



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**INFECCIÓN MUTUA DE TUBERCULOSIS ENTRE
HUMANOS Y BOVINOS EN POBLACIONES DE ALTO RIESGO**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS**

P R E S E N T A

LAURA PÉREZ GUERRERO

TUTOR:

FELICIANO MILIAN SUAZO

COMITÉ TUTORAL:

CAMILA ARRIAGA DÍAZ

GERMINAL JORGE CANTÓ ALARCÓN

QUERÉTARO, QRO.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a las personas que más quiero, en especial a mis padres y a mi esposo y a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

MUCHAS GRACIAS POR TODO.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Doctor Guillermo G. Moreno, del Departamento de Coordinación de Salud del IMSS por proporcionar muestras de pacientes sospechosos a TB.

Se agradece a la Química Noemí Arellano Pizano del Laboratorio de Diagnóstico Clínico del IMSS por realizar las pruebas de BAAR y aislamiento de las muestras.

Se agradece también al Doctor Wenceslao Alejandro Martínez Medina, del Programa de Micobacteriosis del Departamento de Control de enfermedades de la SeSeQ Querétaro, por el seguimiento epidemiológico de casos.

Se agradece a todos los ranchos que participaron activamente, que por cuestiones de confidencialidad no se menciona el nombre y a cada uno de los empleados que entusiastamente y de forma voluntaria participaron con la donación de muestras para realizarles diagnóstico de tuberculosis.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) en el humano puede ser causada por *Mycobacterium bovis*, causante de la TB del ganado, por lo que se considera que los hatos lecheros infectados representan un riesgo para la salud pública. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *M. bovis* en infecciones tuberculosas en humanos y la similitud genética de estas cepas con aquellas obtenidas del ganado como indicativo de transmisión bovino-humano en una zona de alta prevalencia. Se trabajaron 473 muestras de humanos y 40 muestras de bovinos con lesiones macroscópicas compatibles con TB. Del total de muestras de humanos, 255 fueron de pacientes sintomáticos sospechosos de TB referidos al laboratorio de diagnóstico del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del estado de Querétaro, entre enero del 2006 y febrero del 2007. El resto, 218, fueron obtenidas de empleados de ranchos lecheros, quienes participaron voluntariamente con muestras de esputo y orina de marzo del 2006 a febrero del 2007. Las muestras de bovinos fueron colectadas del rastro municipal de la ciudad de Querétaro, de octubre del 2006 a enero del 2007. Todas las muestras fueron sometidas a pruebas de BAAR, aislamiento (stonebrink con piruvato y Löwenstein-Jensen) y PCR_{CyB}. Las muestras positivas a PCR_{CyB} así como los aislados obtenidos fueron sometidos a PCR_{MPB70} simple y PCR anidada para detectar ADN de *M. bovis* y luego sometidos a análisis molecular con el método de "spoligotyping" para obtener el patrón molecular. Los patrones moleculares fueron comparados con patrones de aislados de bovinos en la misma región para determinar similitud genética. De las 473 muestras se obtuvieron 25 aislados y 124 muestras positivas a PCR anidado; de las primeras, 13 (52%) tuvieron patrón compatible con *M. tuberculosis* y 12 (48%) con *M. bovis*; mientras que de las segundas, 96 (74%) mostraron espiligotipos compatibles con *M. tuberculosis* y 22 (18%) con *M. bovis*; 6 (5%) no mostró hibridación en spoligotyping. El patrón molecular de 2 muestras de humano identificadas como *M. bovis* fueron idénticas a un patrón molecular de cepa de *M. bovis* obtenido en 5

muestras de ganado bovino en la misma región. Otras 7 muestras de humanos mostraron sólo un espaciador diferente a 9 muestras de bovinos. Los resultados sugieren que *M. bovis* juega un papel importante en la epidemiología de la tuberculosis humana y que la tuberculosis en el ganado representa un riesgo para la salud pública.

Palabras clave: tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, spoligotyping, tipificación, epidemiología molecular.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) in humans is also caused by *Mycobacterium bovis*, the main cause of TB in cattle. It is believed that infected dairy herds pose a risk to public health. The purpose of this study was to determine the presence of *M. bovis* tuberculous infection in humans and the genetic similarity of these strains to those obtained from cattle as indicative of bovine-human transmission in a high prevalence area. Four-hundred and seventy three sputum, urine and other samples from humans and 40 lymph nodes samples from cattle were included in the study. Out of the total human samples, 255 came from TB symptomatic patients referred to the state's diagnostic laboratory in the Mexican Social Security Institute (IMSS) in the city of Queretaro, between January 2006 and February 2007. The remaining 218 samples came from dairy farms workers obtained between March 2006 and February 2007. Cattle samples were collected from a slaughterhouse in the city of Queretaro, between years October 2006 to January 2007. All samples were analyzed with the BAAR-test, isolation (stonebrink with pyruvate and Löwenstein-Jensen with glycerol) and PCR_{CyB}. PCR_{CyB} positive samples and isolates were subjected to PCR^{MPB70} simple and nested PCR to detect DNA from *M. bovis*, and then subjected to molecular analysis by the method of "spoligotyping" to obtain the fingerprint. Molecular patterns were compared to those obtained from cattle in the same region to determine genetic similarity. Of the 473 samples, 25 isolates and 124 nested-PCR positive samples were obtained; from the first, 13 (52%) had a pattern consistent with *M. tuberculosis* and 12 (48%) with *M. bovis*, whereas in the latter, 96 (74%) showed spoligotypes compatible with *M. tuberculosis* and 22 (18%) with *M. bovis*; 6 (5%) showed no hybridization in "spoligotyping". The molecular pattern of 2 *M. bovis* strains from humans were identical to patterns from 5 cattle strains obtained in the same region. Another 7 strains from humans showed only a spacer difference to 9 strains from cattle. Our results suggest that

M. bovis plays an important role in the epidemiology of tuberculosis in humans and that it represent a risk to public health.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium*, *Mycobacterium bovis*, spoligotyping, molecular epidemiology.

CONTENIDO	PAGINA
Dedicatorias	II
Agradecimientos	III
Resumen	IV
Abstract	VI
Contenido	VIII
Lista de cuadros	X
Lista de figuras	XII
Lista de apéndices	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Antecedentes	4
2.2 Generalidades	5
2.3 Patogénesis de la Enfermedad	11
2.4 Infección bovino-humano	12
2.5 Infección humano-bovino	17
2.6 Transmisión humano-humano	17
2.7 Diagnóstico de la enfermedad	18
2.8 Sub-reporte de <i>M. bovis</i> como causa de TB en humanos	22
2.9 Tipificación de especies	23
2.10 Técnicas de biología molecular en la diferenciación de especies	25
3. JUSTIFICACIÓN	28
4. HIPÓTESIS	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo general	30
5.2 Objetivo específico	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1 Muestras de humanos	31
6.2 Prueba de BAAR	32

6.3 Aislamiento	32
6.4 PCR	33
6.5 Espoligotipificación	34
6.6 Muestras de bovinos	34
6.11 Análisis estadísticos	35
7. RESULTADOS	36
8. DISCUSIÓN	41
9. CONCLUSIONES	46
10. REFERENCIAS	66
11. APÉNDICE	80

LISTA DE CUADROS	PAGINA
Cuadro 1. Proporción de casos de tuberculosis humana en diferentes lugares del mundo donde se ha determinado a <i>M. bovis</i> causante de la infección de TB humana.	14
Cuadro 2. Casos registrados de tuberculosis humana de origen bovino en diferentes países europeos	15
Cuadro 3. Características de los bacilos <i>M. bovis</i> y <i>M. tuberculosis</i> .	24
Cuadro 4. Resultados del análisis molecular de muestras de diferentes muestras obtenidas de humanos, 255 de pacientes con sintomatología de tuberculosis y 218 de empleados de establos lecheros sin síntomas aparentes, en el estado de Querétaro. Enero 2006 a Febrero 2007.	49
Cuadro 5. Resultados del análisis molecular de diferentes muestras obtenidas de pacientes con sintomatología de tuberculosis en el estado de Querétaro. Enero 2006 a Febrero 2007.	50
Cuadro 6. Resultados del análisis molecular de muestras de esputo y orina obtenidas de empleados de establos lecheros sin sintomatología aparente de tuberculosis en el estado de Querétaro. Junio 2006 a Febrero 2007.	51
Cuadro 7. Resultados del análisis molecular de 40 muestras de diferente tejido obtenido de bovino lechero con lesión aparente de tuberculosis, colectadas del rastro municipal del estado de Querétaro. Octubre 2006 a Diciembre 2006.	52

LISTA DE CUADROS	PAGINA
Cuadro 8. Características de los individuos que mostraron patrón molecular (fingerprint) compatible con <i>M. bovis</i> en el estado de Querétaro.	61
Cuadro 9. Información epidemiológica de todos los casos (sintomáticos y asintomáticos) que dieron patrón (<i>M. tuberculosis</i> o <i>M. bovis</i>) en el análisis molecular obtenidos de diferentes muestras clínicas de humanos muestreados de Enero del 2006 a Febrero del 2007 en el estado de Querétaro.	59

LISTA DE FIGURAS	PAGINA
Figura 1. Representación gráfica de la evolución de líneas genéticas, ilustrando sucesivas pérdidas de ADN en ciertas líneas evolutivas (cuadros grises).	5
Figura 2. Diagrama de flujo de la patogénesis de la tuberculosis.	6
Figura 3. Esquema de las principales diferencias entre <i>M. bovis</i> (AF2122/97) y <i>M. tuberculosis</i> H37RV.	7
Figura 4. Estructura general de un <i>Mycobacterium</i> .	10
Figura 5. Bacilos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> con tinción de Ziehl-Neelsen, 100X.	
20	
Figura 6. Ubicación geográfica de los ranchos visitados muestreados para la obtención de muestras de esputo y orina de trabajadores para determinar la presencia de <i>M. bovis</i> en casos de tuberculosis en el estado de Querétaro.	48
Figura 7. Dendrograma mostrando la relación de los espoligotipos obtenidos del análisis molecular de muestras del grupo de pacientes sintomáticos que dieron patrones compatibles con <i>M. bovis</i> en el estado de Querétaro.	53
Figura 8. Dendrograma en el que se muestra la relación de los espoligotipos obtenidos del análisis molecular de muestras del grupo de empleados de ranchos lecheros que dieron patrones <i>M. bovis</i> . en el estado de Querétaro.	54
Figura 9. Dendrograma en el que se muestra la relación de los patrones obtenidos como <i>M. bovis</i> . del análisis molecular de muestras del grupo de pacientes con sintomatología	

comparados con 69 espoligotipos *M. bovis* obtenidos de diferente tejido bovino en el estado de Querétaro. 55

LISTA DE FIGURAS

PAGINA

- Figura 10. Dendrograma en el que se muestra la relación de los patrones obtenidos como *M. bovis* del análisis molecular de muestras del grupo asintomático con 69 espoligotipos *M. bovis* obtenidos de diferente tejido bovino del estado de Querétaro. 56
- Figura 11. Dendrograma en el que se muestra la relación de los patrones obtenidos del análisis molecular compatibles con *M. tuberculosis* del grupo de sintomáticos y asintomáticos, obtenidos de diferentes muestras clínicas en el estado de Querétaro. 58
- Figura 12. Comparación de resultados obtenidos en las pruebas de PCR de las 473 muestras de humanos sintomáticos y asintomáticos, de acuerdo al tipo de muestra utilizada (muestra directa o aislado) en el estado de Querétaro. 65

LISTA DE APÉNDICES

PAGINA

Anexo I	80
Anexo II	84
Anexo III	86
Anexo IV	88
Anexo V	89
Anexo VI	91
Anexo VII	95
Anexo VIII	99

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) humana es todavía la enfermedad más importante causada por un agente único en el mundo, la cual causa millones de casos nuevos cada año (Llaca et al., 2003). En países en vías de desarrollo las defunciones por esta enfermedad representan el 25% del total de muertes evitables. Co-infecciones inmunodepresoras como el virus causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) han sido identificados como factores que influyen en la morbilidad y la mortalidad (Llaca et al., 2003; Shen et al., 2004; Valerga et al., 2005); además de la Diabetes mellitus, linfomas, leucemia, insuficiencia renal crónica, tratamientos inmunosupresores, trastornos asociados con derivación como gastrectomía y cirugía de derivación yeyuno-ileal, la desnutrición, la sobrepoblación, el tabaquismo y la drogadicción (Moda et al., 2004; Milián, et al., 2000; Caminero, 2003; Araujo, 2004; Bernar, 2007; Chayaka, 2007; Gasana, 2007).

Una de las razones del incremento de los casos de tuberculosis en los últimos 15 años ha sido la falta de recursos para combatir la enfermedad (Toledo, 1997). De acuerdo a cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 1990 se tenían 8 millones de casos de TB activa en el mundo, de los cuales 7.6 estaban en países en desarrollo (Caminero, 2003). En los últimos años, estas cifras se incrementaron a 2 billones de infectados, 9 millones de enfermos y 3 millones de muertes anuales (Montoto, 2005). A finales del año 2000, 36 millones de personas en el mundo vivían con VIH/SIDA, el doble de la cifra que predecía la OMS en 1991. En 1999, tres cuartos de las personas afectadas por VIH/SIDA vivían en 22 países con alta incidencia de tuberculosis. Tan solo en el año 2000, más de cinco millones de personas fueron infectadas por el VIH; los países con las mayores tasas de VIH también poseen las mayores tasas de tuberculosis (Mendel et al., 1991).

En México la TB ha sido reportada como problema emergente de salud pública, la cual ha incrementado su incidencia en 28 de los 32 Estados de la República Mexicana; en algunos estados, de 1996 a 1997, el número de casos incrementó en un 100%. Las principales formas de tuberculosis por las que mueren las personas son de tipo pulmonar (84%) seguida por la meníngea (3.5%), que son las formas de mayor interés epidemiológico. Todos los días, más de 20 mil personas desarrollan tuberculosis activa y cinco mil mueren por esta causa (Secretaría de Salud del Estado de Querétaro, 1996).

La TB en el humano es causada por *M. tuberculosis*, pero también puede ser causada por otras especies de micobacterias, como es el caso de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), causante de la tuberculosis del ganado. De hecho existe una relación cruzada de infección; TB en humanos causada por *M. tuberculosis*, TB en humanos causada por *M. bovis*, TB en bovinos causada por *M. tuberculosis* y TB en bovinos causada por *M. bovis* (Committee on Bovine Tuberculosis, 1994). Por lo que es posible la transmisión de animales a humanos, de humanos a animales, de humano a humano y de animal a animal (Kumar et al., 2004); razón por la cual los hatos lecheros infectados representan un riesgo para salud pública.

En riesgo de salud pública en México se agrava porque la prevalencia de la TB en el ganado lechero es alta (16%), aunque algunos hatos pueden tener prevalencias que alcanzan el 60% (comunicación personal de Médicos aprobados en Campaña Oficial). Se estima que el problema crece debido a la falta de participación de los productores en actividades de campaña (Milián et al., 2000). La región centro del país (Guanajuato, Aguascalientes, San Luis Potosí y Querétaro) constituye una de las principales zonas lecheras de México. En estos Estados se producen en promedio 1,400,000 litros de leche al año, 30% de la cual se vende como leche cruda que no va directamente a plantas pasteurizadoras, lo que implica un alto riesgo para la salud pública (NOM-031-ZOO-1995). Dado que la TB es una enfermedad que se adquiere principalmente

por vía respiratoria, el contacto directo con animales infectados es también factor de riesgo; riesgo que sufren los trabajadores de establos (ordeñadores, corraleros, veterinarios) y trabajadores de rastro y plantas de sacrificio de animales (Toledo, 1997).

De manera anecdótica se menciona que la TB en humanos causada por *M. bovis* en México es del 8%, sin embargo, ni en México ni en el mundo existen estudios que de manera precisa hayan estimado el grado de transmisión mutua entre ambas especies. El razonamiento detrás del presente trabajo es que si las infecciones entre bovinos y humanos de un mismo lugar están ocurriendo de manera constante, los patrones moleculares (fingerprints) de los aislados de *Mycobacterium* de una y otra especie deben ser los mismos o al menos con un alto grado de homogeneidad.

RESUMEN

La tuberculosis (TB) en el humano puede ser causada por *Mycobacterium bovis*, causante de la TB del ganado, por lo que se considera que los hatos lecheros infectados representan un riesgo para la salud pública. El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *M. bovis* en infecciones tuberculosas en humanos y la similitud genética de estas cepas con aquellas obtenidas del ganado como indicativo de transmisión bovino-humano en una zona de alta prevalencia. Se trabajaron 473 muestras de humanos y 40 muestras de bovinos con lesiones macroscópicas compatibles con TB. Del total de muestras de humanos, 255 fueron de pacientes sintomáticos sospechosos de TB referidos al laboratorio de diagnóstico del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del estado de Querétaro, entre enero del 2006 y febrero del 2007. El resto, 218, fueron obtenidas de empleados de ranchos lecheros, quienes participaron voluntariamente con muestras de esputo y orina de marzo del 2006 a febrero del 2007. Las muestras de bovinos fueron colectadas del rastro municipal de la ciudad de Querétaro, de octubre del 2006 a enero del 2007. Todas las muestras fueron sometidas a pruebas de BAAR, aislamiento (stonebrink con piruvato y Löwenstein-Jensen) y PCR_{CyB}. Las muestras positivas a PCR_{CyB} así como los aislados obtenidos fueron sometidos a PCR_{MPB70} simple y PCR anidada para detectar ADN de *M. bovis* y luego sometidos a análisis molecular con el método de "spoligotyping" para obtener el patrón molecular. Los patrones moleculares fueron comparados con patrones de aislados de bovinos en la misma región para determinar similitud genética. De las 473 muestras se obtuvieron 25 aislados y 124 muestras positivas a PCR anidado; de las primeras, 13 (52%) tuvieron patrón compatible con *M. tuberculosis* y 12 (48%) con *M. bovis*; mientras que de las segundas, 96 (74%) mostraron espiligotipos compatibles con *M. tuberculosis* y 22 (18%) con *M. bovis*; 6 (5%) no mostró hibridación en spoligotyping. El patrón molecular de 2 muestras de humano identificadas como *M. bovis* fueron idénticas a un patrón molecular de cepa de *M. bovis* obtenido en 5 muestras de ganado bovino en la misma región. Otras 7 muestras de humanos mostraron sólo un espaciador diferente a 9 muestras de bovinos. Los resultados sugieren

que *M. bovis* juega un papel importante en la epidemiología de la tuberculosis humana y que la tuberculosis en el ganado representa un riesgo para la salud pública.

Palabras clave: tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, spoligotyping, tipificación, epidemiología molecular.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) in humans is also caused by *Mycobacterium bovis*, the main cause of TB in cattle. It is believed that infected dairy herds pose a risk to public health. The purpose of this study was to determine the presence of *M. bovis* tuberculous infection in humans and the genetic similarity of these strains to those obtained from cattle as indicative of bovine-human transmission in a high prevalence area. Four-hundred and seventy three sputum, urine and other samples from humans and 40 lymph nodes samples from cattle were included in the study. Out of the total human samples, 255 came from TB symptomatic patients referred to the state's diagnostic laboratory in the Mexican Social Security Institute (IMSS) in the city of Queretaro, between January 2006 and February 2007. The remaining 218 samples came from dairy farms workers obtained between March 2006 and February 2007. Cattle samples were collected from a slaughterhouse in the city of Queretaro, between years October 2006 to January 2007. All samples were analyzed with the BAAR-test, isolation (stonebrink with pyruvate and Löwenstein-Jensen with glycerol) and PCR_{CyB}. PCR_{CyB} positive samples and isolates were subjected to PCR^{MPB70} simple and nested PCR to detect DNA from *M. bovis*, and then subjected to molecular analysis by the method of "spoligotyping" to obtain the fingerprint. Molecular patterns were compared to those obtained from cattle in the same region to determine genetic similarity. Of the 473 samples, 25 isolates and 124 nested-PCR positive samples were obtained; from the first, 13 (52%) had a pattern consistent with *M. tuberculosis* and 12 (48%) with *M. bovis*, whereas in the latter, 96 (74%) showed spoligotypes compatible with *M. tuberculosis* and 22 (18%) with *M. bovis*; 6 (5%) showed no hybridization in "spoligotyping". The molecular pattern of 2 *M. bovis* strains from humans were identical to patterns from 5 cattle strains obtained in the same region. Another 7 strains from humans showed only a spacer difference to 9 strains from cattle. Our results suggest that *M. bovis* plays an important role in the epidemiology of tuberculosis in humans and that it represent a risk to public health.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium*, *Mycobacterium bovis*, spoligotyping, molecular epidemiology.

2. REVISION DE LITERARURA

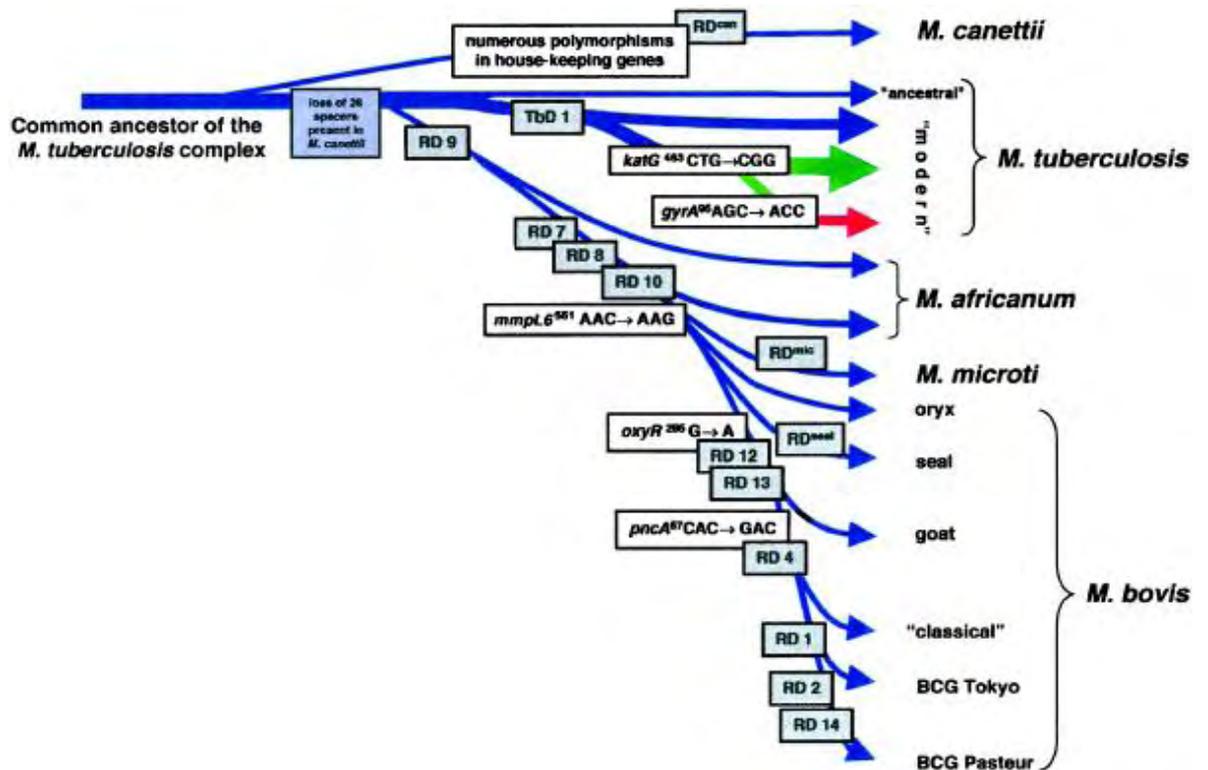
2.1 Antecedentes

Existen múltiples especulaciones sobre el origen de la TB en la especie humana. Algunas teorías califican a la enfermedad como una de las más antiguas que han afectado al hombre. Se dice que la TB ha acompañado al hombre por lo menos durante los últimos 5000 años, según revelan estudios realizados en momias egipcias, mesopotámicas, incas y del Asia Central elaboradas desde los años 2050 antes de cristo. En estas momias se presentaron patrones de *Mycobacterium tuberculosis* o de *Mycobacterium africanum*; sin embargo, ninguna reveló un patrón específico de *M. bovis*. Hay teorías que le atribuyen una antigüedad de 150 millones de años, lo que habría precedido incluso al origen de los primates, incluyendo al *Homo sapiens*. Por esto, se considera que si la mayoría de los componentes del género *Mycobacterium* tienen su hábitat natural en el agua y la tierra, el origen del mismo haya estado en el medio ambiente (Montali et al., 2001; Ospina, 2001; Zink et al., 2003; Araujo, 2004).

Anteriormente se consideró que *M. tuberculosis* surgió como una mutante de *M. bovis*, como consecuencia del inicio de la sociedad como la conocemos actualmente y de la domesticación de los animales que eran requeridos como fuente de alimento o como fuerza de trabajo. Esta hipótesis surgió al conocer que *M. tuberculosis* es un patógeno exclusivo de humanos mientras que *M. bovis* tiene una amplia gama de hospederos. Sin embargo, dicho postulado fue propuesto antes de que se conociera y se comparara el genoma completo de los miembros del complejo de *M. tuberculosis* (Araujo, 2004).

El estudio del genoma de *M. tuberculosis* inequívocamente demostró que *M. bovis* sufrió numerosas mutaciones relativas a *M. tuberculosis* (Brodin, 2002),

además de que el genoma del *M. bovis* es más pequeño. Esto pudiera indicar que el primero es el miembro final de un linaje separado (Figura 1) (Brosch, et al., 2002, Garnier et al., 2002). Sin embargo, a pesar de que ya se descifró el ADN completo, actualmente se desconoce el papel de *M. bovis* en la epidemiología de la TB humana (Garnier, et al., 2002).



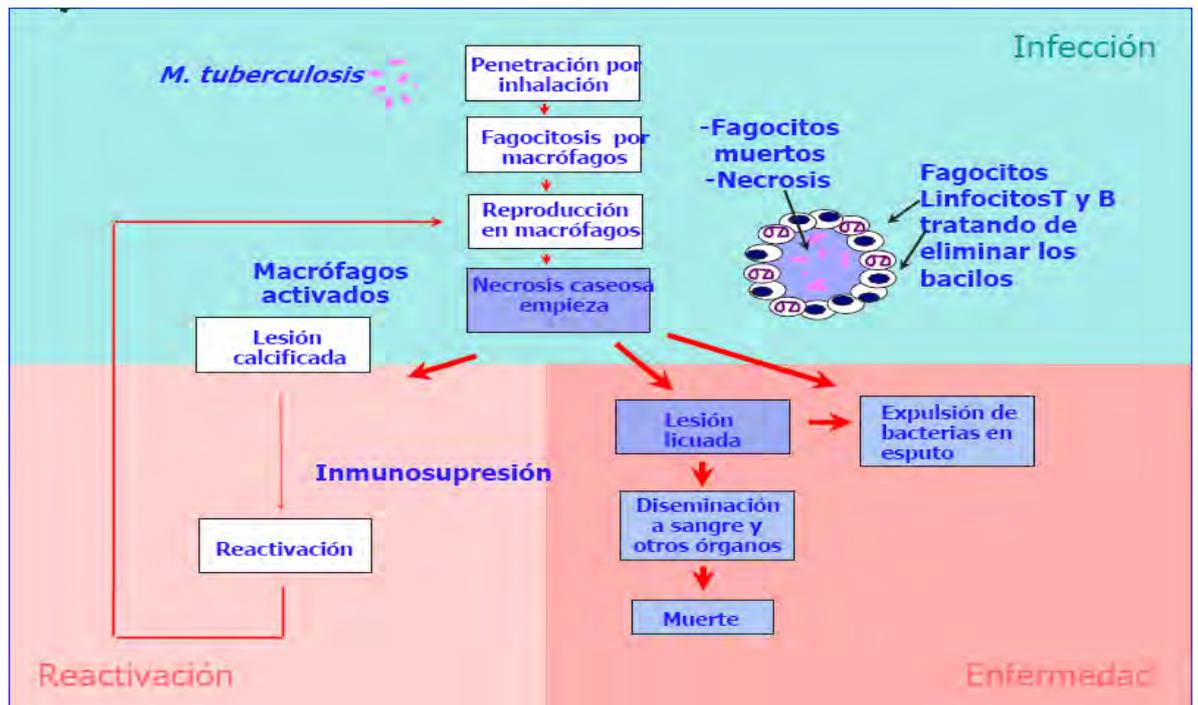
(Brosch et al., 2002)

Figura 1. Representación gráfica de la evolución de líneas genéticas ilustrando sucesivas pérdidas de ADN en ciertas líneas evolutivas (cuadros grises). El esquema está basado en la presencia o ausencia de deleciones conservadas y en las secuencias del polimorfismo en 5 genes seleccionados. Las flechas azules indican un grupo de cepas, las flechas verdes indican que las cepas pertenecen a otro grupo y las flechas rojas indican otro grupo de cepas.

2.2 Generalidades

Los agentes etiológicos causante de la tuberculosis en humanos son *M. tuberculosis* y *M. bovis*, miembros del *complejo de M. tuberculosis*, al cual también pertenecen *M. africanum*, *M. microti* y *M. canetti*. *M. africanum* también produce tuberculosis humana en África; *M. microti* causa tuberculosis en ratas silvestres y *M. canetti* puede producir la enfermedad en humanos (O'Reilly and Daborn, 1995; Cole, 2002; Mancilla et al., 2006). La especie *M. bovis* ha sido

subdividida recientemente en *M. bovis* Subs. *bovis*, resistente a pirazinamida (PZA) y *M. bovis* Subs. *caprae*, sensible a PZA (Aranáz et al., 1996; Kubica, et al., 2003; Wilfried et al., 2004). Todas estas especies tienen un ancestro en común (**Figura 1**) (Brosch et al., 2002).

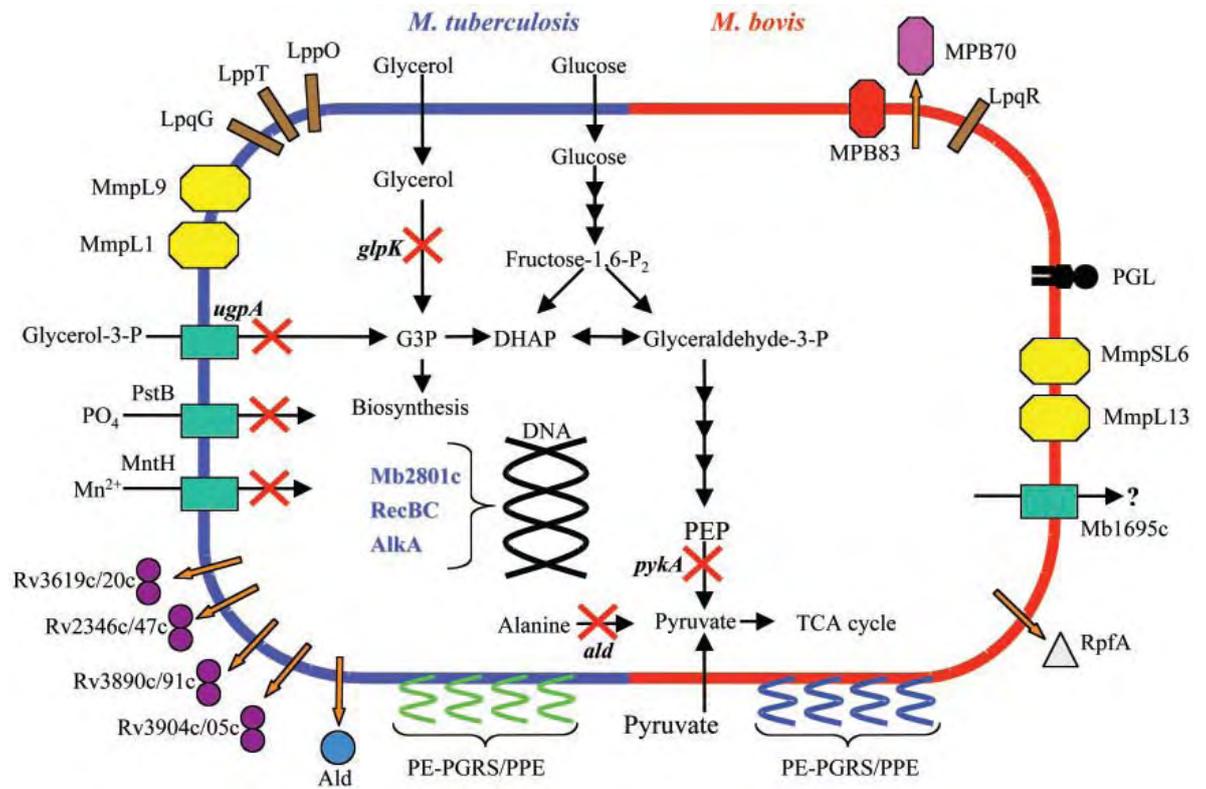


(Matamoros, 2003).

Figura 2. Diagrama de flujo de la patogénesis de la tuberculosis.

Todos los miembros del complejo *M. tuberculosis* están caracterizados y presentan una similitud del 99.95% a nivel de nucleótidos y de las secuencias idénticas 16S rRNA, pero difieren ampliamente en términos de los tropismos de sus hospederos, fenotipos y patogenicidad (**Figura 2**) (Kato-Maeda, et al., 2001; Brosch et al., 2002; Garnier, et al. 2003; Manabe et al., 2003). Las mutaciones de la información genética sufrida por *M. bovis* ha ocasionado que el genoma se reduzca, siendo por lo tanto más pequeño que el de *M. tuberculosis*. Es importante mencionar que no hay genes únicos para *M. bovis*, comparado con los otros miembros del complejo de *M. tuberculosis*, lo que implica que la

expresión genética diferencial podría ser la llave para explicar el tropismo del bacilo humano y bovino (**Figura 3**)(Hewinson et al., 2006).



(Garnier et al., 2003).

Figura 3. Esquema de las principales diferencias entre *M. bovis* (AF2122/97) y *M. tuberculosis* H37RV. La línea azul (*M. tuberculosis*) y rojo (*M. bovis*) representa la pared celular, sobre ésta se ilustran las superficies expuestas y las partículas transportadoras de moléculas. En anaranjado se muestra diferencialmente las proteínas secretadas en cada una de las membranas. En el interior de la membrana se muestran los pasos claves del metabolismo de los carbohidratos. Las cruces rojas muestran las lesiones ocurridas en *M. bovis*. En azul están las proteínas que interactúan con el ADN inactivado en *M. bovis*. PGL(Glicolípido fenólico); G3P (glicerol 3-fosfato); DHAP (Dihidroxiacetona fosfato), PEP (fosfoenol-piruvato); Ald (alanina deshidrogenasa).

Ahora se sabe que una mutación puntual en el gen *pncA* en *M. bovis*, le confiere la resistencia a la pirazinamida, además de que evita la acumulación de niacina. La acumulación de niacina en *M. tuberculosis* sugiere que la variación de los componentes de la pared celular y la expresión de los genes fueron la clave de la evolución de *M. bovis*. También se demostró que la gran diferencia de la secuencia de variaciones entre el bacilo humano y el bovino se encuentra en los genes que codifican para la pared celular y las proteínas secretadas. En *M. bovis* el gen *rpfA* es uno de los 5 miembros que codifican para ciertas proteínas secretadas que promueven la reactivación del bacilo tuberculoso (Scorpio et al., 1997; Hewinson et al., 2006). A diferencia de *M. tuberculosis*, cuando al bacilo de *M. bovis* se le reproduce *in vitro*, el primero presenta atrofia del gen que codifica para piruvato, mientras que el segundo necesita de la adición de glicerol como única fuente de carbono (Garnier, et al., 2003).

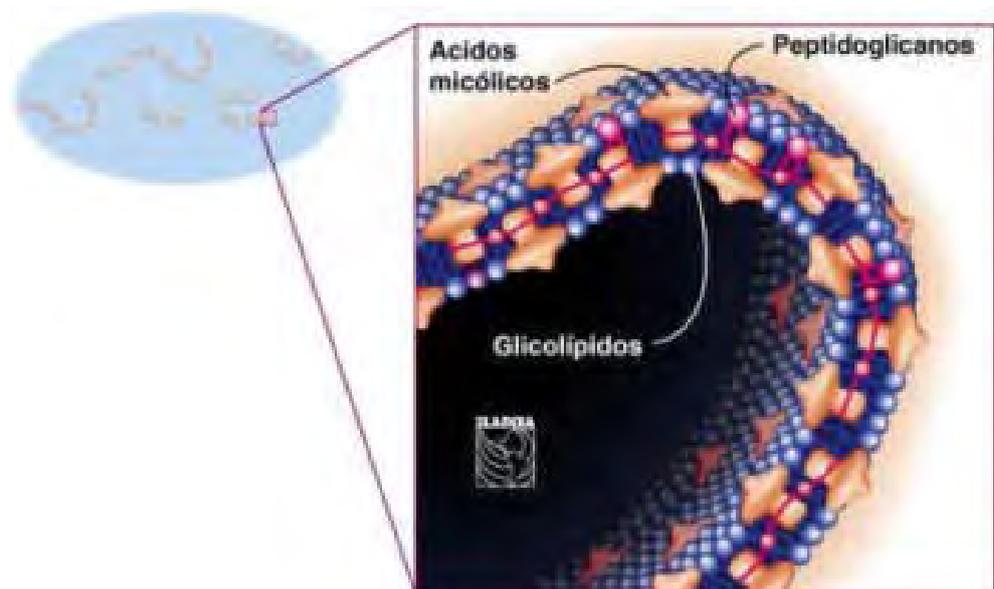
La tuberculosis bovina se ha reportado en animales domesticados y fauna silvestre como camellos, llamas, búfalos, bisontes kudu, antílopes, leones, elefantes, simios, perros, gatos, cabras, venados, castores, zorras, etc., (Francis, 1958; Sawa et al., 1974; Clancey, 1977; Himes et al., 1980; Stumpff et al., 1984; deKantor et al., 1984; Collins and Grange, 1987; Cooke et al., 1993; de Lisle et al., 1993; Flamand et al., 1994; O'Reilly and Daborn, 1995; Liébana et al., 1998; Monies, 2000; Sales et al., 2001) provocando consecuencias graves en la biodiversidad. La tuberculosis debida a *M. bovis* presenta un patrón epidemiológico complejo, la cual incluye la transmisión de la infección entre animales de granja y fauna silvestre (Collins and Grange, 1987; Francis, 1958; Collins, 1983). Además de que *M. bovis*, tiene un gran potencial zoonótico, y no solo en animales; en humanos se han registrado varios casos de tuberculosis ocasionada por el bacilo bovino (Danker et al., 1993; Cotter et al., 1996; Gutiérrez, et al., 1997; Niobe_Eyangoh, et al., 2003; Kubica, 2003; LoBue et al., 2003; Gibson et al 2004; Esteban et al., 2005; Young and O'Connor, 2005).

El bacilo causante de la TB en humanos y bovinos puede ser diferenciado por su rango de hospederos, su virulencia y sus características fisiológicas. Sin embargo, las bases genéticas que originan estas diferencias son aún desconocidas (Garnier et al., 2003). Debe recordarse que *M. bovis* (bacilo de Calmette-Guérin) fue el único progenitor de la única vacuna que hasta la actualidad existe contra la TB en humanos, cepa que fue atenuada por medio de pases en medios de cultivo coagulado a base de rebanadas de papa y bilis con glicerol durante 13 años. Las mutaciones exactas que provocaron la atenuación del bacilo aún se desconocen, aunque se piensa que una mutación clave (RD1) parece estar involucrada (Garnier et al., 2003; Hewinson et al., 2006).

Las micobacterias del complejo *M. tuberculosis* son pequeños bacilos delgados, de forma ligeramente curvada, con una longitud que oscila entre 1 y 4 micras. Son aerobios estrictos, inmóviles, de crecimiento muy lento subordinado a la presencia de oxígeno (tiempo de duplicación de 20-22 h a una temperatura máxima de 35-37°C a un pH de 7 a 7.2), de requerimientos nutricionales estrictos (medio de cultivo: huevo, glicerol, asparagina, citrato de magnesio y piruvato, según sea el caso), sensible a la luz solar, calor y desecación, resistente al frío, la congelación y a la desecación; son no formadores de esporas, gram-positivo no ramificados, y acidorresistentes (**Figura 4**); por lo que habitualmente no son visualizados en muestras procesadas de forma rutinaria.

La característica de ácido-alcohol resistencia de *M. bovis* se debe al alto contenido de lípidos de alto peso molecular en la pared celular (20-40%), principalmente al ácido micólico (Valenzuela et al 1993; Carter y Chemgappa, 1994; Caminero, 2003). La constitución de la pared celular de los bacilos del complejo *M. tuberculosis* es una de las más complejas entre los microorganismos conocidos. Es dos veces más gruesa y fuerte que la de los gérmenes gram-

negativos y constituye una verdadera coraza lipídica difícilmente penetrable. Esta coraza otorga a la micobacteria su típica resistencia a la acción del alcohol y los ácidos. Los principales componentes de dicha pared son peptidoglicanos y ácidos micólicos unidos entre sí por medio de enlaces covalentes: D-arabino-D-galactán. Además posee un alto contenido de glicolípidos, en particular α - α' -trehalosa dimicolato (TDM) y α - α' -trehalosa monomicolato (TMM). La propia caseificación no le permite la capacidad de producir toxinas, por lo que carece de toxicidad primaria (Curtis, 1990).



(Araujo, 2004)

Figura 4. Estructura general de un *Mycobacterium*.

Ante circunstancias metabólicas adversas (baja tensión de oxígeno y pH bajo), el bacilo entra en un estado latente o durmiente, pudiendo demorar su multiplicación desde varios días hasta muchos años. Este estado de latencia es también uno de los condicionantes de la perpetuación de la endemia (Caminero, 2003). En estudios experimentales en Australia se demostró que *M. bovis* sólo sobrevive por cuatro semanas en suelos húmedos a la sombra y en la oscuridad (Duffield y Young, 1985; O'Reilly y Daborn, 1995).

2.3. Patogénesis de la enfermedad.

En el estudio de la epidemiología de la TB se deben incluir dos grandes apartados, la cadena epidemiológica de transmisión y el análisis detallado de cómo se encuentra la endemia en el mundo; así como los factores que pueden influenciar su comportamiento (Nau et al., 2000; Kato-Maeda et al., 2001). La cadena epidemiológica de transmisión de la TB necesita de un agente causal (complejo *M. tuberculosis*), de un reservorio (hombre o animal infectado) que potencialmente pueda transformarse en fuente de infección (humano o animal enfermo) de un mecanismo de transmisión (aerógeno) y de un huésped susceptible de enfermar (Valenzuela et al., 1993).

La enfermedad se adquiere por la inhalación de partículas menores de cinco micras (gotas de flügge), las cuales contienen entre 1 y 400 células de *Mycobacterium* y se transmite al toser, hablar y estornudar. Los ambientes con ventilación deficiente que impiden la dilución de las gotas con microorganismos tienen mayor potencial de infección. La lesión primaria ocurre en el parénquima pulmonar en más del 95% de los casos por ser la inhalación el principal medio de contagio, pero esta lesión puede presentarse en cualquier parte del organismo. Las personas que se exponen por primera vez al bacilo presentan una acumulación de polimorfonucleares, seguida por proliferación de células epitelioides que integran el típico tubérculo. Luego aparecen las células gigantes y toda el área es rodeada por linfocitos. Posteriormente, los bacilos tuberculosos son transportados por los macrófagos hacia los ganglios linfáticos broncopulmonares, cuando el foco de infección está en el parénquima pulmonar; una vez el foco se encuentra en el vértice pulmonar los bacilos son transportados a los ganglios paratraqueales (Caminero, 2003).

La lesión primaria progresa en un tiempo de 2 a 10 semanas, tiempo en que se desarrolla la hipersensibilidad de los tejidos al microorganismo. La lesión de la

tuberculosis pulmonar primaria evoluciona generalmente hacia la curación con caseificación y calcificación posterior. Sin embargo, la lesión puede continuar avanzando y provocar neumonía en el parénquima circundante, así como extenderse a la pleura. También puede licuarse el centro caseoso y vaciarse hacia un bronquio, determinando la formación de una nueva caverna o de nuevas áreas neumónicas. La diseminación sanguínea se presenta con mayor frecuencia durante la fase de caseificación y puede producir lesiones miliares diseminadas que pueden afectar ojos, pulmones, huesos, riñón, cerebro, bazo o hígado. Los ganglios linfáticos regionales involucrados en la lesión primaria tienden a cicatrizar espontáneamente, pero los bacilos tuberculosos pueden persistir durante años. La mayor parte de las complicaciones de la tuberculosis primaria aparecen durante el primer año de infección, después son poco frecuentes y es en la etapa de adolescencia o en el adulto joven cuando se presenta la re-infección (Caminero, 2003).

2.4. Infección bovino-humano.

En otros tiempos *M. bovis* fue el principal agente etiológico de la tuberculosis en países industrializados (Gibson et al., 2004). En la actualidad, existe poca evidencia de la participación e importancia de *M. bovis* en el problema de la tuberculosis humana en Latinoamérica (Esteban et al., 2005). Nunca se ha establecido con precisión la proporción de casos de TB humana causada por *M. bovis*, en especial porque la mayoría de las pruebas de diagnóstico se basa en la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente en esputo y el cultivo no siempre culmina en tipificación. También porque para el cultivo se utiliza el medio de Löwenstein-Jensen con glicerol, sin piruvato, condición difícil para que *M. bovis* crezca. Sin embargo, en otros países y a través de la historia se han hecho trabajos que permiten tener una idea clara e histórica del papel de *M. bovis* en el problema de la tuberculosis humana (Thoen y Steele, 1995) (**Cuadros 1 y 2**). Actualmente se indica que *M. bovis* es patógeno para humanos (Smith et al., 2001), pero que su patogenicidad es menor que la de *M. tuberculosis*, sin

embargo, es claro que puede causar TB pulmonar, y esputo positivo (Cotter, et al., 1996; Danker y Davis, 2000; Winters et al., 2005), por lo que potencialmente puede transmitirse entre humanos (Gibson et al., 2004).

Aunque a primera vista pareciera ser irrelevante, el bacilo involucrado en la infección es importante. En un estudio realizado en el municipio de San Diego, California se comparó el tiempo de tratamiento requerido por cada una de las especies: *M. bovis* y *M. tuberculosis*. La conclusión fue que los tratamientos contra TB originada por *M. bovis* necesita en promedio 94 días más de tratamiento; Además, los decesos entre pacientes por *M. bovis* se presentaron con mayor frecuencia (LoBue y Moser, 2005).

Diferentes investigaciones han demostrado la importancia de *M. bovis* en el desarrollo de la TB en el humano, en la que *M. bovis* está involucrado en casos de TB primaria extrapulmonar (**Cuadro 1 y 2**); aunque la mayoría de los casos reportados fueron ocasionados por la exposición laboral a animales infectados (Moda et al., 2004; Gibson et al., 2004; Young and O`Connor, 2005).

En un estudio epidemiológico realizado en Dinamarca encontraron que el riesgo de que una persona adulta desarrolle tuberculosis pulmonar es inversamente proporcional a la prevalencia de tuberculosis bovina en esa área, sugiriendo esto un relativo efecto protector a la infección con *M. bovis*, en comparación con infecciones debidas a *M. tuberculosis* (Caminero, 2003). En otro estudio, en una comparación

Cuadro 1. Proporción de casos de tuberculosis humana en diferentes lugares del mundo donde se ha determinado a *M. bovis* como causante de la infección de TB humana.

País	Año	% TB por <i>M. bovis</i>	Tipo de TB
Alemania	1928	36	Abdominal
		25	Linfadenitis cervical
		21	TB lupus
		7	Meninges
		2	Huesos y articulaciones
Inglaterra	1937	85	Abdominal
		50	Linfadenitis cervical
		49	TB lupus
		25	Meningitis
		20	Huesos y articulaciones
Inglaterra	1938	24.6	Meningitis
		50	Adenitis
Escocia	1937	29.6	Meningitis
		51.6	Adenitis
Irlanda	1941	19.4	General
		24	Meningitis
		12	Adenitis
Irlanda	1950	0.1	Pulmonar
		3.4	Meningitis
		13.3	Adenitis
		3.5	Huesos y articulaciones
		6.2	Gástrica
Australia	1953-1981	87 casos	77 % pulmonar
India	1963	3	General
Canadá	1964-1970	0.5	42% pulmonar
Alemania	1958-1962	15	General
Argentina	1977-1989	2.7	General
Argentina	1977-1992	54 casos	81% pulmonar
Irlanda	1982-1985	0.9	Pulmonar
		50	Pulmonar
Irlanda	1986-1990	20	Linfadenitis
		20	Pleura
Perú	1986	4.4	Pulmonar
Argentina	1990	0.4 – 6.2	Esputo
Egipto	1991	6	General
Argentina	1992	0.6	General

(Francis, 1950; Torning, 1965; Huiteman, 1969; Schliesser, 1986; Lutz, 1987; Dupon and Ragnaud, 1992; Hardie and Watson 1992; Sauret et al.,1992; Daborn and Grange, 1993; Grange and Yates, 1994; Thoen and Steel, 1995).

de familias de ranchos con alta proporción de vacas rectoras a la tuberculina con familias de ranchos con vacas limpias, mostró que las primeras tuvieron un 75% de retores a la tuberculina y que las segundas sólo un 15%; aunque no se determinó la vía de infección (Roberts, 1986). ESPACIADO DEL PARRAFO

Cuadro 2. Registro de casos de tuberculosis humana de origen bovino en diferentes países europeos.

País	Año (s)	Casos	Casos Total bovinos	Total Casos %	Pulmonar %	No Pulmonar %
Alemania	Antes de 1957	7019	739	10.5	3.6	21.1
Reino Unido	Antes de 1957	2947	137	4.7	.2	14.1
Dinamarca	1944 – 1950	1203	67	5.6	4.6	12.1
Francia	1951 – 1965	3150	155	4.3	1.6	17.9
Polonia	1953 – 1962	1 188	2	1.1	NA	NA
Hungría	1956	2544	251	9.9	NA	NA
Suiza	Antes de 1957	151	40	-	-	26
Checoslovaquia	1961	437	34	7.8	3.8	90
Turquía	1951 - 1957	3689	261	7.1	5.9	20

(Francis, 1950; Torning, 1965; Huiteman, 1969; Schliesser, 1986; Lutz, 1987; Dupon and Ragnaud, 1992; Hardie and Watson 1992; Sauret et al.,1992; Daborn and Grange, 1993; Grange and Yates, 1994; Thoen and Steel, 1995).

Gibson et al., (2004) observaron patrones idénticos compatibles con *M. bovis* en humanos y ganado bovino lechero. Los pacientes tenían contacto con ganado infectado, incluso un patrón de *M. bovis* en humano estuvo involucrado en un brote de TB en ganado, por lo que consideraron factible la transmisión de ganado a humano, sin embargo, también encontraron cepas de *M. bovis* que no se habían identificado en bovinos.

Un estudio en el estado de Querétaro reveló que el número de casos de TB humana incrementó en un 85% en tres años (de 114 casos en 1992 a 211 casos en 1995 con una población constante de 1,250,476) y que una de las ocupaciones mas frecuentemente reportadas por los casos fueron aquellas relacionadas con actividades de campo (Toledo, 1997). Actualmente se

considera más a los humanos como una fuente peligrosa de infección para ganado que viceversa (Thoen and Steele, 1995); varios casos de transmisión de *M. bovis* de trabajadores de ranchos a ganado han sido documentadas (Jensen, 1953; Huitema, 1969; Shliesser, 1986; Lutz, 1972; Torning, 1965). En Argentina Fernández y Morici (1999), reportaron dos casos de tuberculosis en gatos por *M. bovis* adquirida por consumo de pulmón de bovino contaminado. Aunque la infección a humanos ocasionada por otros animales que no sea ganado es poco común (Caminero, 2003).

En conclusión, el riesgo de transmisión de TB del bovino al humano ha sido reconocido desde hace mucho tiempo (**Cuadros 1 y 2**); de ahí que se haya implantado la práctica de pasteurización de la leche como rutina para eliminar al agente etiológico en todo el mundo, lo que favoreció mucho la disminución de TB (Cotter et al., 2004).

Algunos autores resumen la posible transmisión de *M. bovis* del bovino al humano en tres puntos:

- a)** dado que la tuberculosis se transmite principalmente por vía aérea, el personal que trabaja con bovinos es susceptible a adquirir la enfermedad (Valenzuela et al, 1993).
- b)** una baja aparente de la incidencia de tuberculosis bovina en humanos es más bien el resultado del sub-reporte, debido a que son escasos los laboratorios que hacen tipificación de especie (Toledo et al, 1999).
- c)** aunque la transmisión de *M. bovis* entre humanos se considera como un suceso raro, existe evidencia en la literatura de que el bacilo bovino, *M. bovis* es transmitido entre personas, y de éstas pasa a los animales, donde el humano actúa como reservorio y fuente de bacilos. (Thoen and Steele, 1995; Gibson et al., 2004; CDFA/AHFSS, 2007).

2.5. Infección humano-bovino

La mayoría de los médicos veterinarios en la actualidad coinciden en afirmar que existe mayor riesgo de infección del humano al bovino que al contrario, varios casos de transmisión de *M. bovis* de trabajadores de establo al ganado han sido documentados (Thoen and Steele, 1995). Aunque la mayor parte de las infecciones se hace por la vía respiratoria, la vía urinaria ha sido identificada como una forma común de infección por micción de los trabajadores en las camas de los animales. Estos resultados plantean la necesidad de una revisión metódica de los trabajadores de los establos para eliminar esa posible vía de re-infección de los animales en las explotaciones pecuarias, especialmente cuando los programas de control han tenido éxito y la incidencia de la enfermedad ha sido llevado a un nivel cercano al cero (Nelson, 1999, Ottenhoff et al., 2005).

2.6. Transmisión humano-humano

Las infecciones pulmonares por *M. bovis* o por *M. tuberculosis* en humanos son indistinguibles, clínica, radiológica y patológicamente, aunque se ha sugerido que *M. bovis* es poco aislado de casos de tuberculosos porque el organismo tiene poca incidencia a reactivarse después de una infección primaria. Sin embargo, se afirma que una vez establecida la infección en el pulmón humano, *M. bovis* es tan virulento como *M. tuberculosis*. Los riesgos relativos estimados de desarrollo a TB activa en humanos de *M. tuberculosis* en relación con *M. bovis* son de 7.3 en áreas urbanas y de 12.5 en áreas rurales. La mayoría de los informes invariablemente concluyen que la transmisión de infección por *M. bovis* entre humanos es poco frecuente en comparación con la transmisión de *M. tuberculosis* (Caminero, 2003), debido a que *M. bovis* es principalmente extrapulmonar.

Se reporta que 29% de contactos en vivienda de granjeros con infección pulmonar activa por *M. tuberculosis* desarrollaron TB, comparado con 13% de

granjeros con tuberculosis pulmonar activa causada por *M. bovis*. Se cree que los casos de tuberculosis humana por *M. bovis* se adquieren directamente del ganado y no de otros humanos, pero se han registrado casos de la transmisión humano-humano; sin embargo, el microorganismo causal de la TB no ha sido investigado en detalle (Thoen y Steele, 1995).

Gibson et al., (2004) reportaron un caso presentado en Reino Unido en 1999 de transmisión de *M. bovis* entre dos hermanos de 17 y 20 años (masculino y femenino, respectivamente). El padre tenía un establo y el hijo ocasionalmente lo ayudaba en el manejo del ganado, quien probablemente pudo adquirir la infección por aerosoles de secreción nasal bovina. La mujer nunca tuvo contacto directo con el ganado, sin embargo, vivía con el hermano, además de que estaba embarazada y tenía diabetes. Años atrás se detectó un brote de TB en ganado y resultó ser el mismo espoligotipo que el de los hermanos.

El sub-reporte se menciona con frecuencia como una de las principales razones por las que se considera que *M. bovis* tiene poca relevancia en el problema de tuberculosis humana. Esta deficiencia en el informe se ha presentado a lo largo de la historia de la tuberculosis mundial (Thoen y Steele, 1995). Esto ha sido derivado de trabajos que reportan casos de TB en humanos por *M. bovis* tanto en niños como en adultos (Danker, et al., 1993; Thoen y Steele, 1995).

2.7. Diagnóstico de la Enfermedad

El diagnóstico de la tuberculosis pulmonar en los países en desarrollo depende principalmente de la microscopía directa del esputo o la baciloscopia (Figura 5), (BAAR: Presencia de bacilos Acido-Alcohol resistentes), utilizando la técnica de coloración de Zielh-Neelsen, la cual es sencilla, rápida y económica, pero de baja sensibilidad (65%) (Betancourt et al., 2002). Los resultados con esta prueba son

variables, dependiendo de la calidad de la muestra y de la cantidad de bacilos presentes. La especificidad de la baciloscopía, a pesar de ser alta, tiene el problema de que la ácido-alcohol resistencia es característica de todas las especies del género *Mycobacterium*; principalmente en muestras de orina puede dar falsos positivos, debido a la presencia de saprófitos y otras bacterias que no pertenecen al complejo de *M. tuberculosis* (Krunner, 2007). Además de que la mayoría de la población infectada presenta bacilos viables sin presentar síntomas de enfermedad (Enarson, 2000). Sin embargo, la prueba de BAAR tiene una importancia vital en términos de salud pública, ya que localiza los casos contagiosos de la comunidad y, por lo tanto ofrece la posibilidad de eliminar las fuentes infectantes mediante la terapéutica (Cedeño, 2004).

En general, se considera que deben existir entre cinco mil y diez mil bacilos ácido resistentes por mililitro de expectoración para que exista un 50% de posibilidades de ser detectados al microscopio; sólo cuando el número de estos bacilos es superior a 10,000 por mililitro de expectoración, se espera que las baciloscopías sean consistentemente positivas (Montoto, 2005). Por lo tanto, a pesar de los esfuerzos por controlar esta patología, siempre existirán casos nuevos, ya que aquellos pacientes con tuberculosis pulmonar que presenten una baja tasa de eliminación de bacilos en su expectoración no serán detectados por este método de diagnóstico y podrían transmitir la enfermedad (Cedeño, 2004; Báez et al., 2003).

Ocasionalmente, cuando en tinción a Zielh-Neelsen se tiene un resultado negativo, pero hay sintomatología de TB pulmonar, se recurre a los rayos X de Tórax. Sin embargo, en casos de enfermedad asociada con VIH y/o Diabetes, las placas radiográficas muestran localizaciones atípicas de las lesiones, lo que no permite culminar en un diagnóstico adecuado (Sevim et al., 2007).



Figura 5. Bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* con tinción de Zielh-Neelsen, 100X.

El cultivo de las micobacterias es el único método que puede asegurar un diagnóstico de certeza de TB, y el único que es completamente válido para evaluar el seguimiento del enfermo y asegurar la curación (Betancourt et al., 2002; Balasanghameshwara, 2007). A diferencia de la baciloscopia, los cultivos son mucho más sensibles, pudiendo detectar una cantidad tan pequeña como 10 bacterias por ml de muestra; no obstante, es un proceso tardado por la lentitud de la división celular de la micobacteria (Valverde, 1999, Betancourt et al., 2002).

En general la baja positividad de los cultivos se explica por el hecho de que el bacilo tuberculoso no se replica bien en lesiones sólidas, caseosas y no licuefactas. Esto debido a que estas zonas mantienen bajas tensiones de oxígeno, tienen un pH ácido y hay ácidos grasos que inhiben la replicación del bacilo. Por ello las lesiones caseosas, tales como las lesiones de la enfermedad de Pott, sólo contienen de 10^2 a 10^5 bacilos tuberculosos; y, por lo tanto, sólo un 50% de las lesiones caseosas cultivan el bacilo de Koch. El bacilo tuberculoso se multiplica menos en el tejido fibroso y calcificado, creciendo en un 15% de estas lesiones, puede vivir en el caseum sólido por años sin tener mayor crecimiento, insensible a la quimioterapia, manteniéndose en condición latente. En general, excepto por las lesiones renales tuberculosas, la TB extrapulmonar se caracteriza por un bajo número de bacilos. En particular los nódulos linfáticos

tuberculosos poseen pocos bacilos, reflejado por la baja presión parcial de oxígeno en esta zona (Valverde, 1999).

El diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar depende de la probabilidad de encontrar los bacilos en los sitios de infección. Las biopsias del tejido pueden rendir resultados positivos en comparación a los fluidos en donde el número de bacilos se ve disminuido por la dilución. El diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar es difícil a menudo por su localización en sitios del organismo de acceso complicado, además el carácter serio de esta forma de tuberculosis se debe frecuentemente a su diagnóstico tardío (Llaca, et al., 2003). Los métodos de PCR son más sensibles que los cultivos y los resultados se obtienen más rápido. Sin embargo, a razón de resultados falsos positivos ocasionales, el cultivo continúa siendo el principal elemento para establecer el diagnóstico definitivo de la enfermedad (Betancourt et al., 2002).

Un trabajo realizado por Estrada y colaboradores (2004) en el que realizaron una comparación entre el PCR y el cultivo para detección de TB, encontraron 53% de sensibilidad y 88% de especificidad, mientras que la PCR anidada mostró 100% de sensibilidad y 77% de especificidad. La principal ventaja de la PCR anidada es que puede permitir la confirmación del diagnóstico de TB en 24 horas. La técnica de PCR permite la diferenciación entre especies debido a una delección en *M. bovis* en una región específica, RD5 (elemento *mtp40*), fragmento de 3 kb el cual codifica una sección de una enzima C-fosforilasa (Gordon et al., 1999). Este fragmento está ausente en la mayoría de los aislados de *M. bovis*, el cual permite distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis* (Liébana et al., 1996).

2.8 Sub-reporte de M. bovis como causa de TB en humanos

La aparente baja o casi nula incidencia de TB por *M. bovis* en el humano después de la instrumentación de programas de control puede ser más bien una falta de identificación de la especie causante de la infección, que una ausencia real de participación de *M. bovis* en la infección del humano. Una de las razones del nulo interés en la tipificación es el hecho de que la mayoría de los antibióticos usados para tratar la enfermedad son efectivos contra ambas especies, aunque debe recordarse que *M. bovis* es resistente a la pirazinamida, estreptomina e isoniazida y ocasionalmente fluoroquilona (como capreomicina, kanamicina, y amikacina) (Garnier et al., 2002; LoBue and Mosser, 2005; Winters et al., 2005; Kruuner, 2007). Sin embargo, en México desde 1996 que se implementó la estrategia TAES/DOTS, se aplica un tratamiento acortado (seis meses), el cual incluye: **Tratamiento intensivo:** rifampicina 600 mg, isoniacida 300 mg, pirazinamida 1,500-2000 mg y etambutol 1,200 mg. **Tratamiento de sostén:** isoniacida 800 mg y rifampicina 600 mg. Lo que puede traer como consecuencia que infecciones causadas por *M. bovis* no sean curadas; debido a que el tratamiento incluye dos antimicrobianos a los que generalmente *M. bovis* es resistente, además de que debido a que el tratamiento es por seis meses se tiene un elevado grado de incumplimiento. Esta situación favorece la aparición de cepas clínicas resistentes a una o más drogas. Estudios llevados a cabo durante los últimos años han identificado los blancos moleculares de las drogas corrientemente en uso y sus mecanismos de resistencia mas frecuentes (Morbidoni, 2004; Velasco et al., 2004).

En conclusión, las principales causas del sub-reporte de *M. bovis* son:

1. No se están buscando en los individuos con tuberculosis activa al bacilo *M. bovis*, puesto que la campaña se limita a diagnosticar y tratar a la tuberculosis causada por *M. tuberculosis*.
2. Básicamente el diagnóstico lo limitan a muestras de esputo, y por lo general, *M. bovis* es extrapulmonar, aunque también puede ser pulmonar.

3. El diagnóstico de tuberculosis se basa en el análisis clínico, epidemiología y observación directa de los bacilos ácido alcohol resistentes en la muestra. Rara vez llegan a realizar pruebas de sensibilidad, las cuales se realizan en medios que sólo favorecen el crecimiento de *M. tuberculosis*.
4. No se realiza tipificación de la cepa causante de la enfermedad, lo que pudiera estar ocasionando la resistencia de los casos.

Desde el punto de vista global de la prevalencia de tuberculosis y considerando el fuerte impacto por zoonosis de *M. bovis*, existe la urgente necesidad de involucrar técnicas de diagnóstico rápido, que permitan caracterizar y tipificar genéticamente al bacilo tuberculoso independientemente de que éste sea viable o no; determinar la carga bacteriana por mililitro de muestra en pacientes que se encuentran en control y facilitar los estudios epidemiológicos con el objetivo de identificar la fuente de infección y por lo tanto facilitar o mejorar las estrategias de control para ambas micobacterias (Kumar et al., 2004).

2.9. Tipificación de especies

Para lograr un mejor entendimiento de la naturaleza, la distribución y el comportamiento epidemiológico de *M. bovis* en la población animal y humana, es necesario que todos los bacilos tuberculosos aislados de casos humanos sean identificados y tipificados (Szewzyk, 1995; Scorpio 1997; Nitta et al., 2002; Gibson et al., 2004). La tipificación de especies, y de cepas dentro de las especies de micobacterias no es común en el diagnóstico rutinario de tuberculosis ni en humanos ni en bovinos. La diferenciación entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* se basa, inicialmente en las características del cultivo y en la morfología de la colonia, así como en el crecimiento lento y escaso de *M. bovis*. Las pruebas bioquímicas, son laboriosas y no se realizan en la mayoría de laboratorios. Estas pruebas se basan en la ausencia de producción de niacina y la no reducción de nitratos, además de que a diferencia de *M. tuberculosis*, el

crecimiento de *M. bovis* es inhibido por la TCH (hidracida del ácido tiofeno-2-carboxílico), *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida y tiene una actividad pirazinamidásica deficiente (**Cuadro 3**). Sin embargo, los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales son a menudo ambiguos, difíciles de reproducir y el tiempo requerido para su realización es largo dado a que requieren crecimiento abundante (Thoen y Steele, 1995; Gibson et al., 2004).

Afortunadamente existen nuevas herramientas que han demostrado ser útiles en el estudio de la epidemiología de la micobacteria (Thoen y Steele, 1995; Gibson, et al., 2004). Entre otras, las técnicas moleculares han demostrado ser eficaces en la diferenciación de cepas, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis* en varios estudios epidemiológicos (Van Embden et al., 1993; Romano et al., 1996; Caminero, 2003; Szewzyk et al., 1995; Gibson et al., 2004; Montoto, 2005).

Cuadro 3. Características bioquímicas de los bacilos *M. bovis* y *M. tuberculosis*.

Bacilo	Preferencia de Oxígeno	Nitrasa	Sensibilidad		Niacina	Reducción Nitratos	Formación Cordón	Ac. Tiofen-2-carboxílico /hidracida
			TCH	PZA				
<i>M. tuberculosis clásico</i>	Aero	+	Res	Sens	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis asiática</i>	Aero	+	Sens	Sens				
<i>M. bovis</i>	Micro	—	Sens	Res	—	—	+	—
Vacuna BCG	Aero	—		Res				

Aero= Aeroilico, Micro= Microaeroilico, TCH= hidracida, tiofen 2-ácido carboxílico, PZA=pirazinamida.
 — = negativo (ausencia o inhibición); + = positivo (producción o crecimiento). (Carter y Chengapa, 1994; Grange y Yates, 1994).

2.10. Técnicas de biología molecular en la diferenciación de especies.

La aplicación de técnicas de biología molecular en la identificación de micobacterias aisladas a partir de medio líquido o sólido permiten establecer diagnósticos más rápidos y fiables que las pruebas bioquímicas, sin embargo, generalmente es necesario el aislamiento. La mayor parte de las técnicas

moleculares se basan en una amplificación del ADN bacteriano mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de secuencias génicas específicas de especies del género *Mycobacterium*. Estas secuencias son de utilidad para distinguir miembros del complejo *M. tuberculosis* de otras micobacterias, pero también para diferenciar entre ellos, debido a la invariabilidad genérica de los loci más frecuentemente usados como blanco. Se han desarrollado también técnicas de PCR que detectan una mutación puntual en el gen de la enzima pirazinamidasa (*pncA*), ausente en *M. bovis* lo que da lugar a resistencia a la pirazinamida; sin embargo se han descrito subtipos sensibles a este medicamento (Sechi et al., 1999; Sales et al 2001).

Se han evaluado diversos métodos moleculares para identificar las diferentes especies que integran el complejo *M. tuberculosis*. Las técnicas basadas en PCR seguida de análisis de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism) son el método de diferenciación para identificar cepas individuales de *M. tuberculosis*. La secuencia de inserción IS6110, altamente conservada en el ADN de las micobacterias pertenecientes al complejo, presenta numerosas copias en el cromosoma de *M. tuberculosis* (10-20), en localizaciones muy variables, mientras que *M. bovis* se caracteriza por contener únicamente entre una y cinco copias. Estas técnicas por sí solas no pueden ser utilizadas eficientemente para clasificar taxonómicamente los miembros del complejo *M. tuberculosis*. Las cepas con escaso número de copias deben ser tipificadas por la técnica de spoligotyping (Spacer Oligonucleotide Typing) (Bunschoten et al., 1996; Kamerbeek et al., 1997)

Spoligotyping detecta la presencia o ausencia de secuencias espaciadoras dentro de la región DR (Direct Repeat Locus), en esa región se inserta el elemento IS6110. El spoligotyping consiste de una simple PCR que se basa en la amplificación *in vitro* del ADN en los espacios entre repeticiones directas (RD)

de un *locus* único y altamente polimórfico presente en el cromosoma de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Esto favorece que se pueda utilizar directamente el ADN de la micobacteria en el tejido. La región DR que flanquea al IS6110 contiene múltiples secuencias repetidas de 36 pares de bases (pb), con sus espacios inter-secuencia de una longitud de 35 a 41 pb. El producto de la PCR de cada aislado individual se le permite hibridarse a 37 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* H37Rv y seis secuencias espaciadoras de *M. bovis* BCG P3 (Kamerbeek et al., 1997) previamente fijadas a una membrana de nylon. Después de la hibridación, la detección de secuencias espaciadoras comunes al aislado en estudio pueden ser identificados. Por lo tanto, la técnica, a la vez que hace el diagnóstico de la presencia del agente etiológico, también permite la tipificación de las cepas individuales mediante las huellas genómicas o fingerprints. La utilidad de spoligotyping y sus aplicaciones en estudio de la tuberculosis han sido ampliamente discutidos (Rigouts et al., 1996; Aranáz et al., 1996; Cousins et al., 1998; Perumaalla et al., 1999; Zumárraga et al., 1999; Ostrosky-Zeichner et al., 2000; Lobato et al., 2000; Lo Bue et al., 2003; Danker et al., 1993; Zink et al., 2003; Gibson et al., 2004; Kumar et al., 2004; Lo Bue and Moser, 2005; Palma y Bocanegra, 2007; Taylor et al., 2007).

El mayor conocimiento de la epidemiología de la tuberculosis en las poblaciones, tanto animales como humanas, tiene como objetivo detectar los eslabones de la cadena donde los efectos de una intervención puedan ser mayores. Por tanto, una de las prioridades en el estudio de la tuberculosis debe ser el de la determinación del papel de la tuberculosis bovina en el problema de la tuberculosis humana y del papel del humano en la persistencia de la enfermedad en las explotaciones pecuarias, especialmente en aquellas que con programas de control reducen la incidencia al máximo, para encontrar que al paso del tiempo, sin una explicación lógica, nuevamente tienen la enfermedad (Gibson et al., 2004; Hewinson et al., 2006).

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *M. bovis* en infecciones tuberculosas en humanos y la similitud genética de estas cepas con aquellas obtenidas del ganado como indicativo de transmisión bovino-humano en una zona de alta prevalencia

3. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis humana es un problema creciente desde finales de los 80´s, la presencia de enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la Diabetes mellitus, la pobreza y la drogadicción han favorecido su crecimiento. En el caso de ganado lechero, la prevalencia oficial de TB es del 16%, la cual puede ir hasta niveles del 60% en algunos hatos. La leche que se produce en México no toda va a pasteurización, aproximadamente el 30% se vende como leche cruda, lo que representa un riesgo potencial para la salud pública. Varios reportes evidencian que el consumo de productos de origen animal es responsable de brotes y desarrollo de tuberculosis en humanos. Por ejemplo, se reporta recientemente un brote de tuberculosis en niños en la Ciudad de Nueva York, en los Estados Unidos de Norteamérica, a consecuencia del consumo de queso fresco. Situaciones similares se mencionan en San Diego, Los Ángeles, Chicago y Denver, también en ese país, donde la mayoría de los casos son hispanos de origen mexicano. Estadísticas actuales en México demuestran que la proporción de tuberculosis pulmonar va disminuyendo mientras que la extrapulmonar se va incrementando, situación relevante puesto que las infecciones con *M. bovis*, el agente etiológico de la enfermedad en el ganado, son de tipo extrapulmonar. No obstante, ni en México ni en el mundo existe ningún trabajo que de manera específica documente el papel que la tuberculosis del ganado tiene sobre la tuberculosis humana. Por lo tanto, con la comparación molecular de cepas de *M. bovis* de origen bovino y humano en una misma región geográfica de alta prevalencia de la enfermedad en el ganado, se busca generar información que ayude a entender mejor la epidemiología de la tuberculosis en el país.

4. HIPÓTESIS

La presencia de *M. bovis* en zonas de alta prevalencia de tuberculosis en el ganado tiene repercusiones en la epidemiología de la presentación de casos de tuberculosis humana, y representa por lo tanto, un riesgo para la salud pública.

5. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la presencia de *M. bovis* en infecciones tuberculosas en humanos y la similitud genética de estas cepas con aquellas obtenidas del ganado como indicativo de transmisión bovino-humano en una zona de alta prevalencia.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener muestras clínicas de individuos sintomáticos de tuberculosis referidos al laboratorio estatal de diagnóstico del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) ubicado en la ciudad de Querétaro.
2. Obtener muestras de esputo y orina de trabajadores (corraleros y ordeñadores) de ranchos lecheros (establos) en la zona periférica de la ciudad de Querétaro, en un diámetro aproximado de 100 km.
3. Determinar patrones moleculares (fingerprints) de *M. bovis* a partir de cultivo y directamente del tejido de todas las muestras por medio de spoligotyping.
4. Comparar patrones moleculares de muestras de *M. bovis* obtenidas de humanos con aquellas obtenidas del ganado en la misma región geográfica.
5. Determinar la proporción de cepas de origen humano que tienen una similitud genético-molecular con cepas de origen bovino en una misma región geográfica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una zona endémica de tuberculosis del estado de Querétaro. Dicha zona cuenta con aproximadamente 277, 716 cabezas de ganado, de los cuales 206,374 (74%) son de ganado especializado en carne y 71,342 (26%) de ganado especializado en leche (SIACON, 2006).

En cuanto a la población, Querétaro cuenta con un total de 1, 598 139 personas, 70% de la cual vive en zonas urbanas y el resto en zonas rurales (Censo INEGI, 2005). La tasa de incidencia anual de tuberculosis en la población es de 14.2 por cada 100,000 habitantes (Secretaría de Salud del Estado de Querétaro, 2004).

6.1 Muestras de humanos.

El problema de la tuberculosis en animales se centra en el ganado especializado de la producción de leche, el cual se ubica en establos localizados en la periferia de la ciudad de Querétaro. Para cumplir con el objetivo del estudio, este se dividió en dos partes. En la primera parte se colectaron muestras de esputo, orina, líquido cefalorraquídeo, jugo gástrico, y otros de pacientes sospechosos de tuberculosis enviados al laboratorio de diagnóstico del estado de Querétaro, entre enero del 2006 y febrero del 2007. Posteriormente, en un proceso activo, se colectaron muestras de esputo y orina de trabajadores de establos (corraleros y ordeñadores) de la región lechera del estado, en una zona aproximada de 100 km alrededor de la ciudad de Querétaro, donde se concentra la mayoría de los establos lecheros. El muestreo se realizó con autorización de los dueños o encargados de los establos, previa presentación de los objetivos y procedimientos del proyecto. Las condiciones para el permiso fue la confidencialidad de la información relacionada con las personas y establos participantes.

La colecta de las muestras se realizó con base al Manual de Procedimientos del Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis (Sector Salud México, 1996). Inmediato a la colecta, las muestras se identificaron y se depositaron en hieleras con refrigerantes para su conservación y transporte a las instalaciones del laboratorio de diagnóstico del IMSS en la ciudad de Querétaro. Ahí las muestras fueron procesadas de manera inmediata para evitar que la alcalinidad de la orina afectara a las micobacterias en caso de que estas estuvieran presentes (Maxine, 1991).

6.2 Prueba de BAAR

Las muestras obtenidas de empleados de ranchos se trabajaron por pool, es decir, las tres muestras de cada individuo se fusionaron en una sola para su análisis microbiológico y molecular. Todas las muestras, tanto de pacientes sospechosos como las de trabajadores de establo siguieron el mismo tratamiento, donde primero se analizaron para detectar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes y después se sembraron en medios de cultivo para intentar el aislamiento. Finalmente fueron sometidas a pruebas de PCR como se describe en párrafos posteriores (anexo I).

6.3 Aislamiento

Sin considerar el resultado a la prueba de BAAR, todas las muestras se sembraron en medios sólidos: Löwenstein-Jensen con glicerol y Stonebrink adicionado con piruvato de sodio como fuente de carbono, donde el primero favorece el crecimiento de *M. tuberculosis*, y el segundo el de *M. bovis*. Para el aislamiento se siguió la técnica de petrof modificada (anexo II).

6.4 PCR

Posteriormente se procedió a extraer el ADN directamente del tejido y también de los aislados (anexo III, IV y V). Una vez obtenido el ADN, este se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1%, para confirmar su presencia. En seguida se realizaron tres pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar determinados fragmentos del ADN de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* (anexo VI). Estas pruebas fueron:

- a) **PCR cyb**: para descartar la presencia de inhibidores de la PCR y demostrar la viabilidad del ADN se realizó una PCR control con oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 375 pares de bases (pb) del gen *cyb*, que codifica para el gen de citocromo b(CYB1
5' CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3' y CYB2 5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA3') en el ADN mitocondrial. Sólo a las muestras positivas se le realizó una segunda PCR (ver anexo IV).
- b) **PCR₁ (simple)**: esta prueba se hizo para determinar la presencia de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* mediante la amplificación de un segmento de 372 pb del gen MPB70 (TB1F 5' GAA CAA TCC GGA GTT GAC AA 3' y TB1R 5' TAC ATG ATT GAC AGC GTG CT 3'). Nuevamente sólo a las muestras positivas a esta prueba se le hizo una tercera PCR (ver anexo IV).
- c) **PCR anidada**: con una décima parte del producto obtenido se amplificó un fragmento de 208 pb del gen MPB70, dentro de la región de 372 pb, mediante una PCR anidada con los oligonucleótidos (M22/3 5' GCT GAC GGC TGC ACT GTC GGGC 3' y M22/4 5' CGT TGG CCG GGC TGG TTT GGC C 3'), utilizando una misma temperatura de re-asociación y extensión (Estrada et al., 2004) (ver anexo IV). Finalmente, para confirmar que se obtuvo producto amplificado se corrieron geles de agarosa al 2.5%.

La PCR anidada se hizo para confirmar la presencia de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* en las distintas muestras (orina, esputo, jugo gástrico, etc.). Esta PCR amplifica el gen que codifica la MPB70 (una de las proteínas de excreción).

6.5 Espoligotipificación.

Las muestras que fueron positivas a la prueba de PCR anidada, se utilizaron para el análisis por spoligotyping. Para ellos se amplificó la región DR, utilizando los primers descritos por Kamerbeek et al., (1997). Los primers están basados en las secuencias de dicha región y permite la amplificación de los espaciadores entre las regiones estables de DR. Los oligonucleótidos derivados de los espaciadores conocidos en el cluster DR están covalentemente unidos a una membrana activada con biotina C en líneas paralelas y los productos de la PCR son hibridados perpendicularmente a estas líneas. Posterior a la hibridación, la membrana es incubada en streptavidin peroxidasa, en la cual los productos de la PCR se unen a la línea de biotina. La detección de las señales de hibridación es hecha por medio de un sistema de detección. La peroxidasa presente en la streptavidina cataliza una reacción resultando en la emisión de luz, la cual puede ser detectada por una radiografía de la membrana (ver anexo VII).

6.6 Muestras de bovinos.

La segunda parte del trabajo correspondió a la colecta de muestras de tejido bovino con lesión aparente de tuberculosis en el rastro Municipal de la ciudad de Querétaro, donde se sacrifica la mayor parte del ganado especializado en leche de la zona. Aquí se inspeccionaron los canales en busca de lesiones macroscópicas compatibles con tuberculosis lográndose obtener un total de 40 muestras de tejido con lesión. Todas estas muestras siguieron el mismo patrón que las muestras obtenidas de humanos.

Finalmente, los patrones compatibles con *M. bovis*, obtenidos de muestras de humanos se compararon con los obtenidos de las muestras de animales utilizando el programa SPSS 10.0 para la elaboración de un dendrograma. En el trabajo se incluyeron 29 patrones de tejidos bovinos también colectados en la misma zona, derivados de otro proyecto.

Para cada una de las muestras obtenidas, tanto de humanos como de bovinos, se obtuvo toda la información epidemiológica relacionada posible. Dicha información se capturó en formatos previamente elaborados para este fin en el software EPIINFO 3.2.2 para su almacenamiento y análisis (Anexo VIII).

6.7 Análisis estadístico.

Con la presencia (1) o ausencia (0) de bandas específicas (presencia o ausencia de espaciadoras) se elaboraron matrices de 0's y 1's, para posteriormente hacer comparaciones pareadas entre aislados a manera de obtener una matriz de distancia genética utilizando el método de Nei y Li (1979). La distancia genética se utilizó para hacer un análisis de clusters con el método UPGMA (Unweighted Pairwise Group Method Averages) en SPSS (ANALYZE del menú principal, utilizando la opción CLASSIFY con el método de agrupamiento de HIERARCHICAL CLUSTER, especificando en el recuadro de PLOT para la elaboración del DENDROGRAMA. LA comparación final de cepas de humanos y bovinos se hizo de manera visual.

7. RESULTADOS

El número total de muestras trabajadas fue de 513, 473 correspondieron a humanos y 40 a bovinos. En algunos de los análisis se utilizó también un total de 29 espoligotipos de bovino de una base de datos de nuestro laboratorio derivados de proyectos previos. De las 473 muestras de humano, 276 (58%) fueron de esputo, 179 de orina y 18 de diferentes tejidos. En la **figura 6** se muestra el municipio de origen de los diferentes aislados.

Del número total de muestras de humanos, 40% resultó positiva al menos a una de las 3 pruebas de diagnóstico utilizadas (BAAR, PCR y cultivo): 46 (10%) fueron positivas a BAAR, 124 (26%) fueron positivas a PCR y 25 (5%) fueron positivas al aislamiento (**Cuadro 4**).

De las muestras de esputo, 23 (8%) fueron positivas a BAAR, 80 (29%) fueron positivas a PCR (64 presentaron espoligotipo compatible con *M. tuberculosis* y 12 con *M. bovis*) y 4 (1%), a pesar de amplificar en la PCR, no proporcionaron un espoligotipo definido.

En el caso de las muestras de orina, 23 (13%) fueron positivas a la presencia de bacilos tuberculosos en la prueba de BAAR y 5 (3%) fueron positivos al cultivo. De los cultivos, 4 mostraron espoligotipo compatible con *M. bovis* y 1 compatible con *M. tuberculosis*. Un total de 41 (23%) muestras fueron positivas a PCR, de las cuales 29 (16%) mostraron un patrón compatible con *M. tuberculosis* y 10 (6%) compatible con *M. bovis*. Finalmente, de las 18 muestras varios se obtuvieron 2 (11%) aislados, los cuales dieron patrón de *M. bovis*. Por PCR anidado sólo se detectaron 3 muestras con patrón semejante a *M. tuberculosis* (**Cuadro 4**).

En resumen, de las 473 muestras de humanos se obtuvieron 25 aislados, 12 (2.5%) de los cuales mostraron espoligotipo compatible con *M. bovis*. Por otro lado, de las 124 muestras positivas a PCR, 22 (5%) mostraron espoligotipo de *M. bovis*. En conjunto, sumando los resultados de aislados y de PCR, se obtuvo un total de 34 (7%) espoligotipos de *M. bovis*.

De acuerdo con el origen de las muestras, 255 (54%) fueron muestras de esputo, orina, jugo gástrico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y exudados provenientes de pacientes sintomáticos de tuberculosis (**Cuadro 5**) y 218 (46%) fueron muestras de orina y esputo de empleados de explotaciones lecheras (corraleros, ordeñadores y otros) (**Cuadro 6**) sin síntomas aparentes de tuberculosis.

De las 255 muestras de pacientes sintomáticos, 174 (68%) fueron de esputo, 63 (25%) de orina y 18 (7%) de jugo gástrico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural y exudado. En este grupo el total de aislados obtenidos fue de 17, nueve (3.5%) de los cuales mostraron espoligotipo compatible con *M. bovis*. Un total de 67 muestras de este grupo fueron positivas a PCR, 8 de las cuales mostraron espoligotipo compatible con *M. bovis*. La mayor cantidad de muestras con espoligotipo de *M. bovis* provino de muestras de orina (**Cuadro 5**).

De las 218 muestras de empleados de ranchos, 102 (47%) fueron de esputo y 116 (53%) de orina. De las muestras de esputo se lograron 6 (3%) crecimientos, dos (1%) de los cuales correspondieron a *M. bovis*. De las muestras de orina se obtuvieron dos aislados, uno de los cuales correspondió a *M. bovis*. De los resultados de PCR, 32 provinieron de esputo, de los cuales 9 presentaron espoligotipo de *M. bovis*, mientras que de los de orina, 5 fueron

espoligotipificados como *M. bovis*. En resumen, de 218 muestras de esta población, 17 (8%) mostraron espoligotipo de *M. bovis* (**Cuadro 6**).

De las 40 muestras de tejido bovino con lesión sospechosa de tuberculosis colectadas en rastro se obtuvieron 16 aislados, varios de los cuales también proporcionaron ADN que fue analizado por PCR. Algunas muestras no fueron positivas al aislamiento pero si mostraron espoligotipo en la PCR del spoligotyping. De este grupo, 8 crecieron en Löwenstein-Jensen y 13 en Stonebrink. Cinco de estos últimos también crecieron en Löwenstein-Jensen. De los 16 aislamientos con espoligotipo de *M. bovis*, 7 también mostraron patrón cuando se trabajó por PCR del tejido directo. Aunque no fueron positivas al aislamiento, 7 muestras mostraron espoligotipo de *M. bovis* cuando se trabajaron por PCR. En resumen, de 40 muestras de bovino, 30 mostraron espoligotipo compatible con *M. bovis* (**Cuadro 7, Figura 9 y 10**).

La **figura 7** muestra la distribución de los grupos de espoligotipos de *M. bovis* generados por el análisis de clusters de SPSS de las muestras de pacientes con sintomatología de tuberculosis. En la figura se aprecia un total de 17 espoligotipos generados por muestras de pacientes (las muestras 39 y 62 representan dos patrones cada una) y dos (H37Rv y BCG) que fueron usadas como cepas de referencia. De los 17 espoligotipos, 7 fueron provenientes de esputo, 9 de orina y 1 de jugo gástrico. Excepto las muestras 424 con 362 y 483 con 482 que tuvieron sólo un espaciador de diferencia entre ellas, el resto mostró variabilidad de 3 o más espaciadores. En las columnas de la izquierda de la figura se agrega la información epidemiológica obtenida. Nueve de las muestras fueron de mujeres y 8 de hombres, con un promedio combinado de edad de 40 años.

Los 17 espoligotipos obtenidos de las muestras de trabajadores de establos lecheros y dos (H37Rv y BCG) que fueron usadas como cepas de referencia, se muestran en un dendrograma generado por SPSS en la **figura 8**. Excepto las muestras 316 y 356 que sólo fueron diferentes en la presencia de un espaciador, el resto mostró alta variabilidad genética: cinco de las muestras vinieron de orina y 12 de esputo. El promedio de edad en este caso fue de 33 años. La información epidemiológica relacionada con las personas que proporcionaron muestras se presenta en los **cuadros 8 y 9**.

En el dendrograma de la **figura 9** se muestra los resultados del análisis de clusters de una base de datos que incluyó tanto espoligotipos de *M. bovis* provenientes de pacientes sintomáticos de tuberculosis como de bovinos. Cinco muestras de origen bovino, agrupadas con el número 32, tuvieron idéntico espoligotipo al de dos muestras de humano, agrupadas en el número 62, pertenecientes a pacientes con síntomas de tuberculosis. De igual manera, el espoligotipo de tres muestras de bovino agrupadas en el número 2, fue idéntico a la muestra de humano 392, y sólo diferente en dos y un espaciador respectivamente con las muestras de bovino 17 y 18. La similitud de espoligotipos entre muestras de origen bovino y humano sugiere transmisión de tuberculosis del ganado al humano.

En el caso de los espoligotipos de *M. bovis* de empleados de rancho no se observó similitud genética con ninguno de los espoligotipos de ganado, aunque algunas de las diferencias fueron mínimas (**Figura 10**). Las muestras de humano identificadas como 316, 356, 293 y 295 pertenecen a la familia de un empleado de rancho quien solicitó se ampliara el muestreo por el antecedente de que su suegra presentó TB pulmonar, sin embargo, a éste empleado no se le detectó la presencia de la micobacteria. El rancho donde este empleado laboraba tenía a su vez el antecedente de que dos empleados que trabajaron toda su vida en dicho lugar fallecieron de tuberculosis.

En el **cuadro 8** se muestra la información epidemiológica que se logró obtener para los individuos de los cuales se pudo tipificar a la micobacteria como *M. bovis* a partir de los aislados obtenidos o de las muestras directas. No hubo diferencia de sexo y una alta proporción está asociada a actividades de contacto directo con el ganado (ordeñadores y corraleros). Llama la atención que amas de casa, secretarias y estudiantes también estén infectados con *M. bovis*.

En el **cuadro 9** la edad promedio de los individuos que dieron positivo a cualquiera de las pruebas de TB fue de 38, y se observa un porcentaje ligeramente mayor de casos en hombres (59%) El porcentaje de positivos fue un poco mayor en sintomáticos, con un 3% más de casos De todos los individuos que dieron positivo a la prueba de TB sólo tres presentaron diabetes como enfermedad asociada.

En la **figura 11** se muestra el dendrograma de las muestras que presentaron patrón molecular compatible con *M. tuberculosis*. La muestra número 489 de esputo pertenece a un paciente sintomático de TB que presentó patrón casi idéntico a 15 muestras identificadas con el número 328 (7 muestras de empleados de rancho y 9 pacientes del grupo de sintomáticos). De la muestra 489 a la muestra 338 se forma un grupo de patrones muy similares formado por 15 muestras de pacientes sintomáticos y 19 de empleados de establos. Asimismo, el grupo conformado por el patrón 329 de la figura 12 que incluyó 15 patrones idénticos estuvo integrado por muestras de una misma familia y empleados de un rancho con antecedentes de tuberculosis pulmonar, así como de algunos pacientes del grupo de sintomáticos.

La proporción de patrones obtenidos, *M. bovis* o *M. tuberculosis*, varió dependiendo de la fuente del ADN analizado en el spoligotyping. Cuando el ADN se obtuvo de aislado, la proporción de patrones fue del 52% para *M. tuberculosis* y 48% para *M. bovis*, mientras que cuando el ADN se obtuvo a partir de tejido,

la proporción de patrones fue del 77% para *M. tuberculosis* y el 18% para *M. bovis* (**Figura 12**).

8. DISCUSION

En el **cuadro 4** se observa que del total de las muestras positivas a TB, sólo el 10% dio positivo a la tinción de Zielh-Neelsen. Esto es relevante si se considera que de acuerdo al Manual de Procedimientos del Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis del Sector Salud, sólo aquellas muestras provenientes de esputo pueden ser consideradas positivas, esto debido a que en orina, biopsias de linfonodos, exudados, etcétera, la presencia de bacterias atípicas hacen que el diagnóstico se considere como "falsos positivos" (Iravatham, Chelluri y Saicharan, 2007). Algunos trabajos reportan que individuos que presentan signos clásicos de TB pueden ser negativos a BAAR pero positivos al aislamiento. Estos trabajos concluyen que cuando el diagnóstico se limita a la prueba de BAAR y éste resulta negativo, es necesario la complementación del diagnóstico con otras pruebas, además de enfatizar la evaluación clínica (Balane et al., 2007; Nankya et al., 2007; Wilson et al., 2007).

También se observa que de las 473 muestras, sólo 46 fueron positivas a BAAR, a diferencia de las 124 obtenidos por PCR. Esto puede ser una consecuencia de que la mayoría de los pacientes sintomáticos son sometidos al tratamiento aún antes de que se tengan los resultados del diagnóstico, lo que puede afectar la presencia de bacilos en la muestra. Contrario a esto, la sensibilidad de la PCR es mucho mayor, ya que para que la reacción sea positiva no importa que el bacilo esté vivo o muerto, puesto que en ambos casos se detectará el ADN, y tampoco importan las cantidades, mínimas cantidades de ADN son suficientes para la amplificación por medio de la reacción.

En el mismo cuadro se observa una diferencia en la proporción de especie de micobacteria cuando se tipifica tejido de la muestra directa a cuando se hace del aislamiento. En el primer caso se obtiene un 77% de patrones compatibles con

M. tuberculosis y un 18% de patrones compatibles con *M. bovis*, mientras que en el segundo caso se obtiene un 52% de patrones *M. tuberculosis* y un 48% de *M. bovis*. Esto puede ser una consecuencia de haber añadido piruvato de sodio al medio de stonebrink, con lo cual se buscó estimular el crecimiento de *M. bovis* al tener una fuente alterna de carbono, y donde efectivamente la proporción de crecimientos fue mayor.

Además, la alta sensibilidad de la PCR hace a esta prueba susceptible de reportar falsos positivos (Kumar, et al., 2004); por lo que se tiene la duda de que todos los positivos a la prueba directa en las muestras clínicas sean verdaderamente positivos (Balasanghameshwara, 2007). Sin embargo, evaluaciones de la PCR anidada utilizada en este estudio ha sido previamente evaluada con alto nivel de sensibilidad y especificidad, 86% y 100%, respectivamente (datos aun sin publicar). En la actualidad, el aislamiento es la “prueba de oro” para el diagnóstico de tuberculosis, es decir, es el único método que puede asegurar un diagnóstico de certeza.

El número de aislamientos del presente trabajo estuvo muy por debajo de lo esperado. A diferencia de varios trabajos que reportan que el aislamiento tiene una gran capacidad diagnóstica, y se considera como la prueba del diagnóstico definitivo (Balasanghameshwara, 2007), en nuestro estudio solo se obtuvieron 25 aislados.

Una de las razones puede ser la gran cantidad de muestras de orina que se trabajaron y es sabido que el pH de este tejido se modifica con el tiempo y afecta la inviabilidad de las micobacterias (Llaca et al., 2003). Este problema pudo haberse complicado por la logística en el manejo de la muestra. La distancia entre los ranchos y el laboratorio fue de aproximadamente 45 minutos, adicionales a las aproximadamente 2 horas que pasaban de que el trabajador tomaba su muestra y la entregaba. Todo esto aunado al hecho ya mencionado

de que muy posiblemente los pacientes sintomáticos estaba bajo tratamiento antes de entregar su muestra para diagnóstico.

Considerando que actualmente el aislamiento es considerada la prueba de oro para el diagnóstico de la tuberculosis, y tomando en cuenta sólo la tipificación de los aislados (**Cuadro 4**), se observó un 48% de patrones compatibles con *M. bovis* (12 de los 25 aislados obtenidos), a diferencia de trabajos anteriores en los cuales se menciona un 10.8% o menos de *M. bovis* del total de los casos de TB humana (Kazwala et al., 2007; LoBue et al., 2007). Existe la posibilidad de que esto haya sido el resultado del tratamiento de individuos sintomáticos, lo que pudo haber ocasionado que el impacto de dicho tratamiento haya sido mayor en *M. tuberculosis* que en *M. bovis*, debido al tipo de drogas utilizadas.

Autoridades de salud animal en México consideran raro, e incluso niegan la presencia de *M. bovis* como causa de TB en humanos. Nuestros resultados sugieren que *M. bovis* tiene una participación importante en los casos de tuberculosis humana. Quizá el problema se minimiza porque el diagnóstico rutinario se enfoca a *M. tuberculosis* y porque no se hace tipificación del agente causal sabiendo que el tratamiento es igualmente efectivo para ambos agentes.

Coincidimos con reportes de que generalmente los casos de TB por *M. bovis* sólo son detectados en trabajos de investigación (LoBue et al., 2007). No obstante es importante recordar que *M. bovis* presenta resistencia natural a la pirazinamida e isoniacida (Thoen y Steele, 1995; Gibson et al., 2004; Winters et al., 2005), y que éstos son dos de los principios activos de los cuatro que se utilizan para el tratamiento de la TB en la mayoría de los países del mundo.

En la **figura 7** se observan los patrones obtenidos de muestras del grupo de pacientes sintomáticos. A pesar de que se considera a *M. bovis* principalmente extrapulmonar, en las muestras de estos pacientes, el 41% de los casos de TB por *M. bovis* fue de tipo pulmonar.

De los patrones de *M. bovis* obtenidos de los empleados de ranchos, el 71% fue de muestras de esputo. En uno de estos ranchos (en el que se obtuvo la mayor proporción de patrones) los empleados comentan que tiene el antecedente de dos empleados que trabajaron toda su vida en el rancho y murieron de tuberculosis.

En el presente trabajo se obtuvieron patrones idénticos de *M. bovis* de origen humano y bovino en la misma zona geográfica (**Figura 9**). Tres cepas de *M. bovis* de origen humano mostraron espoligotipo idéntico a 8 cepas de origen bovino. Una cepa más de humano muestra espoligotipo que se diferencia únicamente en la presencia de un espaciador de cuatro cepas de bovino. Todo esto probablemente sugiera que *M. bovis* está pasando del ganado a las personas, aunque de momento se desconoce la vía de transmisión.

En el trabajo se incluyó a la familia de un empleado de un rancho al que no se le detectó la micobacteria pero cuya suegra presentó tuberculosis pulmonar de tipo agresivo que degeneró vértebras torácicas y la dejó incapacitada. De esta familia participaron 33 miembros, entre hombres, mujeres y niños. A excepción de 3 o 4 personas, toda la familia vive en la misma casa de la persona con tuberculosis activa, vivienda con pobres condiciones ambientales. De los 33 individuos, cuatro mostraron cepas con espoligotipo compatibles de *M. bovis* (**Cuadro 9**). Desafortunadamente, en el momento en que se realizó el muestreo a la familia, la suegra ya estaba terminando el tratamiento, por lo que no fue posible determinar el tipo de cepa causante de su enfermedad, además de que su diagnóstico no incluyó tipificación.

Al observar los resultados obtenidos de las muestras pertenecientes a la familia arriba referida, (muestras 293, 295, 316, 356 de la **figura 10**), se esperaba que toda los miembros muestreados estuvieran infectados con la misma cepa, sin embargo, no todos los patrones fueron iguales, lo que sugiere más de una fuente de infección.

Esto concuerda con los resultados obtenidos en el trabajo de Milián, et al. (2000) en el que se observó gran diversidad en patrones de *M. bovis* obtenidos de muestras de tejido bovino en un mismo rancho.

En algunos casos se logró obtener espoligotipos a partir de ambos, el aislado y directamente del tejido, dando el mismo patrón o uno muy similar. Sin embargo, en 12 individuos en la misma situación los patrones fueron diferentes; incluso en 8 de ellos (198, 261, 275, 293, 295, 343, 392 y 424) se observaron patrones de *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Aunque no se tiene la certeza, esto puede indicar la presencia de infecciones mixtas o alguna interferencia de ADN en las muestras utilizadas.

9. CONCLUSIONES

1. Los resultados del presente estudio sugieren que *M. bovis* participa en al menos 7.2% de los casos de TB en individuos sintomáticos y trabajadores de establos lecheros en el estado de Querétaro.

2. La similitud de patrones moleculares de cepas de origen humano y bovino de la misma zona geográfica puede ser un indicativo de que la transmisión bovino-humano está ocurriendo.

4. Una alta proporción (44%) de los espoligotipos compatibles con *M. bovis* se obtuvieron de tejido no pulmonar (orina), lo que puede ser motivo de sub-reporte de casos ya que no es tradicional que el bacilo se busque en este tipo de tejido.

5. Aunque 23 muestras fueron positivas a BARR, solo 16 crecieron en al menos alguno de los dos medios de cultivo, aun cuando a stonebrink se le adicionó piruvato de sodio para estimular el crecimiento de *M. bovis*, lo que sugiere que el proceso de crecimiento puede ser demasiado agresivo para el *Mycobacterium*.

6. La diversidad genética de cepas, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis* dentro de los mismos grupos poblacionales, es alta.

7. Como se sospechaba, existe un sub-reporte de casos de TB por *M. bovis*, ya que la información oficial de los laboratorios oficiales en Querétaro no existe un sólo reporte de TB por este agente.

9. El desarrollo de investigaciones del tipo del presente estudio se ve seriamente limitado por las consecuencias legales que puede enfrentar el rancho cuando los

trabajadores aparecen infectados de TB, de ahí la baja participación de ranchos, la cual fue del 17%.



FIGURA 6. Ubicación geográfica de los ranchos muestreados para la obtención de muestras de esputo y orina de trabajadores para determinar la presencia de *M. bovis* en casos de tuberculosis en el estado de Querétaro. El número de empleados participantes fue de 114.

Cuadro 4. Resultados del análisis molecular de diferentes muestras obtenidas de humanos, 255 de pacientes con sintomatología de tuberculosis y 218 de empleados de establos lecheros sin síntomas aparentes, en el estado de Querétaro. Enero 2006 a Febrero 2007.

TIPO DE MUESTRAS	MUESTRAS TOTALES	MUESTRAS POSITIVAS							
		BAAR	L-J	SB	SPOLIGO	CEPA	PCR	SPOLIGO	CEPA
Esputo	276	23	11	7	12	Mtb	80	64	Mtb
					6	Mb		12	Mb
					0	Nada		4	Nada
Orina	179	23	1	4	1	Mtb	41	29	Mtb
					4	Mb		10	Mb
					0	Nada		2	Nada
Otros	18	0	0	2	0	Mtb	3	3	Mtb
					2	Mb		0	Mb
					0	Nada		0	Nada
TOTALES	473	46	12	13	13	Mtb	124	96	Mtb
					12	Mb		22	Mb
					0	Nada		6	Nada

*L-J=Löwenstein-Jensen con glicerol; SB:Stonebrink con piruvato, Mtb:*Mycobacterium tuberculosis*; Mb:*Mycobacterium bovis*; Nada:hubo amplificación en PCR pero no espoligotipo, SPOLIGO:espoligotipo obtenido:*M. tuberculosis* o *M. bovis*.

Cuadro 5. Resultados del análisis molecular de diferentes muestras obtenidas de pacientes con sintomatología de tuberculosis en el estado de Querétaro. Enero 2006 a Febrero 2007.

TIPO DE MUESTRAS	MUESTRAS TOTALES	MUESTRAS POSITIVAS							
		BAAR	L-J	SB	SPOLIGO	CEPA	PCR	SPOLIGO	CEPA
Esputo	174	23	7	5	8	Mtb	48	42	Mtb
					4	Mb		3	Mb
					0	Nada		3	Nada
Orina	63	22	0	3	0	Mtb	16	10	Mtb
					3	Mb		5	Mb
					0	Nada		1	Nada
Otros	18	0	0	2	0	Mtb	3	3	Mtb
					2	Mb		0	Mb
					0	Nada		0	Nada
TOTALES	255	45	7	10	8	Mtb	67	55	Mtb
					9	Mb		8	Mb
					0	Nada		4	Nada

*L-J: Löwenstein-Jensen con glicerol; SB:Stonebrink adicionado con piruvato de sodio; Mtb:*Mycobacterium tuberculosis*; Mb:*Mycobacterium bovis*; Nada:a pesar de haber amplificado en el PCR, no se obtuvo patrón al correr la prueba de spoligotyping; SPOLIGO:tipificación de la cepa obtenida por medio de la prueba de spoligotyping.

Cuadro 6. Resultados del análisis molecular de muestras de esputo y orina obtenidas de empleados de establos lecheros sin sintomatología aparente de tuberculosis en el estado de Querétaro. Junio 2006 a Febrero 2007.

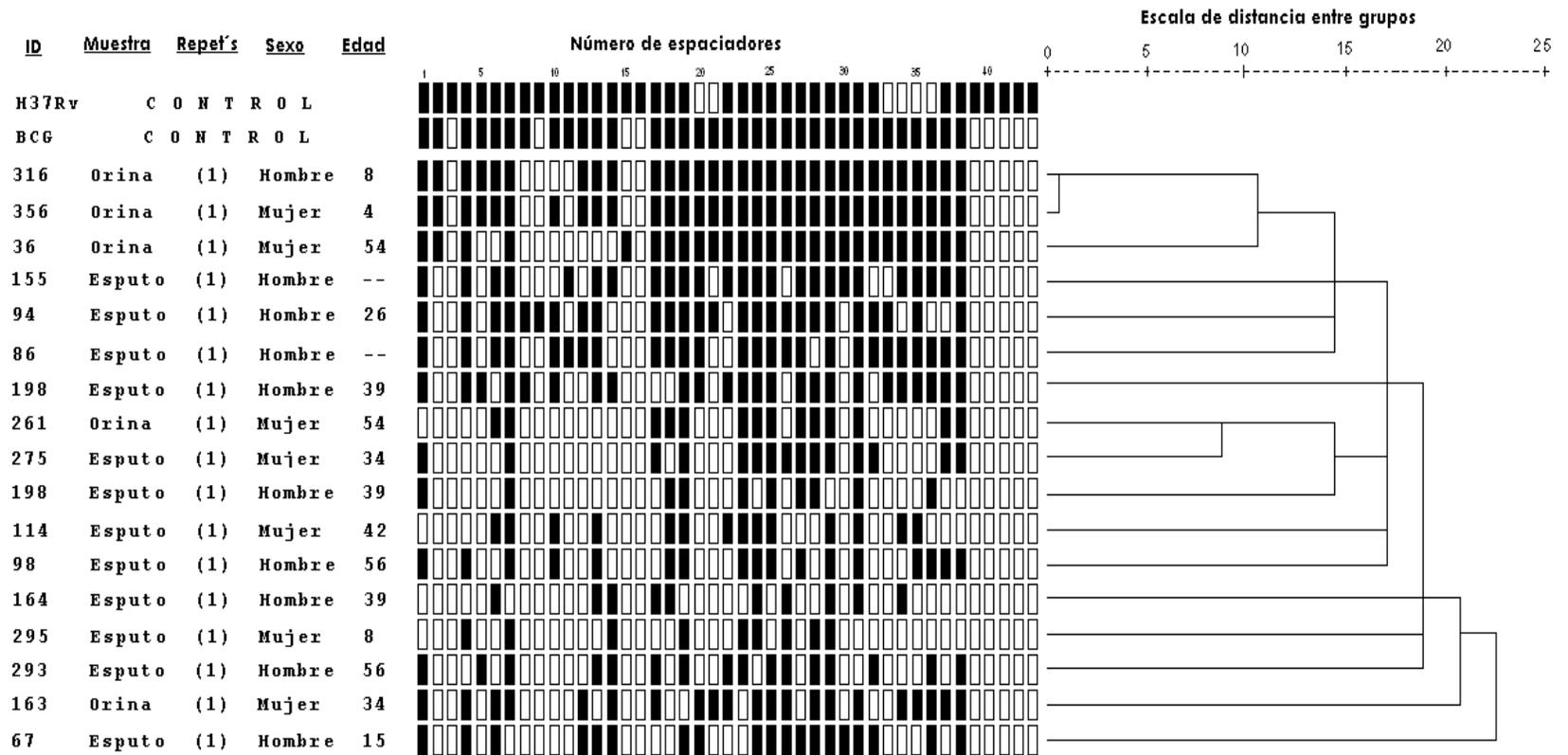
TIPO DE MUESTRAS	MUESTRAS TOTALES	MUESTRAS POSITIVAS							
		BAAR	L-J	SB	SPOLIGO	CEPA	PCR	SPOLIGO	CEPA
Esputo	102	0	4	2	4	Mtb	32	22	Mtb
					2	Mb		9	Mb
					0	Nada		1	Nada
Orina	116	1	1	1	1	Mtb	25	19	Mtb
					1	Mb		5	Mb
					0	Nada		1	Nada
TOTALES	218	1	5	3	5	Mtb	57	41	Mtb
					3	Mb		14	Mb
					0	Nada		2	Nada

*L-J= Löwenstein-Jensen con glicerol; SB:Stonebrink adicionado con piruvato de sodio; Mtb:*Mycobacterium tuberculosis*; Mb:*Mycobacterium bovis*; Nada:a pesar de haber amplificado en el PCR, no se obtuvo patrón al correr el spoligotyping; SPOLIGO:Tipificación de la cepa obtenida por medio de la prueba de spoligotyping.

Cuadro 7. Resultados del análisis molecular de 40 muestras de diferente tejido obtenido de bovino lechero con lesión aparente de tuberculosis, colectadas del rastro municipal del estado de Querétaro. Octubre a Diciembre 2006. *

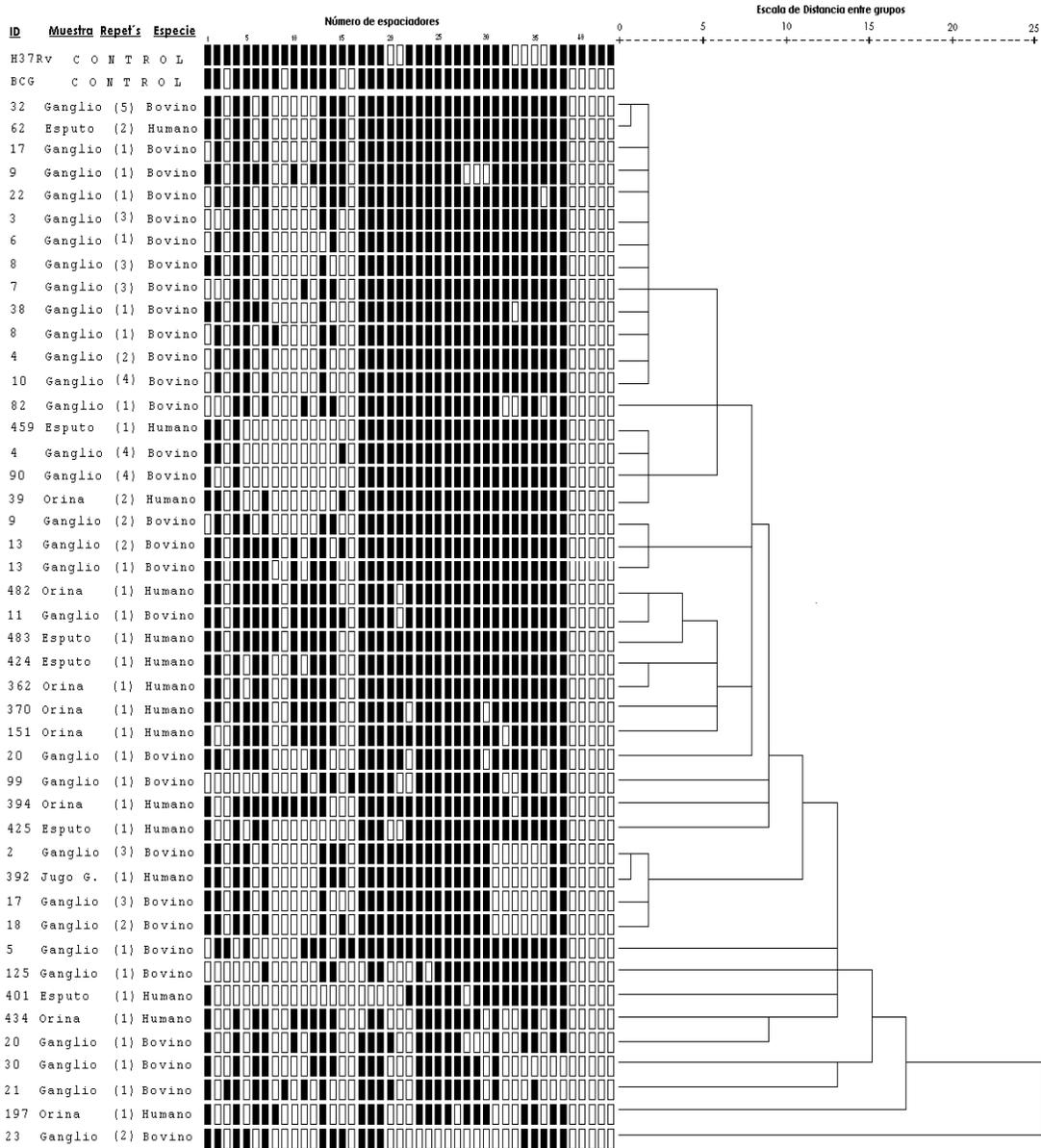
RESULTADOS DE TEJIDO BOVINO			
BAAR	Löwenstein-Jensen	Stonebrink	Espoligotipos
+	-	-	-
+++	+	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
+++	-	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
+	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i>
+++	-	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
+++	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i> (2)
++	-	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
-	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i>
-	-	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
-	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i>
-	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i>
-	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i>
-	+	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
+++	+	-	<i>Mycobacterium bovis</i> (2)
++	-	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
+	-	-	-
-	-	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
+	-	-	-
+	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i>
-	-	-	<i>Mycobacterium bovis</i>
+	-	-	-
+	+	+	<i>Mycobacterium bovis</i> (2)
+++	-	-	-
++	+	+	<i>Mycobacterium bovis</i> (2)
++	+	+	<i>Mycobacterium bovis</i>
+++	+	+	<i>Mycobacterium bovis</i> (2)
+++	+	+	<i>Mycobacterium bovis</i> (2)
+	-	-	-
+++	-	+	<i>Mycobacterium bovis</i> (2)
+++	-	-	-

*L-J:Löwenstein-Jensen con glicerol; SB:Stonebrink, adicionado con piruvato de sodio (Medio Comercial); Espoligotipo:Tipificación de la cepa obtenida por medio de la prueba de spoligotyping; + :Resultado positivo a la prueba; - :Resultado negativo a la prueba; (2):Doble patrón obtenido (aislado y tejido directo).



*ID:Identificación de la muestra; Muestra:tipo de tejido, Repet ´s:No de individuos con el mismo espoligotipo.

Figura 8. Dendrograma en el que se muestra la relación de los espoligotipos obtenidos del análisis molecular de muestras del grupo de trabajadores de ranchos lecheros que dieron patrones compatibles *M. bovis* en el estado de Querétaro. Las cepas H37Rv y BCG se incluyen como cepas de referencia. La escala a la derecha de la figura indica distancia genética entre espoligotipos.



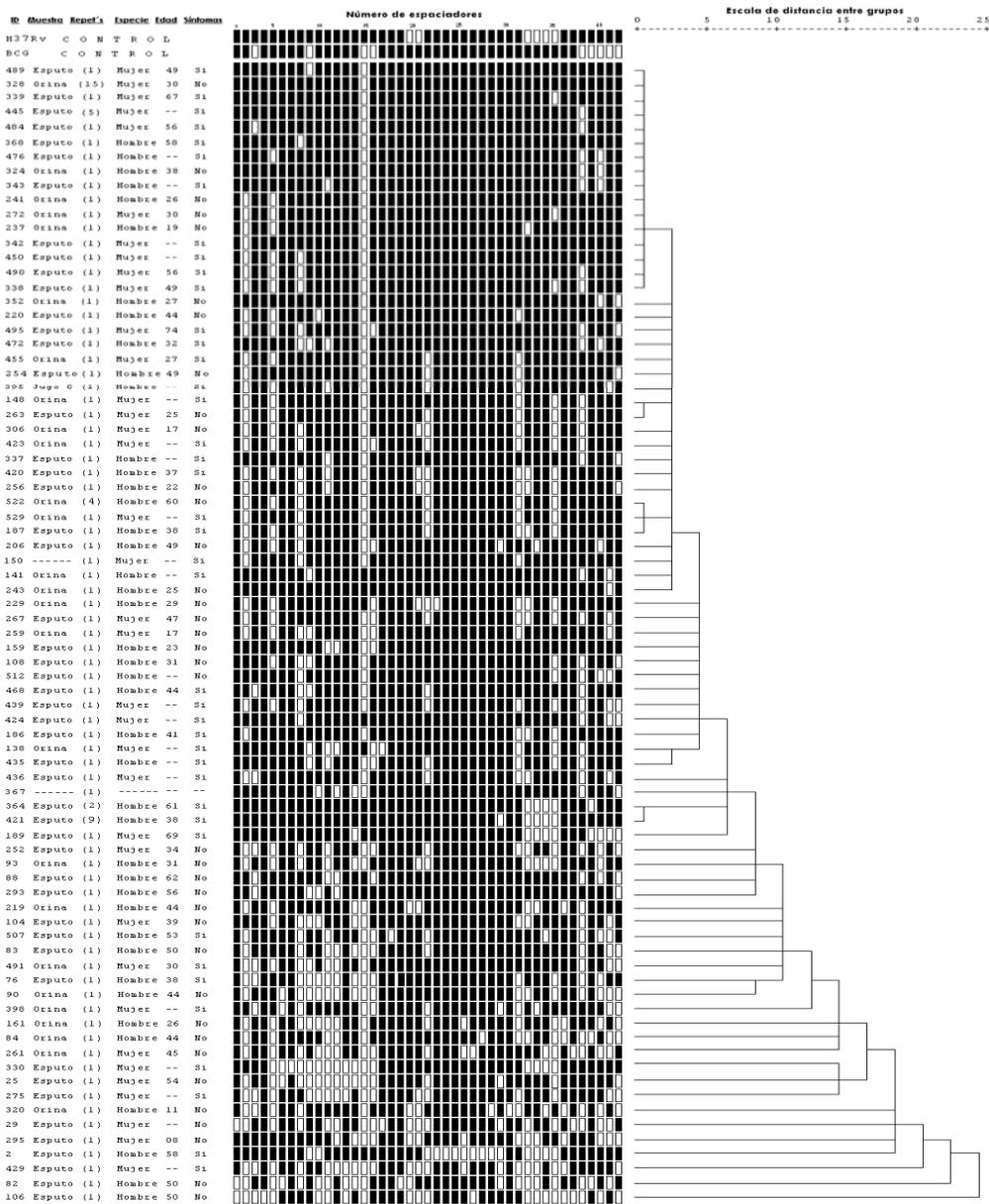
*ID=Identificación de la muestra; Muestra= tipo de tejido, Repet´cs=No de individuos con el mismo espoligotipo; Especie:cuando el patrón se obtuvo a partir de muestras colectadas de humanos o de bovinos.

Figura 9. Dendrograma en el que se muestra la relación de los patrones obtenidos como *M. bovis* del análisis molecular de muestras del grupo de pacientes con sintomatología comparados con 69 espoligotipos *M. bovis* obtenidos de diferente tejido bovino en el estado de Querétaro. Las cepas H37Rv y BCG se incluyen como cepas de referencia. La escala a la derecha de la figura indica distancia genética entre espoligotipos.

Cuadro 8. Características de los individuos que mostraron patrón molecular (fingerprint) compatible con *M. bovis* en el estado de Querétaro.

ID	Origen individuo	Tinción BAAR	Aislamiento		PCR	Tipo Muestra	Sexo	Actividad
			L-J	SB				
36	Rancho	-	-	+	+	Orina	Mujer	Intendencia
39	IMSS	+	-	+	+	Orina	Hombre	-
62	IMSS	+	-	+	+	Espujo	Mujer	Secretaria
67	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Hombre	Ayudante en General
86	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Hombre	Operador de maquinaria
88	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Hombre	Operador de maquinaria
97	Rancho	-	-	-	+	Orina	Mujer	Ordeñadora
98	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Hombre	Ordeñador
114	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Mujer	Corralera
151	IMSS	+	-	-	+	Orina	Mujer	-
155	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Hombre	-
160	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Hombre	Ordeñador
163	Rancho	-	-	-	+	Orina	Mujer	Ordeñadora
164	Rancho	-	-	-	+	Orina	Hombre	Ordeñador
180	IMSS	-	-	+	+	Jugo G.	Mujer	-
197	IMSS	+	-	+	+	Orina	Mujer	-
198	Rancho	-	+	+	+	Espujo	Hombre	Ordeñador
252	Rancho	-	-	-	+	Espujo	Mujer	Ing. Agrónomo (Encargada Establo)
261	Rancho	-	+	-	+	Orina	Mujer	Ordeñadora
275	Rancho	-	+	-	+	Espujo	Mujer	Ordeñadora
293-A	Rancho	-	-	+	+	Espujo	Hombre	-
295-A	Rancho	-	+	-	+	Espujo	Mujer	Estudiante
316-A	Rancho	-	-	-	+	Orina	Hombre	-
343	IMSS	++	-	+	+	Espujo	Hombre	-
356-A	Rancho	-	-	-	+	Orina	Mujer	Aún no va a la escuela
362	IMSS	+	-	-	+	Orina	Hombre	-
370	IMSS	-	-	-	+	Orina	Hombre	-
392	IMSS	-	-	+	+	Jugo G.	Mujer	-
394	IMSS	-	-	-	+	Orina	Hombre	-
401	IMSS	++	+	+	+	Espujo	Hombre	-
424	IMSS	+	-	-	+	Espujo	Mujer	Ama de casa
425	IMSS	-	-	-	+	Espujo	Mujer	Ama de casa
434	IMSS	++	+	-	+	Orina	Hombre	-
459	IMSS	++	-	+	+	Espujo	Mujer	-
482	IMSS	-	-	+	+	Orina	Hombre	-
483	IMSS	-	-	-	+	Espujo	Mujer	-

*ID:identificación de la muestra; Origen individuo:paciente sintomático o asintomático (Rancho); Tipo Muestra:tipo de tejido; Actividad:actividad o profesión en la que se desempeñaban en el momento del muestreo; A:familiares de un empleado de rancho (la suegra presentó tb pulmonar activa); Jugo G:jugo gástrico; +:resultado positivo a la prueba; -: resultado negativo a la prueba.



*ID=identificación de la muestra; Muestra=tipo de tejido, Repet 's=no. de individuos con el mismo espilogotipo; Especie:cuando el patrón se obtuvo a partir de muestras colectadas de humanos o de bovinos; Sintomatología:todos los pacientes del IMSS eran sospechosos de TB por presentar síntomas afines (Si); los empleados de Ranchos lecheros, dijeron no presentar síntomas aparentes de TB (No);

Figura 11 . Dendrograma en el que se muestra la relación de los patrones obtenidos del análisis molecular compatibles con *M. tuberculosis* del grupo de sintomáticos y asintomáticos, obtenidos de diferentes muestras clínicas en el estado de Querétaro. Las cepas H37Rv y BCG se incluyen como cepas de referencia. La escala a la derecha de la figura indica distancia genética entre espilogotipos.

Cuadro 9. Información epidemiológica de los casos (sintomáticos y asintomáticos) que dieron patrón (*M. tuberculosis* o *M. bovis*) en el análisis molecular obtenidos de diferentes muestras clínicas de humanos muestreados de Enero del 2006 a Febrero del 2007 en el estado de Querétaro..

ID	ORIGEN INDIV.	MUESTRA TRABAJADA	TIPO MUESTRA	SEXO	EDAD (AÑOS)	ENF. ASOC.	PROFESION	SINT.	ANTC.	RAZON POR LA QUE NO SE OBTUVO INFO -EPID
2	IMSS	Aislado	Espuito	Hombre	-	-	-	SI	-	NO INTEGRADO
C 3	IMSS	Aislado	Espuito	Hombre	-	NO	-	SI	NO	FAMILIAR
D 12	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	15	NO	Ayudante General	NO	NO	NO INTEGRADO
25	Rancho	Muestra directa	Espuito	Mujer	54	NO	Intendencia	NO	NO	NO INTEGRADO
29	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	13	NO	Ayudante General	NO	NO	NO INTEGRADO
36	Rancho	Aislado	Orina	Mujer	54	NO	Intendencia	-	-	NO INTEGRADO
A 39	IMSS	Aislado	Orina	Hombre	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
B 62	IMSS	Aislado	Espuito	Mujer	23	NO	Secretaria	SI	-	-
67	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	15	NO	Ayudante General	NO		NO INTEGRADO
76	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	38	NO	MVZ	NO	NO	NO INTEGRADO
82	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	50	NO	Jornalero	NO	NO	NO INTEGRADO
84	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	NO	-	NO	NO	NO INTEGRADO
88	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	62	NO	Operador maquinaria	NO	NO	NO INTEGRADO
90	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	48	NO	Albañil	NO	NO	NO INTEGRADO
93	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	31	NO	Corralero	NO	NO	NO INTEGRADO
94	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	26	NO	-	NO	NO	NO INTEGRADO
98	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	56	NO	Ordeña	NO	-	NO INTEGRADO
104	Rancho	Muestra directa	Espuito	Mujer	39	NO	Manejo de becerros	NO	NO	NO INTEGRADO
106	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	50	NO	Soldador	NO	NO	NO INTEGRADO
108	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	31	NO	Operador maquinaria	NO	NO	NO INTEGRADO
114	Rancho	Muestra directa	Espuito	Mujer	42	NO	Corralero	NO	-	NO INTEGRADO
124	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	35	-	-	SI	-	FAMILIAR
125	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	41	DIABETES	Chofer trailer foráneo	SI	NO	NO INTEGRADO
128	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	-	-	-	SI	-	FAMILIAR

ID	ORIGEN INDIV.	MUESTRA TRABAJADA	TIPO MUESTRA	SEXO	EDAD (AÑOS)	ENF. ASOC.	PROFESION	SINT.	ANTC.	RAZON POR LA QUE NO SE OBTUVO INFO -EPID
129	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-	SI	-	FOLIO MAL
138	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-	SI	-	FAMILIAR
141	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	-	-	-	SI	-	FOLIO MAL
148	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
150	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
151	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-	SI	-	FAMILIAR
155	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
159	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	23	NO	Portero	NO	NO	NO INTEGRADO
160	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	26	NO	Ordeña	NO	NO	NO INTEGRADO
163	Rancho	Muestra directa	Orina	Mujer	34	NO	-	NO	NO	NO INTEGRADO
164	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	16	-	-	NO	NO	NO INTEGRADO
B 180	IMSS	Aislado	Jugo G.	Mujer	-	NO	-	SI	-	FOLIO MAL
186	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	41	DIABETES	Chofer foráneo	SI	SI	FAMILIAR
187	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	38	-	-	SI	-	NO INTEGRADO
189	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	69	NO	Ama de casa	SI	NO	NO INTEGRADO
197	IMSS	Aislado	Orina	Mujer	-	NO	-	SI	NO	FAMILIAR
C 198	Rancho	Aislado	Espuito	Hombre	39	NO	Ordeña	NO	NO	NO INTEGRADO
206	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	49	NO	Ordeña	NO	NO	NO INTEGRADO
219	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	44	NO	Campo	NO	NO	NO INTEGRADO
220	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	44	NO	Campo	NO	NO	NO INTEGRADO
226	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	50	NO	Campo	NO	NO	NO INTEGRADO
229	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	29	NO	Velador	NO	NO	NO INTEGRADO
237	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	19	NO	Ordeña y partos	NO	NO	NO INTEGRADO
241	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	26	NO	Encargado de establo	NO	NO	NO INTEGRADO
243	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	25	NO	Empasturador	NO	NO	NO INTEGRADO
250	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	49	NO	Caballerango	NO	NO	NO INTEGRADO
252	Rancho	Muestra directa	Espuito	Mujer	34	NO	Encargado de establo	NO	NO	NO INTEGRADO

ID	ORIGEN INDIV.	MUESTRA TRABAJADA	TIPO MUESTRA	SEXO	EDAD (AÑOS)	ENF. ASOC.	PROFESION	SINT.	ANTC.	RAZON POR LA QUE NO SE OBTUVO INFO -EPID
254	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	49	NO	velador	NO	NO	NO INTEGRADO
256	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	22	NO	Corralero	NO	NO	NO INTEGRADO
255	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	49	NO	Velador	NO	NO	NO INTEGRADO
259	Rancho	Muestra directa	Orina	Mujer	36	NO	Ordeña	NO	NO	NO INTEGRADO
261	Rancho	Aislado	Orina	Mujer	45	NO	Ordeña	NO	-	NO INTEGRADO
263	Rancho	Muestra directa	Espuito	Mujer	25	NO	Ordeña	NO	NO	NO INTEGRADO
267	Rancho	Muestra directa	Espuito	Mujer	47	NO	Intendencia	NO	NO	NO INTEGRADO
272	Rancho	Muestra directa	Orina	Mujer	40	NO	Ordeña	NO	NO	NO INTEGRADO
267	Rancho	Muestra directa	Espuito	Mujer	47	NO	Intendencia	NO	NO	NO INTEGRADO
272	Rancho	Muestra directa	Orina	Mujer	40	NO	Ordeña	NO	NO	NO INTEGRADO
275	Rancho	Aislado	Espuito	Mujer	34	NO	-	SI	-	NO INTEGRADO
293	Rancho	Aislado	Espuito	Hombre	56	NO	-	SI	NO	NO INTEGRADO
295	Rancho	Aislado	Espuito	Mujer	8	NO	-	NO	NO	NO INTEGRADO
306	Rancho	Muestra directa	Orina	Mujer	17	NO	Estudiante	NO	SI	NO INTEGRADO
F 307	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	43	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
F 311	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	16	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
F 315	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	8	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
316	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	8	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
F 319	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	11	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
320	Rancho	Muestra directa	Espuito	Hombre	11	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
324	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	38	NO	-	SI	-	NO INTEGRADO
F 328	Rancho	Muestra directa	Orina	Mujer	30	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
330	IMSS	Aislado	Espuito	Mujer	-	-	-	SI	-	FAMILIAR
F 336	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	57	-	-	-	-	NO INTEGRADO
337	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
338	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	34	-	-	-	-	NO INTEGRADO
339	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	67	-	-	-	-	NO INTEGRADO

ID	ORIGEN INDIV	MUESTRA TRABAJADA	TIPO MUESTRA	SEXO	EDAD (AÑOS)	ENF. ASOC.	PROFESION	SINT.	ANTC.	RAZON POR LA QUE NO SE OBTUVO INFO -EPID	
D	340	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	NO INTEGRADO	
F	341	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	42	-	-	-	NO INTEGRADO	
	342	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	-	NO INTEGRADO	
A	343	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	NO	-	SI	NO INTEGRADO	
	352	Rancho	Muestra directa	Orina	Hombre	27	NO	-	NO	SI	NO INTEGRADO
	356	Rancho	Muestra directa	Orina	Mujer	4	NO	-	NO	-	NO INTEGRADO
	362	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	-	-	-	SI	-	FOLIO MAL
	364	IMSS	Aislado	Espuito	Hombre	61	NO	-	SI	NO	FAMILIAR
C	365	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	SI	-	FAMILIAR
F	366	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	367	IMSS	Muestra directa	Espuito		-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	368	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	58	-	-	SI	-	NO INTEGRADO
	370	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	23	-	-	SI	-	NO INTEGRADO
F	372	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
F	382	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	42	-	-	SI	-	NO INTEGRADO
D	392	IMSS	Muestra directa	Jugo G.	Mujer	-	NO	-	SI	NO	NO INTEGRADO
	394	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	-	-	-	SI	-	FOLIO MAL
	395	IMSS	Muestra directa	Jugo G.	Hombre	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	398	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-	SI	-	FOLIO MAL
F	400	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	401	IMSS	Aislado	Espuito	Hombre	-	NO	-	SI	NO	FOLIO MAL
C	418	IMSS	Aislado	Espuito	Hombre	36	NO	-	SI	NO	NO INTEGRADO
	420	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	37	-	-	-	-	NO INTEGRADO
C	421	IMSS	Aislado	Espuito	Hombre	38	DIABETES	Herrero	SI	NO	NO INTEGRADO
	423	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-	SI	-	FAMILIAR
	424	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	SI	-	FAMILIAR
	425	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	SI	-	FAMILIAR

ID	ORIGEN INDIV.	MUESTRA TRABAJADA	TIPO MUESTRA	SEXO	EDAD (AÑOS)	ENF. ASOC.	PROFESION	SINT.	ANTC.	RAZON POR LA QUE NO SE OBTUVO INFO -EPID
	429	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	-	NO INTEGRADO
F	430	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	65	-	SI	-	NO INTEGRADO
C	433	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	434	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	30	-	-	-	NO INTEGRADO
	435	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	436	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	439	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	-	NO INTEGRADO
D	443	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	SI	-	FAMILIAR
C	444	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	NO	SI	NO	FAMILIAR
D	445	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	SI	-	FAMILIAR
	450	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	455	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	27	-	-	-	NO INTEGRADO
	459	IMSS	Aislado	Espuito	Mujer	-	-	SI	-	FAMILIAR
	468	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	44	-	-	-	NO INTEGRADO
	472	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	32	-	-	-	NO INTEGRADO
	476	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	NO INTEGRADO
	482	IMSS	Aislado	Orina	Hombre	34	-	-	-	NO INTEGRADO
	483	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	46	-	-	-	NO INTEGRADO
	484	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	56	-	-	-	NO INTEGRADO
	489	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	53	-	-	-	NO INTEGRADO
	490	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	56	-	-	-	NO INTEGRADO
	491	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	30	-	-	-	NO INTEGRADO
	495	IMSS	Muestra directa	Espuito	Mujer	74	-	-	-	NO INTEGRADO
	507	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	53	-	-	-	NO INTEGRADO
	512	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	NO INTEGRADO
F	514	IMSS	Muestra directa	Espuito	Hombre	-	-	-	-	NO INTEGRADO
E	522	IMSS	Muestra directa	Orina	Hombre	60	-	-	-	NO INTEGRADO

ID	ORIGEN INDIV.	MUESTRA TRABAJADA	TIPO MUESTRA	SEXO	EDAD (AÑOS)	ENF. ASOC.	PROFESION	SINT.	ANTC.	RAZON POR LA QUE NO SE OBTUVO INFO -EPID
F 523	IMSS	Muestra directa	Jugo G.	Mujer	-	-	-			FAMILIAR
529	IMSS	Muestra directa	Orina	Mujer	-	-	-			NO INTEGRADO

*Los individuos con la misma letra presentaron patrones completamente iguales (A, B, C, D, E Y F); ID:identificación de la muestra; Muestra trabajada: tipo de tejido; Jugo G:jugo gástrico; Enf. Asoc.:presencia de diabetes, sida u otra enfermedad; Profesión:profesión o actividad en la que se desempeñaba en el momento en que se realizó el muestreo; Sint.:todos los pacientes del IMSS eran sospechosos de TB por presentar síntomas afines (Sí); los empleados de Ranchos lecheros, dijeron no presentar síntomas aparentes de TB (No);Sint.:todos los pacientes del IMSS eran sospechosos de TB por presentar síntomas afines (Sí); NO INTEGRADO:no se obtuvo información epidemiológica porque no se le dio seguimiento al caso. FOLIO MAL: debido a que los pacientes se rastrean en base al folio de registro, al tener mal el folio, no se pudo obtener la información necesaria en ciertos casos. FAMILIAR: en base al folio de registro del asegurado se puede asegurar a los familiares; sin embargo, sólo quedan registrados los datos del asegurado, lo que impidió poder obtener información epidemiológica.

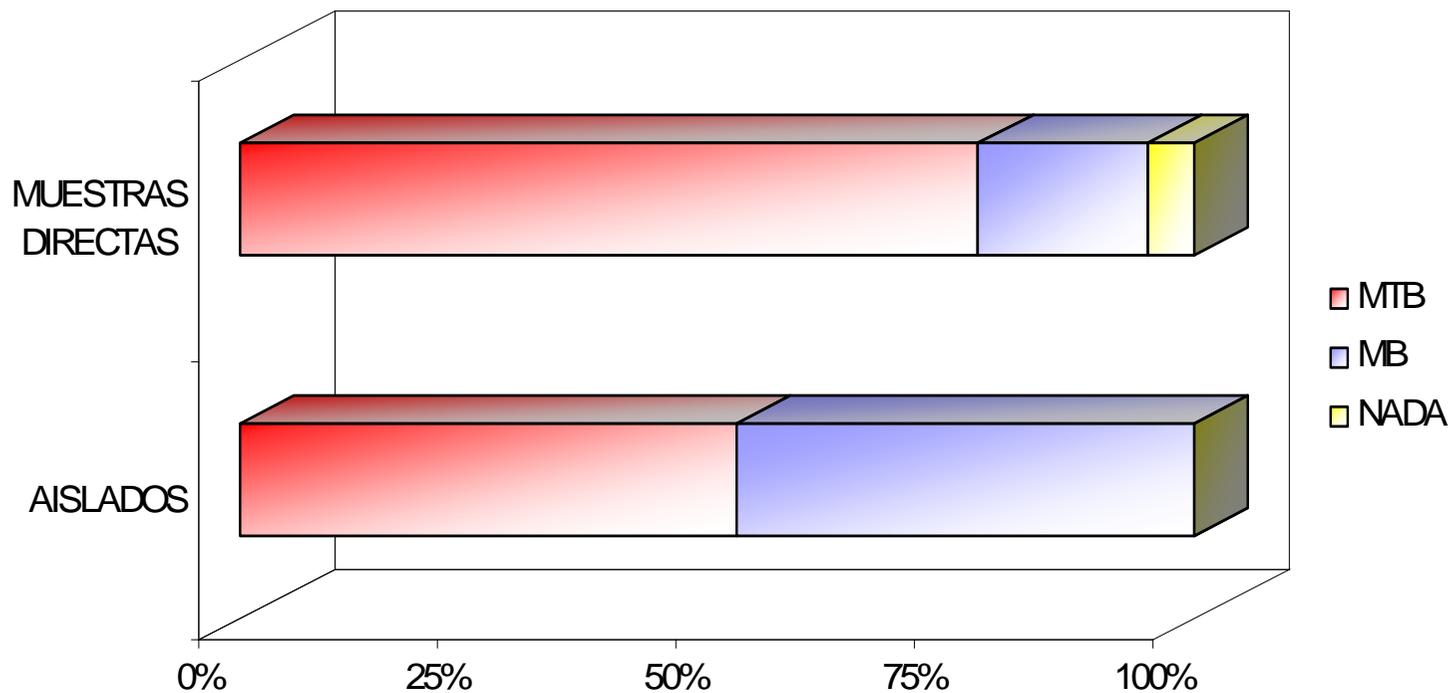


Figura 12. Comparación de resultados obtenidos en las pruebas de PCR de las 473 muestras de humanos sintomáticos y asintomáticos, de acuerdo al tipo de muestra utilizada (muestra directa o aislado) en el estado de Querétaro.

10. REFERENCIAS.

- Aranáz A., Liéban E., Mateos A., Domínguez L., Vidal D., Domingo M., González O., Elias F., Buncschoten A., Van Embden J., Cousins D. 1996. Spacer oligonucleotid typing *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animales: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 34:2734-2740.
- Araujo Z., de Waard JH. 2004. Tuberculosis. Curso Latinoamericano sobre Enfermedades Infecciosas. Oct 25 – Nov. 12. Instituto de Biomedicina. UCV, Caracas, Venezuela.
- Báez S.A.R, Pérez P.J.R., Salazar L.M.A. 2003. Discrepancias entre los datos ofrecidos por la Secretaría de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre tuberculosis en México, 1981-1998. Salud Pública Méx. 45(2):78-84.
- Balane G.I., Pancho J.S.R., Gler M.S., Quelapio M.I.D., Tupasi T.E. 2007. Tuberculosis among household contacts of infectious multidrug-resistant TB patients. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. Int. J. Tuber. Lung Dis., 11(11)(supply 1):S52.
- Balasanghameswara V.H. 2007. An overview of various methods of processing samples and their relative merits. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. Int. J. Tuber. Lung Dis., 11(11)(supply 1):S-16.
- Bernar A. Tabaco and VIH. 2007. The internal journal of tuberculosis and lung disease. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. Int. J. Tuber. Lung Dis., 11(11)(supply 1):S-17.
- Betancourt, J., Ruiz, N., Cruces, P. y Velásquez, W. 2002. Sensibilidad de los métodos baciloscopia, cultivo y ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar, en pacientes del edo. Vargas- Venezuela. Km V. 30:(2)137-144.
Disponibile: <http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222002012000005&lng=es&nrm=iso> . ISSN 0075-5222.
Accesado el 21de enero del 2007.
- Blancarte M.L., Anzaldono de J.G., Balandrano de S.S. 1992. Manual de técnicas y procedimientos de laboratorio en tuberculosis. Publicación técnica del INDRE No. 20. Primera impresión. México, D. F.
- Brodin P., Eiglmeier K., Marmiesse M., Billault A., Garnier T., Niemann S., Cole S.T., and Brosch R. 2002. Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis indentifies *mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 deletion mutant. Infect. Immun. 70(10):5568-5578.
- Brosch R., Gordon SV., Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Eiglmeier K. Garnier T., Gutiérrez C., Hewinson G., Kremer K., Pearsons L.M., Pym A.S., Samper S., van Soolingen D., Colr S.T. 2002. A new evolutionary scenario for *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS. 99(6):3684-3688.

- Bunschoten A., Molhuizen H., Schouls L., Soolingen D.V., Embden J.V. Spoligotyping, a method to detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Spoligotyping Kit Manual. Version 1.2,8/16/96. Isogen Life Science. Research Laboratory for infectious diseases. National Institute of Public Health and the Environment, P.O. Box 1,3720 BA. Bilthoven, Netherlands.
- California Department of Food and Agriculture/Animal Health and Food Safety Services. 2007. Tuberculosis-*Mycobacterium bovis*. Sacramento California ahbfeedback@cdfa.ca.gov
- Caminero L.J.A. 2003. Guía de la Tuberculosis para Médicos Especialistas. Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades respiratorias. (UICTER). Paris, Francia.
- Carter G.R., Chengappa M.M. 1994. Bacteriología y Micología Veterinarias: aspectos esenciales. Manual Moderno. Segunda Edición. México, D. F. 351-390.
- Cedeño R., Maneiro E., Orellan Y., Alcalá B. y Guevara A. 2004. Detección de bacilos ácidos resistentes en muestras de esputo por el método de concentración con hipoclorito de sodio. Revista de la Facultad de Farmacología. 46(2):8-11.
- Clancey J. K. 1977. The incidence of tuberculosis in lechewe (Marsh antelope). Tubercle. 1977. 58:151-156.
- Cole S.T. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology. 148:2919-2928.
- Collins C.H. and Grange J.M. 1983. A review:The bovine tubercle bacillus. J. Appl. Bacteriol. 55:12-29
- Collins C.H. and Grange J.M. 1987. Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* infections. Ir. Vet. J. 41:363-366.
- Committee of Bovine Tuberculosis, Board of Agriculture (1994). National Academy Press 2101. Constitution Avenue, N.W. Washington, D.C. 20418.
- Cooke M.M., Jackson R. And Coleman J.D. 1993. Tuberculosis in a free-living brown hare (*Lepus, eurapaeus occidentalis*). N. Z. Vet. J. 41:144-146.
- Cotter T.P., Sheehan S, Cryan B, O´Shaughnessy E, Cummins H, Bredin C.O. 1996. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in humans in the south-west region of Ireland: Is there a relationship with infection prevalence in cattle? Int. J. Tuber. Lung Dis. 77(6):545-548.
- Cousins D. Williams S., Liébana E. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol., 36(1):168-178.
- Curtis H. 1990. Biología. Cuarta edición. Editorial Panamericana. Capítulo 7.
- Chayaka J.M. 2007. Assuring VIH screening and care for TB patients. The internal journal of tuberculosis and lung disease. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. Int. J. Tuber. Lung Dis., 11(11)(supply 1):S-43.

- de Kantor I.N., de la Vega E., Bernardelli A. 1984. Infección por *Mycobacterium Boris* en liebres en la provincia de Buenos Aires, Argentina. Rev. Med. Vet. (B. Aires). 65:268-270.
- de Lisle G. W., Crews K., de Zwart J. 1993. *Mycobacterium bovis* infections in wild ferrets. N. Z. Vet. J. 1993. 41:148-149.
- Daborn C. And Grange J. 1993. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. Br. Vet. J. 149:405-417.
- Danker W.M., Davis C.E. 2000. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States- México border in the Baja California region. Pediatrics, 105(6):E79.
- Danker W.M., Waecker N.J., Essey M.A., Moser K.S., Thompson M., Davis C.E. 1993. *Mycobacterium bovis* disease in San Diego: a clinic epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. Medicine (Baltimore) 72(1):11-37.
- Duffield B.J., Young F.A. 1985. Survival of *Mycobacterium bovis* in defined environmental conditions. Vet. Microbiol. 10:193-197.
- Dupon M., Ragnaud J.M. 1992. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus 1: A retrospective multicentre study of 123 cases in France. Quart J. of Med. New Series. 306:719-730.
- Esteban J., Robles P., Soledad J.M., Fernández G.M.L. 2005. Pleuroneumony infections caused by *Mycobacterium bovis*: a re-emerging disease. Clin. Microbiol. Infect. , 11(10):840-3
- Estrada-Chávez C., Díaz O.F., Arriaga D.C., Villegas S.N., Pérez G.R., González S.D. 2004. Concordancia de la PCR y métodos rutinarios para el diagnóstico de tuberculosis bovina. Vet. Mex., 35(3).
- Fernández F., Morici C. 1999. Tuberculosis Felina por *Mycobacterium bovis*: comunicación de dos casos. Rev. Argent. Microbiol. 31(Supply. 1):19-20.
- Flamand J.R.B., Greth A., Haagsman J. and Griffin F. 1994. An outbreak of tuberculosis in a captive herd of Arabian oryx (*Oryx leucoryx*): diagnosis and monitoring. Vet. Rec. 134:115-118.
- Francis J. 1950. Control of infection with the bovine tubercle bacillus. Lancet. 1:34-39.
- Francis J. 1958. Tuberculosis in animals and man. London: Cassell. pp 357.
- Garnier C., Gutierrez G., Hewinson K., Kremer L.M., Parsons A.S., Pym S., Samper D. and Van Soolengen S.T. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS. 99(6):3684-3689.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J-C., Medina N., Mansoor H., Duthoy S., Lacroix C., Monsempe C., Harris B., Atkin R., Doggett J., Mayes R., Keating L., Wheeler, P.R., Parkhill J., Barrell B.G., Stewart T.C., Gordon S.V. and Hewinson G. 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc. Natl.Acad.Sci. 100(13):7877-7882.
- Gasana M., Kabanda G., Turinawe K., Sahabo R., Mugabo J. and Vandebriel G. 2007. Intensified TB case finding among PLWHA attending care and treatment services in Ruanda. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease"

- Gibson L., Hewinson G, Goodchild T, Watt B, Story A., Inwald J., Drobniewski F.A. 2004. Molecular epidemiology of disease due to *Mycobacterium bovis* in humans in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.*, 42(1):431-434.
- Gordon S.V., Brosh R. Billault A., Garnier T., Eiglemeier K and Cole S.T. 1999. Identification of Variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.*, 32:643-655.
- Grange M.J. and Yates D.M. 1994. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Vet. Microbiol.*, 40:137-151.
- Gutiérrez M., Samper S., Jiménez M.S., van Embden J.D.A., García M.J.F., Martín C. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine Genotype in *Mycobacterium bovis* Strains Cause in Human Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 35:3328-3330.
- Hardie R.M., Watson J.M. 1992. *Mycobacterium bovis* in England and Wales: Past, present and future. *Epidemiol Infect.* 109; 23-33.
- Hewinson R.G., Vordermeier H.M., Smith N.H. and Stephen V.G. 2006. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet. Microbiol.* 112:127-139.
- Himes E.M., Luchsinger D.W., Jarganing J.L., Thoen C.O., Hood H.B. and Ferrin D.A. 1980. Tuberculosis in fennec foxes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177:825-826.
- Huitema H. 1969. The eradication of bovine tuberculosis in cattle in the Netherlands and the significance of man as a source of infection for cattle. Selected papers of the Royal Netherlands Tuberculosis Association. 12:62-67.
- Matamoros I. 2003. Generalidades de TB. Centro Nacional de Referencia para Tuberculosis.
- Jensen K.A. 1953. Bovine tuberculosis in man and cattle . Advances in the control of zoonosis. World Health Organizations, Geneva. P.11.
- Kamerbeek J., Schouls L., van Agterveld W. 1997. Simultaneous strains detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35:907-914.
- Kato-Maeda M., Bifani P.J., Kreiswirth B.N. and Small P.M. 2001. The nature and consequence of genetic variability within *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Invest.* 107(5):533-537.
- Kazwala R., Cleaveland S. y Mfinanga G. 2007. *Mycobacterium bovis* infections in animals and humans in Tanzania. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. *Int. J. Tuber. Lung Dis.*, 11(11)(supply 1):S-25.
- Kruuner A. 2007. Liquid culture techniques for DST: gold standard for first-and second-line drugs?. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. *Int. J. Tuber. Lung Dis.* 11(11)(supply 1):S-44.

- Kruger C., Pfeiffer C., Beyers N., Godfrey-Faussett P., Ayles H., van Helden P.D., Lawrence K. and Botha T. 2007. Non-tuberculous mycobacteria recovered during a prevalence survey in areas with high TB prevalences in RSA. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 11(11)(supply 1):S-69.
- Kubica T., Rüsck-Gerdes S., Niemann S. 2003. *Mycobacterium bovis* susp. *caprae* Causes One-Third of Human *M. bovis*-Associated Tuberculosis Cases Reported in Germany between 1999 and 2001. J. Clin. Microbiol. 35(12):3328.
- Kumar S.S., Verma R., Shah D.H. 2004. Molecular fingerprinting of clinical isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from India by restriction fragment length polymorphism (RFLP) J. Vet. Sci. 5(4):331–335.
- Llaca D.J.M., Flores A.A., Martínez G.M.G., Cantú M.P.C. 2003. La baciloscopía y el cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. RESPYN, 4:3. Disponible: <http://www.respyn.uanl.mx/iv/3/articulos/tbexp_co.htm> Accesado el 25 de Junio del 2007.
- Liébana E., Aranáz A., Francis B. y Cousins D. 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation with the *Mycobacteria tuberculosis* complex. J. Clin. Microbiol. 34:933-938.
- Lobato M.N., Mole-Boetani J.C., Royce S.E. 2000. Missed opportunities for preventing tuberculosis among children younger than five years of age. Pediatrics. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 106(6):E75.
- LoBue P.A., Betancourt W., Peter C, Moser K.S. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in San Diego County, 1994-2000. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 7(2):180-185.
- LoBue P.A., Moser K.S. 2005. Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994-2003. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 9(3):333-338.
- LoBue P., Hlavsa M., Moonan P., Cowan L., Navin T., Kammerer J. S., Morlock G. and Crawford J. 2007. Human *mycobacterium bovis* tuberculosis: United States, 1995-2005. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. Int. J. Tuberc. Lung Dis., 11(11)(supply 1):S-25.
- Lutz H. 1897. Untersuchungen ubre das auftreten un die erkenung von reinfektion mit *Mycobacterium bovis* in rinderbestanden in Nordbayern in den jahren 1972 bis 1984. Inaugural Diss. Justus Liebig Universitat, Giessen, Germany.
- Manabe Y.C., Dannenberg A.M., Tyagi S.K., Hatem C.L., Yoder M., Woolwine S.C., Zook B.C., Pitt M.L.M. and Bishai W.R. 2003. Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. Infect. Immun. 71(10):6004-6011.

- Mancilla E.M., Martínez H.A., Palavecino C.b., Rehren S.G., Lucero L.P., León R.G. y Zárraga O.A-M. 2006. Variantes genéticas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas de pacientes de la Xa Región de Chile. Rev. Chil. Infect. 23(3):220-225.
- Maxine M. Benjamin. 1991. Manual de Patología Clínica en Veterinaria. Limusa. Tercera reimpresión de la primera edición. México. D.F. pp.215-221.
- Mendel G.L., Douglas R., Douglas je Bennet G. 1991. Manual de enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 3ra. Edición Edit. Panamericana, pp. 1986-2015.
- Milián S.F., García C.L., Anaya E.A.M. 2004. Distribución de las enfermedades de importancia económica de los animales domésticos en México, 1990-2004. Libro técnico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Diciembre.
- Milián S.F., Salman M., Black W.C., Triantis J., Ramirez C., Payeur J., Rhyan J., 2000. Epidemiología Molecular de aislados de *M. bovis* en México. En primer Congreso Internacional de Epidemiología. pp.139-145.
- Milián F., Sánchez L.M., Toledo P., Ramírez C., Santillán M.A. 2000. Descriptive Study of Human and Bovine Tuberculosis in Querétaro, México. Revista Latinoamericana de Microbiología. 42:13-19.
- Moda G., Daborn C.J., Grange J.M., Cosivi O. 2004. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. Int. J. Tuber. Lung Dis. 77: 103-108.
- Monies R.J. 2000. Tuberculosis bovina en gatos domésticos. Vet. Rec. 146: 407-408.
- Montali R.J., Milkota S.K. and Cheng L.I. 2001. Mycobacterium tuberculosis in zoo and wildlife species. Rev. Sci. Tech. Off int. Epiz. 20(1):291-303.
- Montoto M.A. Sección Bacteriología. 2005. Tuberculosis–enfermedad emergente, cómo diagnosticarla. Laboratorio del Hospital Alemán. Laboratorio de Bacteriología de TBC. Programa de Control de TBC. Hospital E. Tornú. G.C.B.A. Disponible: <http://www.cih.com.br/ART.%20TBC.%20CAMO.htm> .htm Accesado el 21 de enero del 2007.
- Morbidoni H.R. 2004. Tuberculosis, un viejo enemigo. Química viva. 3,3. Disponible: www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar. Accesado el 21 de enero del 2007.
- Nankya Mutyoba J.E., kink C., Shluchter M., Tisch D. 2007. Predictors of sputum culture positivity among smear-negative patients presenting to the TB clinic in Kampala. “38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lug Disease” (Abstract) Cape Town, South Africa. Int. J. Tuber. Lung Dis., 11(11)(supply 1):S51.
- Nau G.J., Chupp, G.L., Emile J.F., Jouanguy E., Berman J.S., Casanova J.L., Young R.A. 2000. Osteopontin Expresión Currelares with Clinical Outcome in Patients with Mycobacterial Infection. AJP. 157(1):37-42.
- Nelson M. 1999. The cost of disease Eradication: Smallpox and Bovine Tuberculosis. Washington, D.C. Ann. N. Y. Acad. of Sci. 894:83-91.

- Niobe_Eyangoh S.N., Puaban C., Philippe S., Cunin P., Thonnon J., Sola C., Rastogi N., Vincent V., Gutierrez M.C. 2003. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from Patients with Pulmonary Tuberculosis in Cameroon. *J. Clin. Microbiol.* 41(6):2547-2553.
- Nitta T., Knowles L.S., Kim J., Lehnkering E.L., Borestein L.A., Davidson P.T., Harvey S.M., and Koning M.L. 2002. Limited transmission of multidrug-resistant tuberculosis despite a high proportion of infectious cases in Los Angeles, county, California. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165:812-81.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-031-Z00- 1995. Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). Disponible: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/031zoo.pdf> Accesado el 27 de Enero del 2008.
- Ostrosky-Zeichner L., Rangel-Frausto M.S., García R. E., Vázquez A, Ibarra J., Ponce de León R. S, 2000. Tuberculosis en trabajadores de la salud: importancia de los programas de vigilancia y control Salud pública Méx. 42(1) Cuernavaca, Morelos.
- Ottenhoff M.T.H., Verreck W.F.A., Hoeve A.M., van de V.E. 2005. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis.* 85(1-2):53 – 64.
- Palma N.J.P., Bocanegra G.V. 2007. Estrategias innovadoras para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes tuberculosos. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. *Archivos de Bronconeumología.* 43(4):225-232.
- Payeur J. B., Jarnagin J.L., Marquardt J.G., Schaper L.G., Martin B.M. 1993. Laboratory methods in veterinary microbiology for the isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Service Laboratories Veterinary Services/Animal Plant Health Inspection Service/United State Departament of Agriculture. Ames, Iowa.
- Perumaalla V. S., Adams L. G., Payeur J., Baca D., Fitch T. A. 1999. Molecular fingerprinting confirms extensive cow-to-cow intra-herd transmission of a single *Mycobacterium bovis* strain. *Vet. Microbiol.* 70(3-4):269-276.
- Rigouts L., Maregeya B., Traore H., Collart J.P., Fissette K., Portaels F. 1996. Use of DNA restriction fragment typing in the differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from animals and humans in Burundi. Bujumbura, Burundi. *Int. J. Tuber. Lung Dis.* 77: 264-268.
- Roberts T. 1986. A retrospective assessment of human health protection bedefits from removal of tuberculous beef. *J. Food Protect.* 49:293-298.
- Romano M.I., Alito A., Fisanotti J.C., Bigi F., Cantor Y. 1996. Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 50:59-71.
- Sales M.hP.U., Taylor G.M., Hughes S., Yates M., Hewinson G., Yuong D.B. and Shaw R.J. 2001. Genetic Diversity among *Mycobacterium bovis* Isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. *J. Clin. Microbiol.* 39(12):4558-4562.

- Sauret J., Jolis R., Ausina V. Castro E. and Cornudella R. 1992. Guman tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: a report of 10 cases. *J. Tuberc. Lung Dis.* 73:388-391.
- Sawa T.R., Thoen C.O. and Nagoa W.T. 1974. *Mycobacterium bovis* infection in wild axis deer in Hawaii. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 165:998-999.
- Scorpio D., Collins D., Whipple D., Cave J., Bates Y. 1997. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli bases on a characteristic mutation in the bovine Pirazinamidase Gene. *J. Clin. Microbiol.* 35(1):106-110.
- Schliesser T. 1986. Prevalence of *M. bovis* in man 20 years after eradication of bovine tuberculosis in cattle. *Bull Int Union Against Tuberc.* (Abstract). 61(3):58-59.
- Sector Salud México 1996. Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis: Manual de procedimientos.
- Sechi L.A., Leori G., Lollai S.A., Dupré I., Molicotti P., Fadda G. and Zanetti S. 1999. Different Strategies for molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Sardinia, Italia. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(4):1781-1785.
- Secretaría de Salud del Estado de Querétaro (SESEQ). Departamento de transmisibles. Información facilitada por el responsable del Programa Nacional de Prevención y Control de la Tuberculosis Información obtenida del casos nuevos del 2000 al 2004. Información consultada en enero del 2007.
- Sevim T., Ataç G., Gündüz G., Aksoy E., Özmen Ý, Kapaklý N., Törün T and Tahaoğlu. 2007. The analysis of tuberculosis patients with unusual radiographic findings. "38th World Conference on lung Health af the Internal Union Against Tuberculosis and Lug Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 11(11)(supply 1):S-88.
- Shen Y., Shen L., Sehgal P., Huang D., Qiu L., Du G., Letvin N.L., and Chen Z.W. 2004. Clinical latency and reactivation of AIDS-related mycobacterial infections. *J. Virol.* 78(24):14023-14032.
- SIACON. 2006. Sistema de Información Agroalimentaria y Pecuaria. SAGARPA Disponible: www.sagarpa.gob.mx/siacon. Accesada el 21 de Enero del 2007.
- Smith G.E., Cawthorne D., Jarvis R., Synnott M.B., Cooper R., Hampton C., Allen M. 2001. Results of follow-up of human contacts of bovine tuberculosis in cattle during 1993-7 in North Staffordshire. *Epidemiol. Infect.* pp. 87-89.
- Stumpffs C.D., Essey M.A., Person D.H. 1984. Epidemiologic study of *M. Bovis* in American bison. *Porc. US. Anim. Health Assoc.* 88:564-570.
- Szewzyk R., Svenson S.B., Hoffner S.E., Bölske G., Wahlström H., Englund L., Engvall A., Källenius G. 1995. Molecular Epidemiological Studies of *Mycobacterium bovis* Infections in humans and animals in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 33(12):3183-3185.

- Taylor M., Worth R.D., Palmer S.I., Jahans K. and Hewinson G. 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. BMC Veterinary Research; 3(12):1-11. Disponible: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/3/12>. Consultada el 21 de Enero del 2007.
- Thoen C.O., Steele J.H. 1995. Human aspects of *Mycobacterium bovis* infection: In *Mycobacterium bovis* infection in Animal and Humans. Iowa State University Press; Ames IA. Primera edición.
- Toledo O.A.P. 1997. Estudio retrospectivo de 5 años de la tuberculosis humana y bovina en Querétaro. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Toledo O.P. Milián S.F., Santillán F.M. A. Ramírez C.I.C. 1999. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. Vet. Mex. 30(3):227-229.
- Torning K. 1965. Bovine tuberculosis. Dis Chest. 47:241-246.
- Valenzuela M.T., Valenzuela P. y Rojas M. 1993. Situación de la Tuberculosis en Chile. Rev. Chil. Enf. Resp. y Cir. Tor. 9:125-130.
- Valerga, M., Viola C., Thwautes, A. 2005. Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en una mujer con SIDA. Rev. Argent. Microbiol. 37(2):96-98.
- Valverde K., Soto M., Umana M. A. 1999. Tuberculosis: revisión de los últimos 10 años en el Hospital Nacional de Niños. Acta Pediátr. Costarric., 13:1, 17-22. Disponible: <http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00901999000100003&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1409-0090. Consultado el 21 de Enero del 2007.
- Van Embden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T., Dale J.W., Eisenach K.D., Gicquel B., Hermans P.W., Martin C., McAdam R., Shinnick T.M. and Small P.M. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized Methodology. J. Clin. Microbiol. 31:406-409.
- Velazco R.V.M., Esquivel M.A.P., Esquivel M.G.C., Sánchez C.O., Martínez O.V. y Cicero S.R. 2004. Epidemiología y resistencia primaria a fármacos en casos incidentes de tuberculosis pulmonar. Rev. Med. IMSS. 42(4):301-306.
- Wilfried Releer, Gerald Martín, Konrad Sachse, Ludmila Naumann, Dagmar Kahlau, Jörg Beer, Milan Bartos, György Nagy, Zeljko Cvetnic, Manca Zolnir-Dovc, Ivo Pavlik. 2004. Molecular Fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* Isolates from Central Europe. J. Clin. Microbiol. 2234-2238.
- Wilson D., Morroni C., Nachege J., Mbhele L., Chaisson R., Maartens G. 2007. Performance of response-to-therapy parameters in out-patient

South African smear-negative TB suspects. "38th World Conference on lung Health of the Internal Union Against Tuberculosis and Lung Disease" (Abstract) Cape Town, South Africa. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 11(11)(supply 1):S57.

- Winters D., Driver C., Macaraig C., Munsiff S.S., Pichardo C., Driscoll J., Salfinger M., Kreiswirth R., Jereb J., LoBue P. 2005. Human Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis*- New York City, 2001-2004. *Public Health and Prevention*. New York City. 2005 (Centers for disease control and prevention (CDC). Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* – New York City, 2001-2004. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 54(24):605-608.
- Young J., O`Connor M.E., 2005. Risk factors associated with latent tuberculosis infection in Mexican American Children. *Pediatrics*. 115(6):e647-653.
- Zink R.A., Sola C., Reischl U., Grabner W., Rastogi N., Wolf H., Nerlich A.G. 2003. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping. *J. Clin. Microbiol.* 359-367.
- Zumárraga M.J., Martín C., Samper F., Alito A., Latini O., Bigi F., Roxo E., Cicuta M.E., Errico F., Castro R.M., Cataldi A., Van Soolingen D. and Romano M.I. 1999. Usefulness of spoligotyping in Molecular Epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South América. *J. Clin. Microbiol.* 37(2):296-303.

11. APÉNDICE

Anexo I. TECNICA DE BAAR

TINCIÓN DE ZIELH-NEELSEN TRADICIONAL

Con el mechero encendido destapar la muestra.

En caso de líquidos obtenidos por punción, centrifugar la muestra a 3 500 RPM durante 20 minutos; decantar y homogeneizar para muestras de biopsias, macerarlas en un mortero estéril con unos pocos mililitros de agua estéril.

Extender la muestra sobre un portaobjetos con la ayuda de una pipeta de pasteur estéril y se fija con fuego.

A) COLORACIÓN

Colocar los frotis sobre unas varillas dispuestas en el lavamanos o sobre una bandeja metálica de coloración. Con el extendido hacia arriba. Es conveniente que la varilla más cercana al operador esté ligeramente levantada, para evitar que el colorante cubra la identificación del portaobjetos.

Se cubre la superficie del extendido con fucsina fenicada previamente filtrada.

Con la llama de un hisopo de algodón humedecido en alcohol, calentar suavemente por debajo de las láminas cubiertas con fucsina, hasta que se produzca emisión de vapores blanquecinos visibles; dejar calentar y repetir la operación por dos veces más. En ningún caso la fucsina debe hervir o secarse sobre la lámina; si ocurre esto último debe reponerse el colorante.

Se elimina la fucsina tomando el portaobjetos por los bordes del extremo numerado, entre el pulgar y el índice o con una pinza, inclinándolo hacia delante y lavándolo con agua a baja presión.

Se gira la lámina para lavar la cara inferior, eliminando la fucsina que hubiera escurrido sobre ella.

B) DECOLORACIÓN

Se cubre el extendido con alcohol-ácido.

Se toma la lámina por los bordes del extremo numerado y se efectúa un suave movimiento de vaivén, de modo que el alcohol-ácido vaya decolorando y arrastrando la fucsina. Cuando la solución decolorante adquiere una coloración roja se lava con agua y si es necesario se decolora nuevamente.

Se elimina el alcohol-ácido, lavando la lámina con agua a baja presión.

Se considera decolorado el extendido cuando sus partes más gruesas sólo conservan un ligero tinte rosado. Esta operación tarda alrededor de dos minutos.

C) COLORACION DE CONTRASTE

Se cubre la superficie del extendido con azul de metileno durante un minuto.

Se elimina el azul de metileno y el portaobjetos se lava con agua a baja presión, tanto por la superficie del extendido como por su cara inferior.

Las láminas ya teñidas se secan a temperatura ambiente, colocándolas verticalmente sobre papel absorbente limpio, y apoyadas sobre una repisa de madera.

Se revisa la numeración de las láminas y se remarcan si se ha borrado durante la tinción.

E) OBSERVACION MICROSCÓPICA

Se emplea un microscopio equipado con objetivo de inmersión (100 X) y ocular de 7 X, 8 X o 10 X. Con un cuenta gotas se coloca una gota de aceite de inmersión sobre el extremo más cercano a la numeración del extendido y sin tocar la superficie del portaobjetos. Se enfoca el microscopio acercando el objetivo de inmersión hasta tocar la superficie de la gota de aceite ajustando enseguida con el tornillo micrométrico.

Cada campo se divide mentalmente en cuatro cuadrantes como la esfera de un reloj. La lectura se inicia en el superior derecho y se continúa con los otros en el sentido de las manecillas del reloj (Figura 16). Debe observarse en superficie y en profundidad, utilizando constantemente el tornillo macrométrico.

Los bacilos se verán como bastoncitos delgados, ligeramente curvos, teñidos de rojo, generalmente con gránulos más coloreados en su interior, asilados, en parejas o en un grupo sobre el azul claro de la tinción de contraste.

Se debe seguir una pauta uniforme de observación, leyendo de izquierda a derecha del extendido en un mínimo de 100 campos útiles (Figura 17)

Se considera campo microscópico útil aquel en el que se observan elementos celulares de origen bronquial (leucocitos, fibras y células ciliadas). Los campos en los que no aparezcan dichos elementos no deben contabilizarse en la lectura.

El número de campos a observar varía según la cantidad de bacilos:

- a) Si no se encuentran bacilos ácido-alcohol resistentes o hay menos de un bacilo por campo en promedio, se examina al menos 100 campos microscópicos útiles.
- b) Si se encuentran de 1 a 10 bacilos promedio por campo, es suficiente la observación de 50 campos.
- c) Si se encuentran más de 10 bacilos por campo en promedio, basta con la observación de 20 campos.

Terminada la observación se limpia el aceite se inmersión del objetivo con papel suave o gasa, absorbiendo el aceite sin frotar la superficie del lente.

El frotis observado se sumerge en xilol, se escurre para eliminar el aceite y se archiva.

F) INFORME DE RESULTADOS.

Los resultados se informan de la siguiente manera:

Negativo (-): No se encuentran bacilos ácido-alcohol resistente en 100 campos observados.

Positivo (+): Menos de un bacilo en promedio por campo, en 100 campos observados.

Positivo (++): De uno a diez bacilos por campo en promedio, en 100 campos observados.

Positivo (+++): Más de 10 bacilos ácido-alcohol resistentes por campo en 20 campos observados.

Si en una lámina se observan entre 1 y 4 bacilos en 100 campos se recomienda:

- Ampliar la lectura de campos adicionales
- Si no se encuentran más bacilos, hacer otro extendido de la misma muestra.
- Si la lectura de este segundo extendido no modifica el resultado anterior, la muestra debe informarse como negativa, consignar el hallazgo de 1 a 4 bacilos en el libro de registro del laboratorio y solicitar una nueva muestra del paciente. Es conveniente hacer cultivo en aquellas muestras en que se encontró de 1 a 4 bacilos. (Blancarte et al., 1992)

Figura 16. DIRECCIÓN DE OBSERVACIÓN EN CADA CAMPO MICROSCÓPICO.

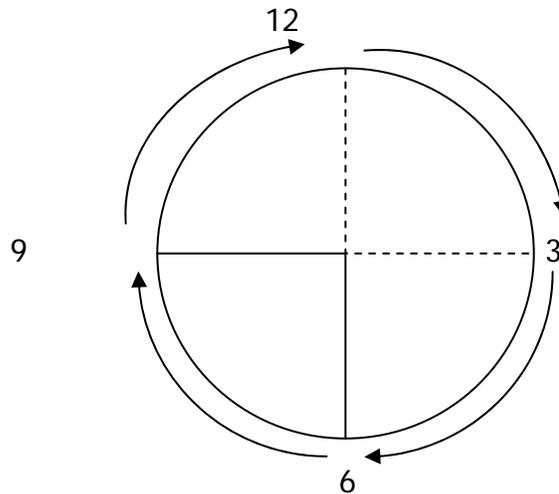
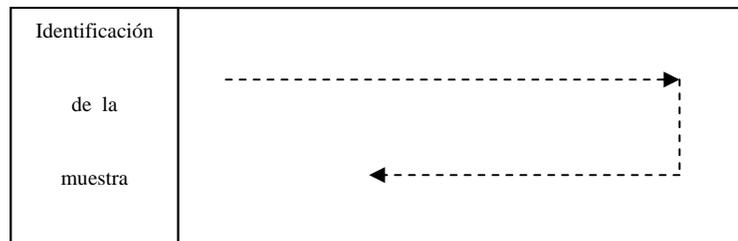


Figura 17. RECORRIDO PARA EFECTUAR LA LECTURA DE 100 CAMPOS MICROSCÓPICOS.



(Blancarte et al, 1992)

Anexo II. TÉCNICA PARA AISLAMIENTO

TÉCNICA DE PETROF MODIFICADA

- 1.- En caso de muestras de tejido, limpiar la lesión de grasa y tejido conjuntivo.
- 2.- Agregar 20 a 30 ml aproximadamente de cloro al 5:995 (5 ml de cloro en 995 ml de agua destilada).
- 3.- Dejar reposar 30 min
- 4.- Identificar las licuadoras donde se va a moler; previamente esterilizarlas con 50 ml de agua destilada
- 5.- Identificar los tubos (2 falcon 50 ml y un eppendorf de 2ml) por muestra.
Una vez licuado, con una pipeta tomar 7ml y ponerlo en un tubo falcon, 1.5 ml en un tubo eppendorf y el resto de molienda en otro tubo falcon de 50 ml (este último tubo es para guardarlo). Ahora la muestra ya puede ser procesada para aislamiento, extracción de ADN para PCR, tinción de BAAR, etc)
- 6.- Agregar 5 ml de ácido clorhídrico al 10%
- 7.- Agregar de 2 a 3 gotas de rojo fenol al 1% hasta que adquiera un color anaranjado (agitar).
- 8.- El tubo se agita ligeramente para que se mezcle su contenido y se dejan 20 minutos en reposo.
- 9.- Se añade gota a gota una solución de NAOH 2N agitando el tubo hasta que el indicador vire a un color morado-lila.
- 10.- La muestra se centrifuga a 3000 RPM durante 20 min, se decanta y el 90% del sobrenadante se desecha.
- 11.- El sedimento está listo para ser sembrado
- 12.- Agitar con una pipeta pasteur el sedimento para que se mezcle bien con el sobrenadante.
- 13.- Sembrar en dos tubos identificados por muestra dejando caer gotas que se toman con la pipeta pasteur hasta que quede cubierta la superficie del medio. Dejar la tapa floja.

14.- Dejar los medios inclinados en la incubadora a 37°C por 9 semanas

(Payeur et al, 1993)

Anexo III. TECNICA DE EXTRACI3N DE ADN PARA MUESTRAS DE ESPUTO Y CUALQUIER OTRO TEJIDO M3S PESADO QUE LA ORINA.

1. Tomar 500 μ l de la muestra y pasarla a un tubo de 2 ml (completar con agua destilada en caso de no haber suficiente).
2. Centrifugar 10 min a 12000 rpm y decantar.
- 3.- Al sedimento agregarle 400 μ l de TE1X.
4. Adicionar 50 μ l de lisozima (10mg/ml), agitar e incubar a 37°C durante 1hr (este procedimiento puede durar toda la noche).
5. Adicionar 70 μ l de SDS 10% y 5 μ l de proteinasa K (20mg/ml), agitar e incubar a 65°C durante 10min.
6. Adicionar 100 μ l de NaCl 5 M.
7. Adicionar 100 μ l de CTAB/NaCl (4.1 g NaCl y 10 g CTAB (N-cetyl-N,N,N,-trimethylammoniumbromide) en 10 ml de agua). Esta soluci3n debe precalentarse a 65°C, agitar hasta que la soluci3n tome una consistencia lechosa. Incubar a 65°C durante 10min.
8. Adicionar 750 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico, agitar para hacer una soluci3n homogénea. Centrifugar a 12000g durante 5min.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (aprox. 600 μ l), teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia, ya que esto puede contaminar el DNA. Transferir en volúmenes de 200 μ l.
10. Adicionar 0.6 volúmenes de alcohol isopropílico (360 μ l aprox.), para precipitar los ácidos nucleicos.
11. Dejar la mezcla a -20°C durante 30min. (este procedimiento puede durar toda la noche).
12. Centrifugar a 12000g durante 1min.

13. Descartar la mayoría del sobrenadante, dejando aprox. 20µl por encima del botón de DNA.
14. Adicionar 1ml de etanol al 70% frío (mantener a -20°C). Centrifugar a 12000g durante 5min, descartar la mayoría del sobrenadante. Dejar 20µl por encima del botón de DNA.
15. Centrifugar a 12000g durante 1min. Y decantar cuidadosamente el sobrenadante.
16. Permitir que el DNA seque a temperatura ambiente. Más o menos durante 20min.
17. Disolver el DNA en 20µl de amortiguador TE1X o en agua MilliQ, puede ser almacenado a 4° o a -20 °C hasta su uso en el laboratorio.
18. Para una estimación rápida de la concentración de DNA, se puede correr 1µl del DNA en solución en un gel de agarosa al 0.8%.

NOTA. Si la muestra de tejido se ha almacenado, se recomienda centrifugar a 12000g durante 5min, desechar el sobrenadante y agregar 500µl de PBS 1X, agitar y centrifugar nuevamente a 12000g durante 5min y decantar el sobrenadante, repetir este paso dos veces. Finalmente agregar TE 1X e iniciar con el paso 1 de este protocolo.

(Blancarte et al, 1992).

Anexo IV. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA MUESTRAS DE ORINA

- 1.- Tomar 1 ml de muestra, centrifugar a 11,000 RPM (12,000gr). Decantar
- 2.- Agregar 500 µl de fenol saturado (pH 7.3 a 8). Dar vortex vigorosamente durante 1 min.
- 3.- Agregar 500 µl de buffer TE 1X. Dar vortex vigorosamente. Dejar en reposo por 5 min.
- 4.- Centrifugar 5 min a 10,000 RPM, transferir el sobrenadante a otro tubo.
- 5.- Al sobrenadante agregar 700 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Dar vortex.
- 6.- Centrifugar 5 min a 10,000 RPM, transferir el sobrenadante a otro tubo (2 veces).
- 7.- Agregar 400 µl de isopropanol y 65 µl de NaCl al 5M. Dejar en reposo a -20°C por 30 min. Decantar el sobrenadante. Centrifugar a 10,000 RPM durante 10 min. Decantar.
- 8.- Lavar el sedimento con 500 µl de etanol al 70% . Dar vortex. Centrifugar a 5000 RPM durante 5 min.
- 9.- Lavar con 500 µl de etanol absoluto, centrifugar a 5,000 RPM durante 2 minutos. Decantar sobrenadante y dejar secar.
- 10.- Hidratar con 30 µl de agua.

(Blancarte et al, 1992)

Anexo V. TECNICA DE EXTRACI3N DE ADN APARTIR DE AISLADOS.

Esta t3cnica es aplicable para aislar DNA gen3mico de alto peso molecular.

1. Tomar el cultivo o el tejido macerado y transferir aproximadamente 100mg de peso h3medo, a un tubo de microcentr3fuga que contenga 400μl de TE 1X.
2. Si trabaja con cultivos bacterianos puros inactivarlas a 80°C durante 20min., y enfriar a temperatura ambiente.
3. Adicionar 50μl de lisozima (10mg/ml), agitar e incubar a 37°C durante 1hr (este procedimiento puede durar toda la noche).
4. Adicionar 70μl de SDS 10% y 5μl de proteinasa K (10mg/ml), agitar e incubar a 65°C durante 10min.
5. Adicionar 100μl de NaCl 5 M.
6. Adicionar 100μl de CTAB/NaCl (4.1 g NaCl y 10 g CTAB(N-cetyl-N,N,-trimetilamonibromida) en 100 ml de agua destilada). Esta soluci3n debe precalentarse a 65°C y agitar hasta que la soluci3n tome una consistencia lechosa. Incubar a 65°C durante 10min.
7. Adicionar 750μl de cloroformo/alcohol isoam3lico (24:1), agitar para hacer una soluci3n homog3nea. Centrifugar a 12,000 g durante 5min.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (aprox. 600μl), teniendo cuidado de no tomar la fase intermedia, ya que esto puede contaminar el DNA. Transferir en vol3menes de 200μl.
9. Adicionar 0.6 vol3menes de alcohol isoprop3lico (450μl aprox.), para precipitar los 3cidos nucleicos.
10. Incubar por 20 min. en hielo. Puede ser hasta -20°C durante 30min (este procedimiento puede durar toda la noche).
11. Centrifugar a 12,000g durante 15 min a temperatura ambiente.
12. Descartar la mayor3a del sobrenadante, dejando aprox. 20μl por encima del bot3n de DNA.

13. Adicionar 1ml de etanol al 70% frío (mantener a -20°C) y centrifugar a 12000g durante 5min, descartar la mayoría del sobrenadante. Dejar 20 μl por encima del botón de DNA.
14. Centrifugar a 12000g durante 1min. y decantar cuidadosamente el sobrenadante.
15. Permitir que el DNA seque a temperatura ambiente. Más o menos durante 20min.
16. Disolver el DNA en 20 μl de amortiguador TE1X o en agua MilliQ, puede ser almacenado a 4° o a -20°C hasta su uso en el laboratorio.
17. Para una estimación rápida de la concentración de DNA, se puede correr 1 μl del DNA en solución en un gel de agarosa al 0.8%.

NOTA. Si la muestra de tejido se ha almacenado, se recomienda centrifugar a 12000g durante 5min, desechar el sobrenadante y agregar 500 μl de PBS 1X, agitar y centrifugar nuevamente a 12000g durante 5min y decantar el sobrenadante, repetir este paso dos veces. Finalmente agregar TE 1X e iniciar con el paso 1 de este protocolo.

(Bunschoten et al., 1996)

Anexo VI. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA DETECCIÓN DE MICOBACTERIAS DEL COMPLEJO *M. tuberculosis*.

Se utilizará un control positivo, un control negativo y agua.

- 1) Etiquetar tubos eppendorf
- 2) Mezclar solución (dependiendo el número de muestras)
- 3) Agitar en el vortex
- 4) A cada tubo poner 3 µl de muestra y 25 µl de la mezcla, para lograr un volumen final para la amplificación por muestra de 25 µl.

Los ciclos y la mezcla para la amplificación varía de acuerdo a la PCR a aplicar.

PCR cyb (control interno)

Reactivos	Cantidad por reacción (µl)
Agua	1.9
Buffer	2
DNTPS	2
MgCl	16
Oligo cyb1	5
Oligo cyb2	5
TAQ polimerasa	.05
ADN	2
VOLUMEN FINAL	33.95

PROTOCOLO DE LA AMPLIFICACIÓN

Pre calentamiento	94°C	15 min	}	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30 seg		}
Alineamiento	58°C	30 seg		
Extensión	72°C	30 seg		
Extensión final	72°C	7 min		
Almacenamiento	4°C	∞		

PCR SIMPLE (Para amplificación del gen de la MPB70).

Reactivos	Cantidad por reacción (µl)
Agua	1.5
Master-mix	12.5
Oligo TB1-F	4
Oligo TB1-R	4
ADN	3
VOLUMEN FINAL	25

PROTOCOLO DE LA AMPLIFICACIÓN

Pre calentamiento	96°C	15 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30 seg	} 29 ciclos
Alineamiento	58°C	30 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	5 min	
Almacenamiento	4°C	∞	

PCR ANIDADO

Reactivos	Cantidad por reacción (µl)
Agua	2
Master-mix	12.5
Oligo M22/3	4
Oligo M22/4	4
Producto amplificado de PCR simple	2.5
VOLUMEN FINAL	25

PROTOCOLO DE LA AMPLIFICACIÓN

Pre calentamiento	96°C	15 min		1 ciclo
Desnaturalización	94°C	30 seg	}	40 ciclos
Alineamiento	71°C	30 seg		
Extensión	71°C	30 seg		
Extensión final	72°C	10 min		
Almacenamiento	4°C	∞		

Con el fin de evaluar si existe producto de amplificación, se procede a realizar un corrimiento en geles de poliacrilamida al 12%.

PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Reactivos para gel de corrimiento	12%	10%	* 5 ml
Solución de acrilamida-bisacrilamida	6.250ml	5ml	0.625ml
Buffer pH 8.8 (6.8*)	1.875ml	1.875ml	1.250ml
SDS 10%	0.150ml	0.150ml	0.050ml
Persulfato de amonio 1.5%	0.750ml	0.750ml	0.750ml
H ₂ O	5.975ml	5.975ml	2.825ml
TEMED	10µl	10µl	5µl

*Para realizar gel de concentración

TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA

1. Separa los vidrios del gel tras el corrimiento electroforético.
2. Separar el gel usando una solución de ácido acético glacial y etanol (5ml en 45ml de agua) agitar durante 15min.
3. Retirar la solución y adicionar la solución de tinción de nitrato de plata (500µl de nitrato de plata en 50ml de agua) y agitar durante 15min.
4. Retirar la solución y lavar dos veces con agua milliQ
5. Agregar la solución de revelado (400µl de formaldehído y aforar a 50ml con hidróxido de sodio al 3%)

6. Agregar la solución de paro (500µl de ácido acético glacial concentrado y aforar a 50ml con agua milliQ).

(Bunschoten et al., 1996)

Anexo VII. TECNICA DE SPOLIGOTYPING

VII.I Amplificación *in vitro* de los espaciadores en el ADN por medio de la técnica de PCR.

1. Diluir el ADN de las muestras a la concentración necesaria. Incluyendo siempre el ADN cromosomal de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv and *M.bovis* BCG como controles positivos. Usar agua como el control negativo.

Primers:

DRa: 5´ - GGT TTT GGG TCT GAC GAC – 3´

DRa: 5´ - CCG AGA GGG GAC CGA AAC – 3´

2. Preparar la mezcla de la reacción:
 - a) X µl DNA molde (20ng)
 - b) 4 µl primer DRa (20 pmol) (marcado com biotina)
 - c) 4 µl primer DRb (20 pmol)
 - d) 4 µl mezcla de dNTP (2.5 de cada dNTP, concentración final de 0.2 mM para cada dNTP)
 - e) 5 µl 10x Super concentrado del buffer *Tth*
 - f) 0.1 µl Super polimerasa *Tth* (5units/µ)
 - g) 33-x µl agua MQ (a um volumen final de 50 µl)
3. Agregar una gota de aceite mineral a los tubos para evitar la evaporación de la mezcla del PCR durante la amplificación.
4. Poner los tubos en el aparato de PCR para amplificar con el siguiente protocolo:

3 min a 96°C

1 min a 96°C

1 min a 55 °C

30 seg a 72°C

} 20 ciclos

5 min a 72 °C

VII.II Hibridación con los productos de la PCR y su detección.

1. Todos los buffer deben ser precalentados para su uso. Preparar los siguientes buffers usando agua desmineralizada para las diluciones (cantidad para una membrana):

a) 250 ml 2XSSPE/0.1% SDS, 60°C.

b) 250 ml 2XSSPE/0.5% SDS, 60°C.

c) 250 ml 2XSSPE/0.5% SDS, 42°C.

d) 250 ml 2XSSPE temperatura ambiente.

2. Agregar 20 µl de los productos de PCR a 150 µl 2XSSPE/0.1% SDS.

3. Desnaturalizar la dilución del producto de la PCR por 10 min a 99°C e inmediatamente colocar sobre hielo.

4. Enjuagar la membrana 2 veces con agua miliQ estéril.

5. Lavar la membrana por 5 min a 60°C en 250 2XSSPE/0.1% SDS.

6. Colocar la membrana en el miniblotted MN45.

7. Remover los residuos líquidos de los carriles del miniblotted por medio de aspiración.

8. Llenar las celdas con el producto diluido del PCR (evitar la formación de burbujas), e hibridar por 60 min a 60°C en una superficie horizontal (NO AGITAR). Evitar la contaminación entre celdas.

9. Remover las muestras del miniblotted por aspiración y tomar la membrana del miniblotted usando forceps.

7. Lavar la membrana dos veces en 250 ml 2xSSPE/0.5%SDS a 60°C durante 10 min.

8. Poner la membrana enrollada dentro de un tubo transparente y permitirle enfriar para evitar la inactivación de la peroxidasa en el siguiente paso.

9. Agregar 2.5 μ l de conjugado de estreptavidin-peroxidasa (500U/ml) a 10 ml de 2xSSPE/0.5%SDS e incubar la membrana en esta solución por 45 a 60 min. a 42°C enrollada y dentro del tubo. (Si la membrana, tiene más de 15 usos hibridar hasta 1:15hrs).
10. Lavar la membrana dos veces en 250 ml 2xSSPE/0.5% SDS por 10 min. a 42°C.
11. Colocar la membrana dos veces en 250 ml 2xSSPE/0.5% SDS por 5 min. a temperatura ambiente.
12. Para la detección de las hibridaciones del ADN, sacar la membrana, ponerla sobre un acetato y adicionar sobre la membrana el reactivo de ECL (3ml de cada reactivo) hasta que se cubra bien (aprox. 20 ml) y colocar otro acetato sobre la membrana. Incubar durante 1min a 37°C.
17. Cubrir la membrana con una hoja de plástico transparente o Saran-wrap y exponer a la membrana a la luz por 20 min.
10. Colocar la membrana en un cassette para rayos X en un cuarto oscuro y sobreponer una película de rayos X sobre los acetatos, cerrar el casete y dejar en exposición durante 20 a 60min (según el uso de la membrana).
11. Revelar la película durante 1min, lavar la película durante 10seg y fijar durante 2min. Finalmente enjuagar la película durante 10seg y observar.

VII.III Regeneración de la membrana.

12. Después de usar la membrana lavarla con SDS10% (5ml de SDS10% y aforar a 50ml con agua destilada) a 80°C durante 30min, descartar la solución. Este paso se hace dos veces.
13. Agitar durante 15 min con EDTA pH 8.0 200mM (5ml de EDTA 200nM pH 8 y aforar a 50ml con agua destilada) a temperatura ambiente y descartar la solución.
14. Agregar EDTA (5ml de EDTA 200nM pH 8 y aforar a 50ml con agua destilada) y refrigerar.

15. Almacenar la membrana a 4°C hasta su uso (sellarla en plástico o envuelta en un acetato o Saran-wrap para evitar la deshidratación de la membrana).

VII.IV Elaboración de reactivos adicionales.

20xSSPE

0.2 M Na₂HPO₄*2H₂O 35.6 g/l

3.6 M NaCl 210.24 g/l

20 mM EDTA 7.4 g/l

El pH debe ser de 7.4.

Almacenar a temperatura ambiente por no más de un año.

2xSSPE

Diluir 20xSSPE diez veces con agua desmineralizada.

10% SDS

10g SDS/100 ml de agua desmineralizada.

2xSSPE/0.1%SDS

Agregar 100 ml 20xSSPE y 10 ml de SDS al 10% en 890 ml de agua desmineralizada.

2xSSPE/0.5%SDS

Agregar 100 ml 20xSSPE y 50 ml de SDS al 10% en 850 ml de agua desmineralizada.

**Anexo VIII. FORMATOS DE EPI-INFO PARA LA CAPTURA DE INFORMACIÓN
EPIDEMIOLÓGICA DE:**

“INFORMACIÓN DEL RANCHO”

1. Nombre del rancho: _____ ID: _# #
2. Ubicación del Rancho: _____
3. Población Animal Total: # # # Introdutor (es): _____
4. Realiza diagnóstico de tuberculosis: #
1=Sí 2=No.
5. Alguno de sus animales presenta tuberculosis? #
1=Sí 2=No.
6. Se desecha los animales enfermos de tuberculosis: #
1=Sí 2=No 3=A veces.
7. En caso de no desechar a los animales tuberculosos, qué hace con ellos? _____

8. Vende o regala leche a particulares o a sus empleados? #
1=Sí 2=No 3=A veces.
9. La leche que produce es de autoconsumo? #
1=Sí 2=No 3= A veces.
10. Pertenece a una empresa láctea: #
1=Sí 2=No
11. En caso de ser si la anterior: #
1=ALPURA 2=LALA 3=LACDEL 4=ARACELI 5=QUERÉTARO 6=OTRA
¿Cuál? _____
12. Sabe SI alguno de sus empleados esta enfermo de tuberculosis o VIH/SIDA? #
1=Sí, VIH/SIDA 2=Sí, Tuberculosis 3=Sí, ambas 4=No 5=Desconozco
13. Dentro de las instalaciones del rancho hay sanitario disponible para os empleados? #
1=Sí, todos 2=No, ninguno 3=Algunos.
14. Sus empleados cuentan con servicios de salud? # ¿Cuál? #
1=Sí, todos 2=No, ninguno 3=Algunos. 1=IMSS 2=ISSTE 3=Otro.
15. Cuando los empleados presentan enfermedad respiratoria toman reposo en casa de varios días? #
1=Sí 2=No 3=A veces.

“CUESTIONARIO INDIVIDUAL A EMPLEADOS DE RANCHOS PARTICIPANTES”.

1. Nombre Completo: _____ ID _ # #
2. Sexo: #
1=Femenino 2=Masculino.
3. 3. Edad # # (años).
4. Dirección: _____
5. Actividad que desempeña dentro del rancho: _____
6. Tiene animales en casa o convive con ellos frecuentemente? #
1=Sí 2=No.
7. Fuma? #
1=Sí 2=No.
8. Sufre de enfermedades respiratorias frecuentemente? #
1=Sí 2=No 3= A veces.
9. Sufre de alergias? #
1=Sí 2=No.
10. Tiene tos frecuentemente? #
1=Sí 2=No.
11. En caso de presentar tos, ésta es: #
1=Con flema 2=Seca 3=Ambas.
12. Le han indicado alguna vez se realice un diagnóstico de TB por presentar sospechas de ésta? #
1=Sí 2=No.
13. En caso de responder Sí a la anterior, Cuál fue el resultado? #
1=Positivo 2= Sospechoso 3=Negativo.
14. Alguna vez se ha realizado un diagnóstico para VIH/SIDA? #
1=Sí 2=No.
15. En caso de responder Sí a la anterior, éste resultó: #
1=Positivo 2=Negativo 3=Sospechoso.
16. Conoce o sabe de alguna persona enferma de tuberculosis? #
1=Sí 2=No.
17. Convive con alguna persona o familiar con tuberculosis? #
1=Sí 2=No 3= A veces.

18. Consume o alguna vez ha consumido leche bronca (cruda)? #
1=Sí 2=No 3= A veces.

19. Consume o ha consumido queso preparado de manera artificial? #
1=Sí 2=No 3= A veces.