

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO



---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTÉCNIA

PRESENCIA DE *Mycobacterium Bovis* EN MUESTRAS DE  
QUESO FRESCO Y LECHE, POR PRUEBAS  
MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES, PROVENIENTES DE  
PUNTOS DE VENTA DEL ESTADO DE MÉXICO E HIDALGO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA :

RAÚL ARTURO NIETO MENDOZA

Asesor:

MVZ. Dr. CSP. Orbelin Soberanis Ramos.

MVZ. MSP. Jorge Cárdenas Lara



Ciudad Universitaria, Cd. Mx. 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## DEDICATORIA

*Le dedico éste trabajo a mis padres José Arturo Nieto Valdés y María Inés Mendoza Torres ya que sin sus enseñanzas y educación que me brindaron esto no hubiera sido posible; a mi hermano Alan por creer en mí, su cariño, consejos, apoyo y palabras de aliento que siempre me han permitido seguir adelante en todos los aspectos de mi vida aún cuando he estado por tirar la toalla; a mi hermana Alma por su apoyo, al Sr. José Aquino por apoyarme dándome trabajo durante toda mi carrera, sin duda una pieza fundamental para terminar mi licenciatura; a Sara Rodríguez ya que a ella le debo gran parte de la persona de bien que soy ahora, por sus consejos y apoyo que me han hecho crecer como ser humano; a mis abuelitos, el profesor Raúl Nieto y Josefina Valdés por haber formado parte de mi vida y darme el ejemplo de hacer siempre lo correcto y hacer con amor todo en mi vida; a mi pareja, mejor amiga, novia y compañera de vida Mitzi Gastañeda, por su confianza, amor, paciencia, comprensión, apoyo incondicional, mil gracias amor por estar siempre ahí y caminar a mi lado en ésta vida y por último pero no menos importante a mis amigos Irvin, Karla, Carlos y Lazil que siempre me apoyaron y aconsejaron toda mi carrera, así como a todas las personas que directa e indirectamente influyeron y me motivaron a seguir adelante.*

*A todos, ¡gracias!*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi sincera gratitud a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el apoyo económico recibido para la realización de ésta tesis, a través del proyecto PAPIME 201713 “Aplicación de la biología molecular en la inocuidad de los productos y subproductos lácteos para el fortalecimiento de la enseñanza de la medicina veterinaria y zootecnia”; a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de forjarme en sus aulas; a mis asesores, el Dr. Orbelin Soberanis Ramos y el Dr. Jorge Cárdenas Lara por estar siempre al pendiente y apoyarme en todo sentido así como para la realización de éste trabajo; a la Dra. Rosalinda Acosta Salinas, al Dr. Víctor Martínez Juárez y al Dr. Adrian Zaragoza por sus enseñanzas, asesorías y completa disponibilidad; al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por brindarme la oportunidad de llevar a cabo la fase experimental del presente trabajo en sus instalaciones.

¡Gracias!

## CONTENIDO

|                            | Página |
|----------------------------|--------|
| RESUMEN.....               | 1      |
| INTRODUCCIÓN.....          | 3      |
| Agente etiológico.....     | 5      |
| Diagnóstico.....           | 6      |
| Tuberculosis bovina.....   | 11     |
| Tuberculosis humana.....   | 15     |
| Justificación.....         | 18     |
| Hipótesis.....             | 20     |
| Objetivo general.....      | 21     |
| Objetivos específicos..... | 21     |

|  |    |
|--|----|
| MATERIAL Y MÉTODOS.....  | 22 |
| Metodología para el aislamiento de <i>M. bovis</i> a partir de queso.....      | 23 |
| Metodología para el aislamiento de <i>M. bovis</i> a partir de leche.....      | 24 |
| Metodología para la extracción de ADN a partir de queso.....                   | 25 |
| Metodología para la extracción de ADN a partir de leche.....                   | 27 |
| Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de <i>M. bovis</i> ..... | 27 |
| RESULTADOS.....  | 28 |
| DISCUSIÓN.....   | 32 |
| REFERENCIAS.....   | 37 |
| FIGURAS.....   | 44 |

## RESUMEN

NIETO MENDOZA RAÚL ARTURO. Presencia de *Mycobacterium bovis* en muestras de queso fresco y leche, por pruebas microbiológicas y moleculares provenientes de puntos de venta del Estado de México e Hidalgo (bajo la dirección de: MVZ, Dr. CSP. Orbelín Soberanis Ramos y MVZ. MSP. Jorge Cárdenas Lara)

La tuberculosis bovina es un problema que afecta la producción pecuaria nacional y se considera un problema de salud pública. En nuestro país el 7.6% de los casos de tuberculosis humana tienen su origen por el contagio de los animales y se transmite principalmente por la ingestión de la leche y productos lácteos no pasteurizados, ya que más del 30% de la leche producida se vende cruda<sup>1</sup>. Las personas que habitan alrededor de las cuencas lecheras, donde la prevalencia de ésta enfermedad en bovinos es mayor, tienen mayor riesgo de llegar a consumir productos contaminados con *M. bovis* y contraer la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue el aislamiento bacteriológico de *M. bovis* (cultivo en medios Lowenstein Jensen, Stonebrink y Midlebrook) y realización de pruebas moleculares (PCR), en muestras de leche bronca y queso fresco artesanal de expendios del municipio de Tecamac Estado de México, Tizayuca y Tulancingo, Hidalgo los cuales se seleccionaron mediante un muestreo por conveniencia.

Se obtuvieron 72 muestras de queso y 28 de leche en tiendas de abarrotes,

cremerías, tianguis, establos y boteros, las cuales fueron transportadas al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en donde fueron procesadas.

Del total de muestras (100), se obtuvieron 4 muestras positivas al aislamiento en cultivo, y una de éstas muestras, positiva al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) corroborado por PCR, mientras que las 3 muestras restantes fueron reportadas como *Mycobacterium spp.* Lo cual, nos indica que existe un problema de salud pública debido a que la presencia de micobacterias del CMTB en leche y queso constituye un importante riesgo de infecciones futuras por el consumo de éste tipo de productos.

## INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su reporte global de la tuberculosis (TB), reportó que en 2015 existieron 9.6 millones de casos de TB en todo el mundo, en tanto que 1.5 millones de personas murieron a causa de esta enfermedad. Para el continente americano se estimó que la incidencia fue de 390 mil personas de una población de 961 millones y para México se estimó que la incidencia de TB fue de 40 mil casos en una población de 121 millones de personas<sup>2</sup>; por tal motivo la TB sigue siendo una enfermedad de importancia y de seguimiento obligatorio para la OMS.

La TB es causada por bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, las especies que conforman este complejo presentan una similitud genética muy estrecha, ya que son similares en un 99.9% a nivel de nucleótidos (secuencias RNAr 16 S). Sin embargo hay diferencias fenotípicas entre las especies en cuanto a huéspedes preferenciales y su patogenicidad<sup>3</sup>. Las especies que componen este complejo son: *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canettii* que principalmente infectan al humano; en tanto que *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. caprae*, estos infectan a animales, a roedores, focas y cabras respectivamente. Otro miembro más de éste complejo es *M. bovis* el cual es capaz de infectar a un amplio número de hospederos, incluyendo al ser humano, por lo que es considerado el principal agente zoonótico de la historia<sup>4</sup>. La transmisión de éste patógeno ha sido ampliamente descrita y ocurre principalmente por el contacto estrecho con ganado infectado. Las principales especies que causan la

tuberculosis en seres humanos y animales son *M. tuberculosis* y *M. bovis* respectivamente. La transmisión efectiva de la enfermedad depende de diversos factores, que incluyen la frecuencia de excreción del agente, la vía de infección, dosis infecciosa, periodo de exposición y la susceptibilidad del huésped. Los bacilos se propagan principalmente a través del aire, en aerosoles formados cuando los individuos enfermos con TB pulmonar tosen o escupen. La TB afecta a las vías respiratorias causando TB pulmonar, pero puede afectar a otros órganos y se manifiesta como TB extrapulmonar o extenderse a todo el cuerpo presentándose la TB miliar.

La transmisión de tuberculosis causada por el consumo de alimentos contaminados está asociada con la infección principalmente en el tracto gastrointestinal. El consumo de leche o productos elaborados con leche sin pasteurizar procedentes de ganado infectado con tuberculosis bovina (TBb) y contaminado con bacilos podría ser una fuente de infección<sup>5</sup>.

De acuerdo con lo publicado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América, menos del 2% de los casos reportados de tuberculosis son causados por *M. bovis*. La disminución y casi eliminación de ésta enfermedad en los Estados Unidos se ha logrado gracias al control de ésta enfermedad en el ganado bovino y la pasteurización rutinaria de la leche de bovino.<sup>6</sup> El CDC indica que es común que las personas se infecten por el consumo de productos lácteos no pasteurizados.

## Agente etiológico

*Mycobacterium bovis* es un microorganismo bacilar, aerobio, ácido alcohol resistente, no formador de esporas, inmóvil y considerado gram positivo aunque no se tiñe muy bien con esa técnica. Son microorganismos intracelulares, aerobios estrictos, de multiplicación directa, su crecimiento en laboratorio es muy lento, con un tiempo de generación aproximada de 15 a 20 horas y las colonias pueden ser visibles alrededor de las 8 semanas<sup>7</sup>. Presenta un elevado porcentaje de guanina y citosina en su ADN. Cuentan con una pared celular de estructura poco común, que es difícil de teñir con los colorantes de anilina de uso habitual. El ácido micólico es el mayor constituyente de su envoltura celular, ocupando aproximadamente el 50% del peso de la misma<sup>8</sup>; más del 60% de su pared celular está constituida por lípidos, los cuales le brindan la característica de ser ácido-alcohol resistente (BAAR), propiedad que se demuestra mediante las tinciones de Ziehl Neelsen (ZN) y auramina fenolada<sup>2</sup>.

El microorganismo crece lentamente a 37°C; tiene una resistencia moderada al calor, a la desecación, a la acción de anticuerpos<sup>9</sup>, a varios desinfectantes como el bromuro de lauril dimetil bencil amonio, polimetilen diurea entre otros<sup>10</sup> y puede sobrevivir a un amplio rango de pH, es capaz de permanecer viable por un largo periodo en el suelo húmedo y cálido, en la materia fecal del ganado se tiene indicios de que puede sobrevivir de 1 a 8 semanas<sup>11</sup>.

## Diagnóstico

### Aislamiento y cultivo

Para el aislamiento de *M. bovis* se utilizan medios de cultivo sólidos elaborados a base de huevo como es el medio Löwenstein-Jensen (LJ) y el medio Stonebrink (SB) el cual contiene piruvato de sodio<sup>12</sup>. Se incuba durante 8 semanas a 37°C y pueden mantenerse con o sin CO<sub>2</sub><sup>13</sup>. Generalmente, en muestras con baciloscopia 3+ (se observan más de 10 bacilos por campo en promedio en 20 campos observados), *M. bovis* evidencia desarrollo dentro de las primeras 3 semanas de incubación en medios a base de huevo, y dentro de los primeros 10 días en medios más ricos. A partir de muestras con muy escasos bacilos como es el caso en la mayoría de los subproductos lácteos, las colonias aparecen tardíamente, aproximadamente hasta las 8 semanas después de la siembra en medios hechos a base de huevo y hasta 6 semanas de ser sembradas en agar o caldos enriquecidos.<sup>14,15</sup>.

La incubación a 37°C es prolongada y se debe hacer en tubos, viales o botellas que además de ofrecer bioseguridad, eviten la desecación. A la vez el bacilo es aerobio estricto y por eso debe quedar atrapada una atmósfera de oxígeno dentro del tubo, vial, botella o placa. En general es mejor el desarrollo en tubos grandes. Las placas con agar son colocadas dentro de bolsas de polietileno para evitar la

deseccación pero deben ser permeables al pasaje del aire. Una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 10% durante la primera semana de incubación favorece el desarrollo de las micobacterias en caldos o medios con agar, aunque no es indispensable<sup>15</sup>.

El crecimiento de las colonias en el medio LJ es pobre o nulo en el cultivo primario<sup>16</sup> cuando contiene glicerol, por esta razón se añade piruvato de sodio en lugar de glicerol para el aislamiento de *M. bovis*<sup>12</sup>, ya que ésta micobacteria no puede procesar el glicerol o lo hace con mucha dificultad, y por tal motivo prefiere un medio con piruvato o glutamato de sodio<sup>15</sup>. Si *M. bovis* crece en medio LJ las colonias suelen ser pequeñas (1 a 1.5 mm), de color blanco a crema<sup>16</sup>, con el tiempo es posible que lleguen a tomar una forma piramidal<sup>17</sup>. En el medio SB se forman colonias generalmente pequeñas (1 a 2 mm), de color blanco, ligeramente cremoso que suelen estar dispersas. En el examen microscópico al teñirlos con ZN se pueden observar bacilos largos ácido-alcohol resistentes (color rojo) de 1 a 3 x 0.5 µm<sup>16</sup>, que pueden observarse en forma de cordones<sup>17</sup>. Para la prueba de catalasa, a temperatura ambiente, *M. bovis* es positivo y es inactivada (negativo) a 68°C, también es negativo en la prueba de pirazinamida<sup>18</sup>, en la prueba de la ureasa, *M. bovis* es positivo y negativo para nicotaminidasa<sup>14</sup>. Sin embargo, los resultados de las pruebas bioquímicas convencionales son a menudo ambiguos y difíciles de reproducir y, en cualquier caso, el tiempo requerido para su realización es largo, dado que se requiere un crecimiento abundante. Además se han descrito cepas de *M. bovis* sensibles a la pirazinamida<sup>18</sup>.

## **Prueba de la tuberculina**

El principal método diagnóstico para la tuberculosis bovina es la prueba de la tuberculina, la cual consiste en la inyección intradérmica del derivado proteico purificado (PPD) bovino y la consiguiente detección de la induración que ocasiona en el sitio de inoculación 3 días (72 horas) después, debido a una hipersensibilidad retardada tipo IV<sup>14</sup>.

El PPD bovino utilizado para la prueba de tuberculina es elaborado a partir de la cepa AN5 de *M. bovis*. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) mediante la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 “Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina” autoriza su aplicación en las pruebas: caudal, cervical, comparativa y cervical simple<sup>19</sup>.

La prueba de la tuberculina con la aplicación de PPD en humanos, se llevará a cabo de acuerdo a las especificaciones siguientes: Estudio de contactos menores de 15 años, apoyo al diagnóstico diferencial de tuberculosis y estudios epidemiológicos. La dosis es de un decimo de mililitro de PPD-RT23 o de PPD-S, por vía intradérmica en la cara externa del antebrazo izquierdo; una induración de 10 milímetros o más, indica reactor a la población general, en los pacientes con VIH positivos o con SIDA, se considera reactor al que presenta una induración de 5 o más milímetros<sup>20</sup>

## **Identificación de *M. bovis* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El aislamiento y cultivo de *M. bovis* es el método diagnóstico considerado la prueba de oro para su detección. Sin embargo la posibilidad de encontrar micobacterias viables no cultivables en algunas muestras requieren de métodos más adecuados<sup>3</sup>. Por tal motivo en el campo de la Biología Molecular se han desarrollado técnicas que permiten la detección de los genes de microorganismos, las cuales tienen la característica de ser altamente sensibles y altamente específicas, por ejemplo la PCR-multiplex desarrollada por Talbot y colaboradores<sup>21</sup> por citar alguna, reporta un 100% de sensibilidad y especificidad para la identificación de BCG entre cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), además éstas técnicas permiten obtener resultados en un periodo corto de tiempo<sup>22,23</sup>. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) permite la amplificación enzimática, in vitro, de una región específica de ADN, la cual es delimitada por oligonucleótidos de secuencia conocida.

La PCR se basa en el mecanismo de la replicación in vivo del ADN<sup>24</sup>; en donde la doble cadena que conforma al ADN se desenrolla y forma el ADN monocatenario, el cual es posible duplicar, por acción de enzimas denominadas ADN polimerasas, cuando el ADN es completamente copiado, se vuelve a formar la doble cadena y se enrolla. Siguiendo este principio natural Kary Mullis y colaboradores

desarrollaron ésta técnica en 1985; dicha técnica consiste en 3 pasos básicos que se repiten de manera cíclica:

1. En el primer paso, **la desnaturalización**<sup>24, 25</sup> las moléculas de ADN presentes en la muestra son desnaturalizadas por calor, a más de 90°C; la desnaturalización del ADN consiste en la ruptura de los puentes de hidrogeno que mantienen unidas a las 2 cadenas antiparalelas de la que conforman la cadena de ADN, de ésta forma se obtienen 2 moléculas de ADN monocatenario.

2. El segundo paso **de alineamiento**<sup>24, 25, 26</sup>, involucra la unión de 2 fragmentos de ADN monocatenario sintético, cuya secuencia es complementaria a los extremos de la región que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos actuaran como iniciadores de la reacción de polimerización.

Los iniciadores que más se han descrito son los diseñados a partir de secuencias nucleotídicas IS6110, IS1081 y 16Sr ARN, ya que solo están presentes en las especies que integran al CMTB<sup>23</sup>.

3. El último paso en la PCR es **la extensión**<sup>25</sup>, que involucra la unión de la enzima DNA polimerasa y al dúplex ADN molde-ADN iniciador. Una vez formado el complejo, se inicia la polimerización de desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTP's), por complementariedad, a partir del extremo OH-3' libre del iniciador, para que esto ocurra se requiere que en el medio de reacción, existan dNTP's libres, así como iones magnesio, cofactor esencial para la DNA polimerasa.

## TUBERCULOSIS BOVINA

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa causada por *M. bovis* que afecta al ganado bovino, a otras especies salvajes y al humano. Suele caracterizarse por la formación de granulomas nodulares denominados tubérculos. Aunque habitualmente se define como enfermedad crónica debilitante, la tuberculosis bovina en ocasiones puede presentar un curso más progresivo. Puede afectar cualquier tejido del organismo, pero se observan lesiones con mayor frecuencia en los ganglios linfáticos de la cabeza y el tórax, los pulmones, el intestino, el hígado, el bazo, la pleura y el peritoneo.

En muchos casos, el curso de la infección es crónico y puede no haber signos clínicos, ni siquiera en casos avanzados, en los que puede haber muchos órganos afectados. Cuando los hay, los signos clínicos varían; la afectación pulmonar podría manifestarse por tos, que puede ser inducida por cambios de temperatura o ejerciendo una presión manual sobre la tráquea. La disnea y otros signos de neumonía de grado bajo también constituyen un indicio de afectación pulmonar <sup>27</sup>.

La infección tuberculosa es principalmente pulmonar, en un 90% de los casos causada por la inhalación de pequeñísimas gotas procedentes de la respiración de un animal enfermo e infectado con micobacterias tuberculosas; estas partículas pequeñas reciben el nombre de gotas de Pflugge <sup>28</sup>.

Cuando un animal no sensibilizado previamente, inhala bacilos tuberculosos, las barreras mecánicas de las vías respiratorias altas y el sistema mucociliar de la

mucosa bronquial eliminan las partículas grandes, las que tienen un diámetro menor o igual a 5  $\mu\text{m}$  alcanzan un alveolo <sup>28</sup>, los bacilos son fagocitados por los macrófagos, que luego interactúan con las células involucradas en la respuesta inmune innata y adquirida dentro de los linfonodos del tejido <sup>29</sup>.

En casos avanzados, los ganglios linfáticos a menudo están muy aumentados de tamaño y podrían obstruir las vías respiratorias, el tracto digestivo o vasos sanguíneos. Los ganglios linfáticos de la cabeza y el cuello podrían resultar visiblemente afectados y a veces romperse y vaciarse. La afectación del tracto digestivo se manifiesta por una diarrea intermitente y constipación en algunos casos. Puede producirse emaciación extrema y dificultad respiratoria aguda durante las fases terminales de la tuberculosis. Pueden aparecer lesiones que afecten a los genitales en las hembras. Los genitales de los machos casi nunca resultan afectados <sup>27</sup>.

La característica formación de lesiones granulomatosas se observa con más frecuencia en los linfonodos bronquiales, mediastínicos, portales y los de la cabeza (submaxilares, retrofaringeos y parotídeos) <sup>19</sup>. Los linfonodos pueden ser el único tejido infectado, además de los pulmones, el hígado, el bazo y las superficies de las cavidades del cuerpo <sup>27</sup>.

Es importante hacer mención de la presencia de lesiones tuberculosas en la glándula mamaria. La mastitis tuberculosa aparece de manera tardía en la evolución de la enfermedad, es de desarrollo insidioso porque no muestra signos de inflamación aguda ni cambios en el aspecto de la leche <sup>30,31</sup>.

*Mycobacterium bovis* se ha identificado en seres humanos en la mayoría de países donde se han caracterizado por completo cepas de micobacterias de pacientes humanos. La incidencia de tuberculosis pulmonar causada por *M. bovis* es mayor en trabajadores de explotaciones ganaderas y de mataderos que en habitantes urbanos. La transmisión de *M. bovis* al ser humano por la leche y sus productos se elimina mediante la pasteurización de la leche. Uno de los resultados de los programas de erradicación de la tuberculosis bovina ha sido una reducción de la enfermedad y las muertes causadas por la tuberculosis bovina en la población humana <sup>27</sup>.

Diversos estudios realizados mencionan la infección tuberculosa en glándula mamaria, entre ellos se encuentran el trabajo de Doran y colaboradores <sup>32</sup>, el cual describe un aumento de casos de tuberculosis en el ganado y en las personas que habitan en una granja lechera, a raíz del consumo de leche infectada con el bacilo tuberculoso de una vaca de 7 años con mastitis tuberculosa. La leche infectada fue utilizada para alimentar a los becerros del nacimiento al destete y la familia la consumía directamente del tanque sin pasteurizar. Veinticinco de veintiocho becerros fueron positivos a la prueba de la tuberculina, así como 5 de 6 miembros de la familia <sup>32</sup>.

Otra fuente de infección además de la vía aerógena, es la digestiva, la cual ocurre por el consumo de alimentos contaminados, agua o incluso fómites, así como calostro o leche de vacas con la infección <sup>33</sup>.

La tuberculosis bovina (TBb) es una de las enfermedades más problemáticas que enfrenta la ganadería nacional, ya que, además de representar un riesgo para la salud animal, se traduce en grandes pérdidas económicas directas e indirectas y determina uno de los principales obstáculos para la movilización y comercialización nacional e internacional de nuestro ganado <sup>34</sup>.

Las pérdidas económicas directas por causa de la presencia de tuberculosis en hatos bovinos consisten en: pobre desarrollo de los animales, retención de canales en rastros, decomiso parcial o total de canales, disminución en la producción láctea (calculada en 17%), menor producción de terneras (estimada en un 15%), animales desechados prematuramente, pérdida de genética al desechar el pie de cría infectado.

A las pérdidas directas deben añadirse aquellas relacionadas con el costo del control de la enfermedad, que frecuentemente implica la necesidad de sacrificar a los animales reactivos.

De las pérdidas indirectas, aunque no se cuantifiquen, se estima que son considerables y se originan por: Costos sanitarios por manejo adicional, pérdida de mercados potenciales, problemas socioeconómicos por incrementos de los costos de producción y de mercado (aumento de precios al consumidor) <sup>34</sup>.

De acuerdo con lo publicado en la página web del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), la superficie nacional en fase de erradicación de la TBb es del 84.13%, en la zona de erradicación existe una

prevalencia de la enfermedad del 0.5% y la prevalencia promedio en las zonas de control es del 2.05%, excepto en las cuencas lecheras donde existe una prevalencia estimada del 16.5% <sup>35</sup>.

## **TUBERCULOSIS HUMANA**

La tuberculosis es una enfermedad sistémica, crónica que afecta principalmente al sistema respiratorio; es causada por las bacterias pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) y la principal bacteria del complejo transmisora de la enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis* <sup>1</sup>.

El periodo de incubación dura desde el momento de la infección hasta que aparecen las lesiones primarias (4-12 semanas); sin embargo el riesgo de transmisión puede persistir toda la vida cuando la tuberculosis permanece como infección latente (TBL). El grado de transmisibilidad depende del número de bacilos eliminados, de su virulencia y de las oportunidades de formación de aerosoles en el acto de toser. El periodo de transmisión se mantiene mientras se expulsan bacilos infecciosos. La tuberculosis extrapulmonar no se transmite en ausencia de secreciones <sup>36</sup>.

La transmisión de *M. tuberculosis* ocurre por la inhalación de gotitas que se propagan por el aire, provenientes de personas infectadas al toser, hablar o escupir <sup>37</sup>. Cerca de 10% de los individuos que contraen la infección, a la larga presentan enfermedad activa, la mitad de ellos durante los 2 primeros años después de infectarse; 90% de los individuos infectados no tratados, jamás

padecerán tuberculosis activa (TBA). En algunas personas, la infección inicial puede evolucionar rápidamente hasta convertirse en TBA. Esto es más común en los lactantes, en quienes la enfermedad con frecuencia adopta la forma diseminada (Tuberculosis miliar) o meníngea y en los individuos inmunodeprimidos como los seropositivos para VIH <sup>38</sup>.

La segunda causa más común de tuberculosis humana (TBh) es *M. bovis* <sup>39</sup>, que es indistinguible clínica, radiológica y patológicamente de *M. tuberculosis* <sup>33</sup>.

En los países donde la TBb no está controlada la mayoría de los casos humanos se presentan en personas jóvenes, como resultado de beber leche o consumir productos lácteos no pasteurizados contaminados con *M. bovis*, esta forma de infección conduce a la forma extrapulmonar de la tuberculosis <sup>33</sup>.

No todas las infecciones por *M. bovis* evolucionan a la enfermedad de tuberculosis, por lo que puede que no se presente ningún síntoma. En las personas los síntomas de la enfermedad de tuberculosis causada por *M. bovis* son similares a los de la tuberculosis causada por *M. tuberculosis*; pueden incluir fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso. También se pueden presentar otros síntomas dependiendo de la parte del cuerpo afectada por la enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad en los pulmones se puede asociar con una tos, y la enfermedad gastrointestinal puede causar dolor abdominal y diarrea. Si no se recibe tratamiento la persona puede morir a causa de ésta enfermedad <sup>6</sup>.

La transmisión de *M. bovis* por consumo de alimentos contaminados con micobacterias afecta la salud pública y está sumamente influenciada por factores económicos, demográficos, hábitos y costumbres, estilos de vida entre otros <sup>40</sup>. En México, se tienen estimaciones de que el 27% del consumo nacional de leche corresponde a la no pasteurizada y el resto sufre un proceso de transformación y se consume como leche pasteurizada y ultra-pasteurizada, que tiene como finalidad reducir los niveles de microflora normal, así como la presencia de patógenos <sup>41</sup>. En el caso particular del estado de Hidalgo, se conoce que en su mayoría las personas adquieren productos como queso y leche, en tiendas de abarrotes, mercados regionales y locales, y que en el ámbito rural solamente el 2% compra en tiendas de autoservicio <sup>42</sup>.

Dentro del aspecto socio-económico de la tuberculosis es una enfermedad que afecta al desarrollo económico de la sociedad, puesto que el 75% de los individuos con tuberculosis se encuentra en el grupo de edad económicamente productivo de 15 a 54 años <sup>43</sup>.

Del mismo modo, los costos directos del diagnóstico y tratamiento son significativos para las familias de escasos recursos, la mayor pérdida económica se produce como consecuencia de los costos indirectos, debido a la pérdida de empleo, los viajes a los centros de atención médica, y particularmente la pérdida de productividad por la enfermedad y la muerte prematura <sup>43</sup>.

## JUSTIFICACIÓN

La Norma Oficial Mexicana que regula la calidad de productos lácteos (NOM-243-SSA-2010) <sup>44</sup>, en sus especificaciones sanitarias, sólo contempla a los productos elaborados con leche pasteurizada, por tal motivo, esta norma no contempla en sus análisis microbiológicos patógenos como *M. bovis*.

Sin embargo es una realidad que en muchas regiones de México aún se acostumbra consumir leche no pasteurizada, así como elaborar productos lácteos de manera artesanal, usando leche sin pasteurizar <sup>41</sup>; esto aunado a que en las cuencas lecheras a nivel nacional, incluidas las del estado de Hidalgo, la prevalencia de la tuberculosis bovina es del 16.5% de acuerdo a reportes de SENASICA <sup>35</sup>, además de deficientes medidas sanitarias y que solo el 49.1% de los productores participan en las campañas contra la tuberculosis y la brucelosis <sup>42</sup>, por lo que el consumo de leche contaminada con éste patógeno representa un alto riesgo de salud pública, ya que aquellos individuos que consuman dichos productos pueden desarrollar tuberculosis principalmente de tipo extrapulmonar.

De igual manera, como ya se mencionó anteriormente, en el caso particular del estado de Hidalgo, es común que la mayoría de las personas adquieran productos como queso y leche en tiendas de abarrotes, mercados regionales y locales <sup>42</sup> así como tianguis y por lo regular en estos puntos de venta, particularmente en los tianguis, los quesos que se venden son elaborados de manera artesanal con leche sin pasteurizar, y sigue siendo un hábito común para los pobladores de Tecamac, Tizayuca y Tulancingo comprar leche bronca directamente de los establos, en

domicilios particulares o con los boteros, así aumentando el riesgo de contraer el bacilo que causa la tuberculosis.

Por estos motivos, consideramos que es necesario realizar tanto el aislamiento microbiológico (cultivo en medios LJ, SB y Midlebrook) así como pruebas moleculares (PCR) a muestras de queso y leche que son comercializadas en puntos de venta a los cuales tiene acceso toda la población de los municipios anteriormente mencionados para que con base en los resultados obtenidos, éstos puedan ser comparados con otros estudios similares en la zona y de manera indirecta medir el éxito que han tenido las campañas contra la tuberculosis bovina en las zonas mencionadas ya que en gran medida la disminución de casos de tuberculosis bovina se verá reflejada en la cantidad de productos no pasteurizados que contengan micobacterias, y aunque en el presente estudio después de realizar la PCR a los 4 aislamientos obtenidos únicamente una muestra amplificó al CMTB, el consumo de leche cruda y quesos artesanales sigue representando un gran problema de salud pública ya que en un estudio realizado por García y colaboradores <sup>45</sup>, mencionan que aunque la tuberculosis en el ser humano es causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis* y la segunda causa es *Mycobacterium bovis*, las micobacterias atípicas o ambientales pueden producir enfermedad pulmonar, ganglionar o diseminada. La importancia de las micobacterias ambientales (MA) ha ido en aumento en relación con la mejora de los métodos diagnósticos y la descripción de los cuadros clínicos que producen, así como por la predisposición a su desarrollo evidenciada en los pacientes inmunodeprimidos, fundamentalmente por el virus de inmunodeficiencia humana

(VIH)<sup>45</sup>. No se sabe exactamente el mecanismo de desarrollo de enfermedad; se forman lesiones granulomatosas indistinguibles de las producidas por *M. tuberculosis* o *M. bovis*, por lo que se presume que la patogenia es similar. La infección pulmonar por MA se adquiere probablemente por inhalación de aerosoles procedentes de agua natural o de los sistemas de agua domésticos; otra vía de entrada es la digestiva, a través de la cual se puede desarrollar infección diseminada, incluida la pulmonar. La afección pulmonar en las micobacterias ambientales puede ocurrir en pacientes con otras enfermedades pulmonares previas o en inmunodeprimidos, aunque también se presenta en personas sin patología previa <sup>45</sup>; por lo cual, la comercialización y consumo de éste tipo de productos sin una pasteurización previa representan un riesgo de infección y un gran problema de salud pública ya que aumenta la probabilidad de que los consumidores en la zona se infecten con *M. bovis* u otro tipo de micobacteria y eventualmente padecer de tuberculosis en el futuro.

## **HIPOTESIS**

El Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) reporta que en las cuencas lecheras, como es el caso del “Complejo Agropecuario e Industrial” (CAITSA) de Tizayuca, Hidalgo tienen una prevalencia de tuberculosis bovina de 16.5%, y debido a la cercanía de los otros puntos de muestreo con éste sitio (Tecamac y Tulancingo) los productos elaborados en la cuenca se comercializan en aquellos puntos, por lo cual se considera muy probable que la leche y el queso fresco elaborado de manera artesanal que

provenza de los mencionados municipios podrían estar contaminados con *M. bovis* ya que éstos productos no están pasteurizados.

## **OBJETIVO GENERAL**

Identificar a *M. bovis* por pruebas microbiológicas en diferentes medios de cultivo y pruebas moleculares (Reacción en cadena de la polimerasa) en muestras de leche bronca y quesos frescos elaborados de manera artesanal de puntos de venta al público de los municipios de Tecamac, Estado de México, Tizayuca y Tulancingo, estado de Hidalgo, con la finalidad de determinar la inocuidad de éstos alimentos.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Aislamiento de micobacterias en muestras de queso y leche en los medios Lowenstein Jensen, Stonebrink y Midlebrook.
- Realización de la PCR punto final para identificar el gen de la región de diferencia 1 (RD1) presente en las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, con los iniciadores ET1, ET2 y ET3.
- Analizar los productos de amplificación de 150 pb a través de corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 2%

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

**Tipo de estudio epidemiológico:** Transversal

**Lugar de estudio:** Municipios de Tecamac, Estado de México, Tizayuca y Tulancingo, Estado de Hidalgo.

### **Metodología**

Se realizó un muestreo por conveniencia, el cual consistió en la elección no aleatoria de la muestra (queso y leche), se visitaron 100 expendios en los cuales tenían a la venta productos lácteos, considerando entre ellos tiendas de abarrotes, cremerías, queserías, mercados, compra directa con los boteros (en el caso de la leche), establos y tianguis en los municipios de Tecamac, Estado de México, Tizayuca y Tulancingo, estado de Hidalgo.

Los criterios de inclusión fueron: Que en los expendios los productos a la venta no estuvieran pasteurizados, en el caso de los quesos, fueron los catalogados como quesos frescos (panela, rancho, queso de aro, queso de palma y canasto). Las muestras de queso fueron de por lo menos 250 g cada una y las de leche bronca de 1 L.

Las muestras de queso se transportaron en bolsas estériles con cierre hermético, mientras que las muestras de leche fueron transportadas en envases de vidrio

estériles con tapón de rosca. Todas las muestras se conservaron a temperatura de refrigeración (4°C) durante su traslado al laboratorio.

Las muestras fueron procesadas en los laboratorios de investigación de bacteriología (para su análisis microbiológico) y de genética (para la extracción de material genético y la realización de sus respectivas PCR) del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAP) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, dichas muestras se procesaron de acuerdo a la metodología descrita a continuación:

### **Metodología para el aislamiento de *M. bovis* a partir de queso**

Se tomó una muestra de 20 g de queso, el cual fue macerado en un vaso de licuadora estéril con 30 mL de agua estéril durante 1 minuto, se agregó 7.5 mL del macerado (el resto del macerado se almacenó en un tubo estéril de crio conservación con glicerol a una temperatura de -70°C para referencias futuras <sup>16</sup>) en una suspensión de 7.5 ml de solución descontaminante (NaOH / citrato de sodio), se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando los tubos con intervalos de 5 minutos para una mejor penetración en la descontaminación, se neutralizó por adición de 30 ml de una solución de fosfatos pH 6.8 (fosfato monobásico de potasio / fosfato dibásico de sodio), se homogenizó la muestra mediante la agitación con un vórtex, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos para separar la fase sólida de la líquida del macerado, se decantó totalmente el sobrenadante colocándolo en un contenedor de polipropileno (tubo falcon de 50 ml) dejando 5 ml del precipitado junto con la pastilla formada en el momento de la centrifugación los cuales se resuspendieron junto con la pastilla

mediante el uso del vórtex, se midió el pH el cual debe ser de 7, en caso contrario, se ajusta, una vez ajustado el pH se pasaron 2 ml del descontaminado en un tubo de 2 ml para proceder a la extracción del ADN la cual se describirá más adelante y 1.5 ml para inocular con 0.5 mL un tubo con medio LJ, 0.5 mL para un tubo con medio SB y 0.5 ml para un medio MB los cuales se incubaron a 37° por 56 días (8 semanas) colocando los tubos en posición inclinada por al menos los primeros 3 días dentro de los cuales se realizó una inspección visual para verificar si hay indicios de contaminación y si la siembra está absorbida y el líquido se ha evaporado; si la siembra está absorbida, ajustar la tapa para evitar la desecación del medio. Para hacer mejor uso del espacio de la estufa de incubación, en éste momento es posible ubicar los tubos en posición vertical; posteriormente se realizó una revisión semanal de cada uno de los medios hasta que se detecte desarrollo<sup>15</sup>.

Las colonias compatibles suelen ser pequeñas (1 a 1.5 mm) de color blanco a crema, tanto en medio LJ como en SB fueron teñidas por el método de Ziehl Neelsen en el cual se pueden apreciar bacilos finos, largos e inmóviles que a veces se encuentran aislados y a veces agrupados, e identificadas definitivamente por PCR.

### **Metodología para el aislamiento de *M. bovis* a partir de leche**

Se tomó una muestra de 30 mL de leche y se colocó en un recipiente de polipropileno (tubo falcon de 50 mL), se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se decantó el suero hasta dejar 7.5 ml entre el sobrenadante y la grasa, se siguió

el protocolo descrito para el aislamiento de *M. bovis* a partir de queso desde el paso de agregar 7.5 mL de solución descontaminante (NaOH / citrato de sodio).

### **Metodología para la extracción de ADN a partir de queso**

Se depositaron 2 ml del tubo con la muestra previamente descontaminada por el método anteriormente mencionado en un tubo eppendorf de 2 ml, se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante, se conservó la pastilla a la cual se le agregó 400 µl de TE (Tris / EDTA) y se agitó en el vortex hasta que quedó perfectamente disuelta la pastilla, posteriormente se agregaron 5 µl de lisozima y se agitó nuevamente en el vortex, enseguida se metió a incubar 1 hora a 37°C, una vez terminado el periodo de incubación se agregaron 70 µl de SDS y 5 µl de proteinasa K, inmediatamente se agitó en el vortex para que dichas sustancias quedaran perfectamente disueltas, posteriormente se metió a incubar el tubo eppendorf a un baño María a 65°C hasta el día siguiente o hasta que los sólidos quedaran perfectamente desintegrados, una vez realizado lo anterior se agregaron 100 µl de NaCl 5 M y 100 µl de NaCl/CTAB y después 1 ml de fenol cloroformo isoamilico, se agitó en el vortex hasta que quedara perfectamente mezclado, después se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos para dividir la muestra en 2 fases, se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2 ml, al cual se le agregó 1 ml de cloroformo isoamilico y se volvió a agitar en el vortex a las mismas constantes mencionadas con anterioridad y el sobrenadante se pasó a otro nuevo tubo eppendorf de 2 ml al cual se le agregaron 600 µl de isopropanol puro para posteriormente dejarlo en reposo a 4°C por al menos una hora, una vez

pasado éste periodo de tiempo se procedió a centrifugar nuevamente la muestra a 12 000 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante, una vez hecho el procedimiento anterior es posible observar en la mayoría de los casos en el fondo del tubo la pastilla de ADN extraído a la cual se le realizaron lavados con etanol al 70%, agregando 1 ml de éste al tubo con la pastilla de ADN, se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante, se dejó secar el tubo con la tapa abierta a temperatura ambiente hasta que el etanol quedara completamente evaporado, después la pastilla se disolvió en agua inyectable, la cantidad de agua que se empleó para disolver la pastilla de ADN varió dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida. Para el caso de las pastillas grandes (pastilla perfectamente visible en el fondo del tubo) se disolvió en 100 µl de agua inyectable, para el caso de las pastillas medianas (pastilla visible en el fondo del tubo pero con un tamaño más reducido) se disolvió en 50 µl de agua inyectable y para el caso de las pastillas pequeñas (pastillas poco visibles o no apreciables a simple vista en el fondo del tubo) se disolvieron en 30 µl de agua inyectable. El ADN se conservó a -70°C hasta el momento de su uso.

El ADN resultante fue cuantificado por medio de un espectrofotómetro obteniendo las siguientes mediciones en las muestras de las cuales se pudieron aislar BAAR: M26: 64.9ng/µl; M55: 206.2ng/µl; M56: 224.8ng/µl; M62: 138.9ng/µl. Posteriormente, se realizó la PCR y se evaluó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, usando como control positivo la cepa AN5 de *M. bovis* (ATCC 35726) la cual amplifica a 150 pares de bases (pb) que fueron teñidos con bromuro de etidio.

## **Metodología para la extracción de ADN a partir de leche**

El procedimiento para la extracción de ADN a partir de leche es el mismo que para el caso de muestras de queso partiendo de la muestra de leche que ya fue previamente descontaminada.

## **Reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *M. bovis*.**

Se utilizaron los iniciadores ET1 (5' AAG CGG TTG CCG CCG ACC GACC 3'), ET2 (5' CTG GCT ATA TTC CTG GGC CCGG 3') y ET3 (5' GAC GCG ATC TGG CGG TTT GGGG 3') específicos de la región RD1 del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). El iniciador ET1 es un forward que se hibrida en la región RD1 previa a la zona de delección que se presenta en la cepa vacunal (BCG) de *M. bovis*; en tanto que ET2 también es un iniciador forward que se hibrida en una secuencia dentro de la zona deletada. Por este motivo en el caso de BCG, el único iniciador que se hibrida es ET1 lo que genera un amplicon de 200 pb, mientras que en las cepas silvestres o patógenas de *M. bovis* se hibridan ambos iniciadores, sin embargo el que se amplifica con mayor eficiencia por tener un amplicon más pequeño (150 pb) es el ET2. Por lo tanto ambos iniciadores tienen como reverso al iniciador ET3.

Cada reacción consistió en Buffer 1x, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris HCl, gelatina 0.001%, KCl, 200mM DNTP's, 25 pM de cada iniciador, 10 µl de ADN, 1.25 UI de Taq polimerasa (BioTecMol) y agua destilada grado biología molecular c.b.p 25 µl

de cada reacción. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C/5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C/30 segundos, 66°C/30 segundos, 72°C/30 segundos y un ciclo final de 72°C/ 5 minutos. El control positivo utilizado en la prueba fue la cepa AN5 de *Mycobacterium bovis*. (ATCC 35726) El producto esperado es de 150 pares de bases (pb) para las cepas de campo <sup>19</sup>. Los amplicones fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y usando como referencia el marcador de peso molecular 50 pb.

## RESULTADOS

De 6,431 establecimientos de venta al por menor y 20 tianguis en el municipio de Tecámac que tiene registrado el Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral del Estado de México (IGCEM) <sup>46</sup>, 1494 unidades económicas de comercio al por menor y un tianguis en Tulancingo, Hidalgo así como 623 unidades económicas de comercio al por menor en Tizayuca, Hidalgo y 4 tianguis que tiene registradas el INEGI <sup>47</sup>, se visitaron 40 unidades de comercio en Tecamac, 28 tiendas de abarrotes y 12 puestos ubicados en tianguis del municipio; en Tulancingo, se visitaron 40 unidades de comercio, 22 tiendas de abarrotes, 12 domicilios particulares en los cuales se comercializa leche bronca así como queso elaborado de manera artesanal, 5 establos y un botero el cual distribuye la leche bronca a domicilio; y en Tizayuca se visitaron 20 unidades de comercio, de los cuales 10 fueron en establos dentro del complejo agropecuario industrial de Tizayuca (CAITSA) dentro de los cuales se

vendían tanto leche bronca como quesos artesanales y 10 en tiendas de abarrotes del municipio.

Se obtuvieron 72 muestras de queso de 500 g y 28 L de leche. No fue posible obtener un mayor número de muestras de leche ya que en los tianguis difícilmente vendían leche bronca, por tal motivo únicamente pudimos obtener quesos de éstos lugares, por lo cual las muestras obtenidas de leche (28) fueron en su mayoría obtenidas en la cuenca lechera de Tizayuca y en Tulancingo ya que en éste municipio era más común encontrar leche bronca en tiendas de abarrotes e incluso en domicilios particulares. (Figura 1)



Figura 1. Venta de leche bronca al público en tienda de abarrotes en el municipio de Tulancingo, Hidalgo

Todas las muestras fueron procesadas para extracción de ADN, PCR y aislamiento bacteriológico. Después de 6 semanas de incubación, las muestras con el número de identificación 26 y 56, y después de 7 semanas de incubación las muestras con el número de identificación 55 y 62 mostraron el desarrollo de colonias compatibles con micobacterias en los medios LJ (26 y 62) y SB (55 y 56). Se realizó un frotis de las colonias de cada una de las muestras, las cuales

morfológicamente debían ser colonias pequeñas de color blanco ligeramente cremoso y fueron teñidos con Ziehl- Neelsen en las cuales se observaron bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), (como se muestra en las figuras 2, 3, 4 y 5)



Figura 2. Bacilos ácido alcohol resistentes encontrados en muestra de queso con N° de identificación 26 teñidos con Ziehl Neelsen

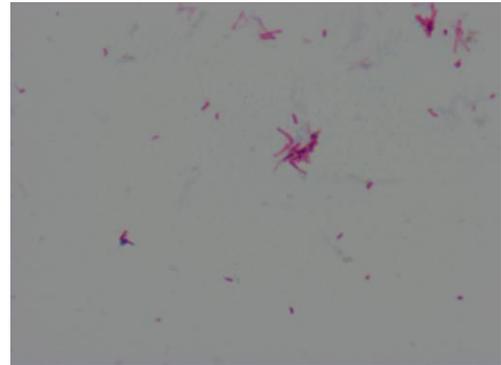


Figura 3. Bacilos ácido alcohol resistentes encontrados en la muestra de leche con N° de identificación 55 teñidos con Ziehl Neelsen, la cual fue positiva al CMTB.

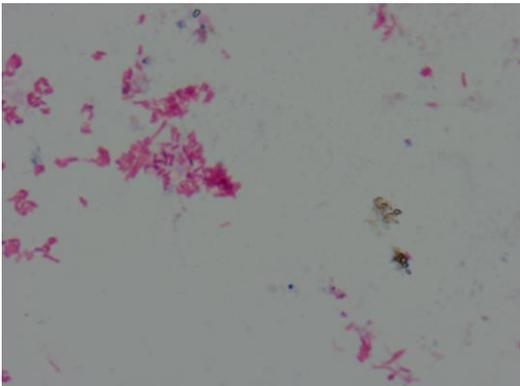


Figura 4. Bacilos ácido alcohol resistentes encontrados en la muestra de leche con N° de identificación 56 teñidos con Ziehl Neelsen



Figura 5. Bacilos ácido alcohol resistentes encontrados en la muestra de queso con N° de identificación 62 teñidos con Ziehl Neelsen

Una asada de éstas colonias se resembró por duplicado en medio Middlebrook 7h11 con OADC y después de 5 días de incubación en aerobiosis a 37°C se encontró crecimiento escaso de colonias en la muestra 26 y abundante en el resto de las muestras, se tomaron las colonias las cuales fueron resuspendidas en agua

estéril de 4 diferentes tubos eppendorff, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos y se procedió a hacer la extracción de ADN de las pastillas resultantes las cuales tenían las siguientes cantidades de ADN en 10 $\mu$ l: M26: 216.3 ng/ $\mu$ l; M55: 687.3 ng/ $\mu$ l; M56: 749.3 ng/ $\mu$ l y M62: 463 ng/ $\mu$ l. Para el caso del control positivo, se cuantificó 2236 ng/ $\mu$ l de ADN. Este ADN se utilizó para realizar las pruebas de PCR siendo utilizados los iniciadores ET1, ET2 y ET3. El resultado de ésta prueba permitió determinar que en la muestra con el número de identificación 55 el aislamiento pertenece a micobacterias del CMTB. (Figura 6)

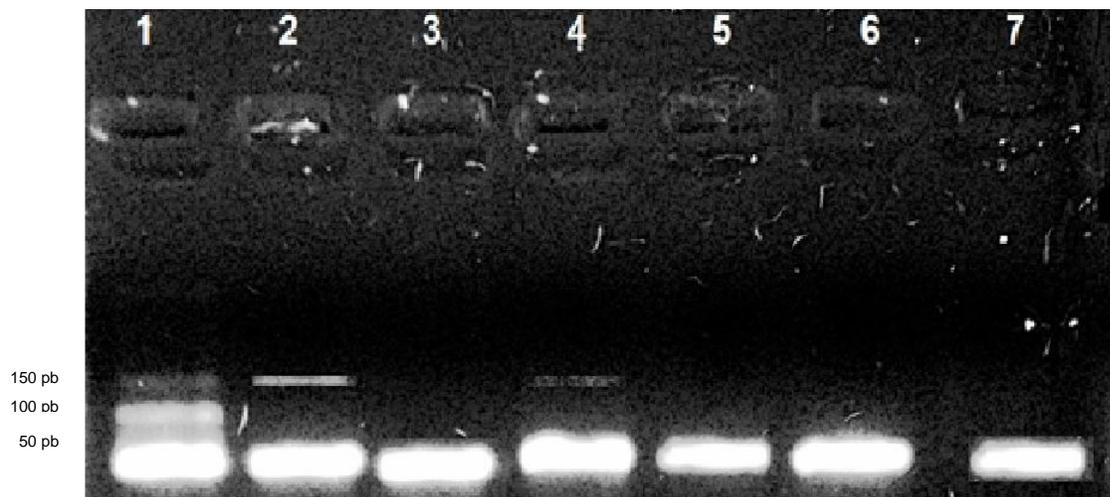


Figura 6. Muestra positiva al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular de 50 pares de bases, el número 2 al control positivo (cepa AN5 de *M. bovis* ATCC 35726), el 3 a la muestra 26 (queso), el 4 al PCR positivo de la muestra 55 (leche), el 5 a la muestra 56 (leche), el número 6 corresponde a la muestra 62 (queso) y el número 7 al control negativo (agua)

## DISCUSIÓN

En México, los informes oficiales indican que cerca del 30% de la leche que se produce en el país se vende en forma de leche cruda (bronca), una parte de la cual se destina a la producción de queso fresco, el cual se expende en mercados populares <sup>19</sup>.

Investigaciones epidemiológicas realizadas anteriormente indican que el consumo de productos lácteos sin pasteurizar, incluyendo quesos frescos originarios de México pueden haber sido responsables de casos de tuberculosis humana causados por *M. bovis* en los Estados Unidos <sup>48-53</sup>.

Este producto se ha relacionado con un brote de Tb en niños de origen mexicano en nueva York.<sup>49</sup> Un estudio hecho por Harris y colaboradores, reporta que de 203 muestras de queso fresco originario de México, 10 aislamientos fueron positivos al género *Mycobacterium* de los que 9 fueron caracterizados como *M. fortuitum* y uno solo pertenece a *M. bovis*. La cepa aislada de queso en este estudio es muy similar a nivel de espoligotipos a 3 cepas de la especie bovina, recuperadas de ganado que entra a los Estados Unidos de América proveniente de México y se ha confirmado el aislamiento de *M. bovis* a partir de dicho producto <sup>50</sup>. De igual manera estudios conocidos en el sur de los Estado Unidos de América han encontrado que la mayor parte de los casos de tuberculosis causada por *M. bovis* ocurre en personas de origen hispano, sobre todo de procedencia mexicana, y señalan el contacto con explotaciones animales y la ingestión de leche cruda y queso fresco como los factores causantes <sup>51</sup>. En otros estudios realizados en los

Estados Unidos de América, en casos pediátricos hospitalarios, las características más frecuentes en los niños han sido: presentar tuberculosis extrapulmonar, ser hispanos o de ascendencia hispana, los padres afirmaron haber estado en México y haber consumido quesos frescos del país <sup>52-53</sup>. Winter y colaboradores <sup>54</sup> en la ciudad de Nueva York del 2001 al 2004, encontraron 35 casos por *M. bovis* de un total de 4,524 pacientes con TB, 12 de ellos menores de 15 años. Hlavsa sugiere que la transmisión ha sido reciente y probablemente por la ingestión de productos lácteos contaminados y no pasteurizados <sup>53</sup>.

Los hábitos y costumbres de los padres de los pacientes de origen hispano se relacionan con la infección por productos contaminados, ya que el 82.6% de ellos, indicaron haber consumido queso producido en México <sup>53</sup>.

En el presente estudio, el número de muestras procesadas fue de 100 de las cuales se obtuvieron 4 aislamientos positivos a micobacterias (4%), 3 de éstos aislamientos se obtuvieron de leche bronca y 1 de queso fresco elaborado con leche sin pasteurizar, 1 de los 4 aislamientos resultó positiva al CMTB y cabe mencionar que dichos productos fueron elaborados con leche que proviene de establos en los cuales la prevalencia de tuberculosis bovina es del 16.5%, <sup>35</sup> lo cual representa un alto riesgo para la población ya que los lugares de donde fueron obtenidas las muestras que resultaron positivas a la baciloscopía (2 leches de establos de Tizayuca, en los cuales los subproductos son distribuidos a un mercado popular en el municipio, una adquirida en una tienda de abarrotes en Tulancingo así como un queso adquirido en un tianguis en Tecamac) son todos

lugares en los cuales dichos productos están a la venta a todo público y aunque no se tratara de *M. bovis* y los aislamientos correspondieran a micobacterias ambientales, sigue representando un riesgo para la salud pública principalmente si éstos productos son consumidos por personas que presentan factores de riesgo importantes como los inmunosuprimidos, principalmente los infectados por el VIH, así como personas con enfermedades pulmonares previas ya que corren un mayor riesgo de desarrollar tuberculosis que el resto de la población por el consumo de éstos productos ya que como se mencionó anteriormente se ha demostrado que éste tipo de micobacterias también puede desarrollar tuberculosis principalmente en las personas con los factores de riesgo mencionados anteriormente <sup>45</sup>, por tal motivo las familias que habitan estos municipios y que tienen por costumbre consumir este tipo de productos están en riesgo de eventualmente enfermar de tuberculosis, ya que cabe señalar, que un alto porcentaje de las familias compran quesos elaborados artesanalmente, los cuales son ingeridos por niños, lo que representa un factor de riesgo para ellos, de acuerdo con los estudios citados anteriormente.

De igual manera, es importante destacar que el método de muestreo utilizado para este estudio genera desventajas o limitantes para el mismo, ya que al ser un muestreo por conveniencia o de selección intencionada presenta sesgos, con lo cual no es posible cuantificar la representatividad de la muestra ya que el investigador es quien la determina subjetivamente, así como el tamaño de muestra el cual no fue posible aumentar debido a los costos que implicaría procesar un

mayor número de muestras, además de que no representa la variabilidad de la población y por tal motivo quedará subestimada.

Éste tipo de muestreo fue utilizado ya que se realizó una primera prospección de la población y porque no existía un marco de referencia de la misma <sup>55</sup>.

## **Conclusiones**

En México, no existe información suficiente acerca del problema de salud pública que conlleva la tuberculosis causada por *M. bovis* lo cual puede deberse a distintos factores como que no se llegue a conocer a fondo el agente causal de enfermedad, por fallas en el diagnóstico, o incluso por falta de notificación por parte de las autoridades del sector salud.

El hecho de la presencia de micobacterias en 4 muestras y que una de ellas sea un aislamiento positivo al CMTB, es sin duda un hallazgo de importancia, ya que los quesos artesanales en estos municipios son un riesgo para la salud pública.

Cabe mencionar, que los resultados de éste estudio resaltan la importancia de realizar la pasteurización de la leche, así como la elaboración de los subproductos como es el queso se realice con leche pasteurizada, ya que como es bien sabido, la realización del proceso de pasteurización es esencial para evitar la transmisión de la tuberculosis así como muchas otras infecciones a la población humana.

De igual manera es importante la educación para la salud en éstos lugares ya que si no se trata de hacer conciencia en la población y no se les da a conocer que el consumo de la leche y los productos lácteos sin pasteurizar puede provocar enfermedades como la tuberculosis entre muchas otras, será difícil cambiar los hábitos de consumo de la gente y seguirán presentándose con frecuencia casos de tuberculosis causada por *M. bovis*, lo cual conlleva a gastos de importancia en medicamentos ya que el tratamiento es largo y en algunos casos, particularmente en personas con un sistema inmune deficiente como los infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) de consecuencias fatales.

## REFERENCIAS

1. MÜLER B, DÜRR S, ALONSO S, HATTENDORF J, LAISSE C, PARSONS S, ZINSSTAG J. Zoonotic *Mycobacterium bovis*- induced tuberculosis in humans. *Emerg Infect Dis*; 2013. 19(6), 899-908.
2. WHO, (2015) Global tuberculosis report 2015. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf)
3. AYELE WY, NEILL SD, ZINSSTAG J, WEISS MG, PALVIK I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004; 8 (8): 924-937.
4. FORRELLAD M, KLEPP L, GIOFFRE A, SABIO Y GARCÍA, MORBIDONI J, DE LA PAZ SANTANGELO H, BIGI M. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*. 2013 4 (1): 3-66
5. PEREIRA A L, ESTRADA Y, ZÚÑIGA A, LÓPEZ G, MIRANDA D, PADILLA F et al. *Journal of food protection*. 2014 77 (5) 13-389.
6. CDC (2011). *Mycobacterium bovis* (Bovine tuberculosis) in humans. 2011 <http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/general/mbovis.htm>
7. DE LA RUA- DOMENECH R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*, 2006. 86(2): p. 77-109
8. MANDELL G, B.J., DOLIN R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. 2005, New York: Churchill Livingstone.

9. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Organización mundial de sanidad animal. 2004; 492.
10. BELLO T, RIVERA IA, DE WAARD JH. Inactivación de micobacterias con desinfectantes registrados como tuberculicidas. *Enferm infecc Microbiol Clin*; 2006. 24 (5): 319-21
11. ANDREWS AH, BLOWEY RW, BOYD H, EDDY RG. *Bovine Medicine Diseases and Husbandry off Cattle*. USA: Blackwell Publishing, 2004.
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for speciation whitin the *Mycobacterium tuberculosis* complex. 2<sup>nd</sup> ed. Switzerland (Geneva): WHO, 1996.
13. PÉREZ GL, MILIAN SF, ARRIAGA DC, ROMERO TC, ESCARTÍN CHM. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México. *Salud Pública Mex* 2008; 50:286-291.
14. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Manual sobre animales terrestres. Francia (París) OIE: 2004.
15. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte II. OMS. 2008.
16. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Laboratory methods in Veterinary Mycobacteriology for the isolation and identification of Mycobacteria. United States of America (Iowa) USDA, 2003.
17. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria. Publicada en DOF el 22 de febrero de 1999.

18. ACOSTA S R. Manual de identificación de patógenos de difícil cultivo en productos lácteos no pasteurizados usando métodos moleculares. DMPSP, UNAM, 2014. En prensa.
19. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina (*Mycobacterium bovis*). Publicada en el DOF el 8 de Marzo de 1996.
20. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-SSA2-2013. Para la prevención y control de la tuberculosis. Publicada en el DOF el 13 de Noviembre del 2013.
21. TALBOT AE, WILLIAMS LD, FROTHINGHAM R. PCR Identification of *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol. 1997; 35 (3): 566-569.
22. FERNÁNDEZ CF. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004; 22 (6): 355-360.
23. RAMÍREZ C I, SANTILLÁN F M, ARELLANO R B, MORALES A F, TENORIO GB. Detección de secuencias nucleotídicas de *Mycobacterium bovis* a partir de ADN de moco nasal de caprinos inoculados experimentalmente. Vet. Mex. 2006: 37 (2) 191-196.
24. MOLLER S. PCR (THE BASICS (Garland science)). EUA (New York). Amazon Digital services: 2007.
25. VAN PELT-VERKUIL E, VAN BELKUM A & HAYS J P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer: 2010.
26. NOLAN T, BUSTIN S A. PCR Technology: Current Innovations (3a ed.). EUA (Florida). CRC Press: 2013.

27. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Organización mundial de sanidad animal. 2012.
28. ARANAZ A, LIÉBANA E, MATEOS A, DOMÍNGUEZ L, NOVOA C, PICKERING X. Patología del aparato respiratorio de los bóvidos. Formación continuada en veterinaria. "Tuberculosis respiratoria en bóvidos". España: Pulso ediciones, 1996.
29. POLLOCK JM, NEIL SD. Review *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. Vet J 2002; 163 115-127.
30. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. Actualización en tuberculosis bovina. Argentina (Buenos Aires): SENASA, 2000.
31. GARRO C, MORRIS W, DELGADO F, GARBACCIO S. Tuberculosis bovina en terneros. Vet Arg 28 (276): 2011.
32. DORAN P, CARSON J, COSTELLO E, MORE SJ. An outbreak of tuberculosis affecting cattle and people on a Irish dairy farm, following the consumption of raw milk. Ir Vet Journal. 2009; 62 (6): 390-397.
33. BIET F, BOSCHIROLI ML, THOREL MF, GUILLOTEAU LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 2005; 36 (3): 411-436.
34. SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACIÓN. Guía para el seguimiento epidemiológico de la tuberculosis bovina. 4ª ver. México (Ciudad de México): SAGARPA-SENASICA, 2015.

35. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD, INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA. Dirección de campañas zoonosológicas, Situación actual de la campaña contra la tuberculosis bovina NOM 031- ZOO- 1995. [Citado 2015 Abr 21] Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>
36. SECRETARÍA DE SALUD. Dirección general de epidemiología. Manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica de las micobacteriosis (Tuberculosis y lepra). México (Ciudad de México): SSA, 2012.
37. SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUMOLOGÍA Y CIRUGÍA TORÁCICA. [Página de internet]. Biblioteca profesional SEPAR. Normativas [citado 2015 dic 19] Disponible en: <http://www.separ.es/biblioteca-1/Biblioteca-para-Profesionales/normativas>.
38. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. El control de las enfermedades transmisibles. Informe oficial de la Asociación estadounidense de Salud Pública. 18ªed. Estados Unidos. 2005.
39. MILIAN F, SÁNCHEZ ML, TOLEDO P, RAMÍREZ C, SANTILLÁN FM. Descriptive Study of Human and Bovine Tuberculosis in Queretaro, México. Rev Latinoam Microbiol. 2000; 42 13-19.
40. VILLAREAL GJ, AGUILAR VG, LUÉVANO AG. El impacto socioeconómico de la ganadería lechera en la región lagunera. Revista mexicana de Agronegocios 1998 3 2-24.
41. MOCTEZUMA LG, ESPINOZA GJ, CUEVAS RV, ROMERO SF, JOLALPA BJ. Estudio prospectivo al año 2002 sobre la importancia de la calidad de la leche y

queso en la Cadena Agroalimentaria Leche en el estado de Hidalgo, México. Revista mexicana de agronegocios. 2008 XII (022), 551-569.

42. CUEVAS RV, ESPINOZA GJ, FLORES MA, SANTILLAN RF, IZQUIERDO VA, JOLALPA BJ, ET AL. Diagnóstico de la cadena productiva de leche de vaca en el estado de Hidalgo. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2007; 45(1):25-40.

43. SMITH I. ¿CUÁL ES LA CARGA ECONÓMICA, SOCIAL Y SANITARIA DE LA TUBERCULOSIS? En: Frieden RT editor. Tuberculosis: Detección de casos, tratamiento y vigilancia. Preguntas y respuestas. Washington D.C: OPS, 2006:267-271.

44. SALUD. S.d. Diario Oficial de la Federación. Recuperado el 09 de Ene de 2013, [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010)

45. GARCIA JM, PALACIOS J, SÁNCHEZ A. Infecciones respiratorias por micobacterias ambientales. Arch bronconeumol. 2005; 41 (4): 206-219.

46. INSTITUTO DE INFORMACIÓN E INVESTIGACIÓN GEOGRÁFICA, ESTADÍSTICA Y CATASTRAL DEL ESTADO DE MÉXICO. Estadística básica municipal Tecámac. Estado de México, 2013.

47. inegi.org.mx [página de internet]. Ciudad de México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía [citado 2016 ene 10]. Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=13>

48. LOBUE PA, BETANCOURT W, COWAN L. Identification of a familial cluster of pulmonary Mycobacterium bovis disease. Int J Tuberc Lung Dis. 2004; 8 (9): 1142-1146.

49. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*-New York City. *Morb Mortal Wkly Rep* 2004. 54:605-608.
50. HARRIS NB, PAYEUR J, BRAVO D, OSORIO R, STUBER T, FARREL D, et al. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating from Mexico. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(3):1025-1028.
51. DANKNER WM, WAECKER NJ, ESSEY MA. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinic epidemiologic study of 73 patients and historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore, USA)* 1993; 72 (1): 11-37.
52. BESSER RE, PAKIS B, SCHULTE JM, ALVARADO S, ZELL ER, KENYON TA, ET AL. Risk factors for positive mantoux tuberculin skin tests in children in San Diego, California: evidence for boosting and possible foodborne transmission. *Pediatrics*. 2001; 108(2): 305-310.
53. HLAVSA CM, MOONAN KP, COWAN SL, NAVIN RT, KAMMERER SJ, MORLOCK PG, ET AL. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *CID*.2008; 47(5): 168-175.
54. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Morbidity and Mortality Weekly Report. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*-New York City. Centers for Disease Control and Prevention. 2005; 54(24):605-608.
55. CASAL J, MATEU E. Tipos de muestreo. *Rev. Epidem. Med. Prev.* 2003; 1:3-7

## FIGURAS



Figura 7. Tianguis en el municipio de Tecámac en el cual se aprecia una de las principales tipos de comercialización de quesos artesanales en ésta zona.



Figura 8. Venta de queso artesanal tipo panela estilo "Palma"; presentación en la cual es común encontrar quesos frescos en los sitios de muestreo de éste estudio.



Figura 9. Terreno de casa en el municipio de Tecámac en la cual se comercializan quesos artesanales y leche bronca, en el cual se aprecia las vacas con las que cuentan.



Figura 10. Ejemplo de cremería en la cual se comercializan quesos sin pasteurizar en el municipio de Tulancingo, Hidalgo.



Figura 11. Preparación de medio de cultivo Lowenstein Jensen dentro de campana de seguridad biológica nivel 2.

