 y 290.
32. Renata D.S. Cezar, Norma Lucena-Silva, Jonas M. Borges, Vania L.A. Santana, José W. Pinheiro Junior. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. International Journal of Mycobacteriology. 2016.
33. Rowe M.T. and J. Donaghy. *Mycobacterium bovis*: The Importance of Milk and Dairy Products as a Cause of Human Tuberculosis in the UK. A Review of Taxonomy and Culture Methods, with Particular Reference to Artisanal Cheeses. International Journal of Dairy Technology. 2008; 61(4):317-326
34. Roy A., Eisenhut M., Harris R.J., Rodriguez L.C., Sridhar S, Habermann S., Snell L., Mangtani P., Adetifa I., Lalvani A., Abubakar I. Effect of BCG vaccination against *Mycobacterium tuberculosis* infection in children: systemic review and meta-analysis. BMJ. 2014;1.
35. Secretaría de Salud. Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. SINAVE 2012;17 y 41.
36. Sgarioni S.A., R.D.C. Hirata, M.H. Hirata, C.Q.F. Leite, K.A. Prince, S.R.A. Leite, D.V. Filho, V.L.D. Siqueira, K.R.C. Ferracioli, R.F. Cardoso. Occurrence of *Mycobacterium bovis* and Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM) in Raw and

Pasteurized Milk in the Northwestern Region of Paraná, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2014; 45(2):707-711.

37. Spickler, Anna Rovid. "Tuberculosis bovina." "2009." En <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php?lang=es>
38. Srivastava K., D.S. Chauhan, P. Gupta, H.B. Singh, V.D. Sharma, V.S. Yadav, Sreekumaran, S.S. Thakral, J.S. Dharamdheeran, P. Nigam, H.K. Prasad and V.M. Katoch. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from Cattle of Some Farms in North India - Possible relevance in human health. Indian j Med Res. 2006; 128:26-31.
39. The Center for Food Security & Public Health. Tuberculosis bovina 2009; 1 y 2.
40. Grange John M., Yates Malcom D., and Kantor Isabel N. World Health Organization. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 1996:1-23.
41. World Organization for Animals Health. Terrestrial Animal Health Code 2014; Vol. 8 Chapter 11.5 Bovine Tuberculosis: 1.
42. Zarden C.F.O., Marassi C.D., Figueiredo E.E.E.S., Lilendaum W. *Mycobacterium bovis* Detection from Milk of Negative Skin Test Cows. Veterinary Record. 2013;172:1-3.