



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES



**IDENTIFICACION DE *Mycobacterium bovis* EN LECHE COMO
POSIBLE MECANISMO DE TRANSMISION DEL GANADO AL
HUMANO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
ALEJANDRO MORENO PARDO
Expediente: 187883**

**DIRIGIDA POR:
MVZ MSc PhD FELICIANO MILIAN SUAZO**

SANTIAGO DE QUERETARO, QRO., JUNIO DEL 2014

CONTENIDO

RESUMEN.....	3
SUMMARY.....	4
DEDICATORIAS.....	5
INTRODUCCIÓN	6
JUSTIFICACIÓN	7
REVISIÓN DE LITERATURA.....	10
HIPOTESIS.....	18
OBJETIVO.....	19
METODOLOGIA.....	20
RESULTADOS Y DISCUSION.....	23
LITERATURA CITADA	29

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *M. bovis* en leche bronca recién ordeñada de animales de un hato lechero infectado para discutir el probable mecanismo de diseminación de la tuberculosis del ganado al humano. Para cumplir con el objetivo, se trabajaron 200 muestras de leche procedentes de dos rancho diferentes, el primero con una población de 2300 y un porcentaje de reactores a la prueba simple anocaudal de 20% y el segundo de 1000 animales y 35% de reactores. Las muestras se cultivaron por 8 semanas con revisiones semanales. Las muestras con crecimiento se tiñieron con Ziehl-Neelsen y se revisaron en el microscopio para confirmar la presencia de bacilos. De las 200 muestras, seis fueron positivas al cultivo, lo que representó el 3% del total; no obstante, las seis muestras positivas fueron del hato uno, lo que representa un 4% para ese hato en específico.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the presence of *M. bovis* in milk from infected animals to discuss the probable mechanism of spread of tuberculosis from cattle to human. To meet the goal of 200 raw milk, samples were obtained from two different herds, each with populations exceeding 1000 animals. The first herd had a 20% of reactors to the caudal fold simple test, and the second had 35% reactors. After culture, 6 of the 150 animals of the first herd were positive which represents in the total herd 4%. Samples were isolated and cultivated for 8 weeks reviewing and discarding contaminated samples weekly. The samples in which growth exists and are potential suspicious, were stained with Ziehl-Neelsen were checked under the microscope and were confirmed as positives

DEDICATORIAS

Quiero dedicar este trabajo principalmente a mi familia a algunos de mis maestros y amigos que me acompañaron durante estos cinco años de mi vida. Todos ellos son muy importantes para mí y por eso los menciono.

También quiero agradecer mucho a Juan Carlos que me ayudó mucho en el laboratorio, a la Dra. Andrea que me regañaba por no traer zapatos adecuados, al Dr. Milian que siempre me apoyo y me guío en este proceso así como al Dr. Canto quien siempre estuvo pendiente de mí, a la Dra. Marichuy de quien aprendí mucho y también siempre me apoyo y me guío, también a la Dra. Tercia porque siempre tuvo una sonrisa para mí y su Brad Pitt.

A Pancho, Avestruz, Mariana, Joss, Esteban, Juanito y Pau (mis amigos) con los que compartí muchas experiencias divertidas y no tan divertidas y siempre estuvieron ahí.

También a Paulina del Arenal que sin su apoyo yo creo que no hubiera podido acabar este trabajo. Y a esa persona que siempre estuvo en mi cabeza y me motivó para muchos eventos en mi vida, gracias.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis bovina es una enfermedad crónica de los animales provocada por la bacteria *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), un bacilo perteneciente al género *Mycobacterium*, que guarda una estrecha relación con las bacterias causantes de las tuberculosis humana y aviar (4). El nombre de tuberculosis proviene de los nódulos, llamado tubérculos, que se forman en los ganglios linfáticos del animal afectado. Es una importante zoonosis importante (puede transmitirse al ser humano) y de reporte obligatorio (4).

Aunque se considera que el verdadero hospedador del *M. bovis* es el ganado vacuno, también se ha descrito la enfermedad en muchos otros animales domésticos y no domésticos. *M. bovis* ha sido identificada en búfalos, bisontes, ovejas, cabras, caballos, camellos, cerdos, jabalíes, ciervos, antílopes, perros, gatos, zorros, visones, tejones, hurones, ratas, primates, llamas, cudúes, elanes, tapires, alces, elefantes, sitatungas, órices, addaxes, rinocerontes, zarigüeyas, ardillas de tierra, nutrias, focas, liebres, topos, mapaches, coyotes y varios depredadores felinos como el león, el tigre, el leopardo o el lince (4).

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas de la historia de la humanidad. Se calcula que existen cerca de 80 millones de casos en humanos en la primera década del siglo XXI y es muy probable que una proporción de estos es muy probable que sean resistentes a medicamentos. Aproximadamente un tercio de la población mundial es portadora de *Mycobacterium tuberculosis* y la organización mundial de la salud (OMS) calcula que 1,6 millones de personas murieron por tuberculosis en 2008, siendo la región Africana la que registró el mayor número de muertes por habitante (1).

La tuberculosis humana es todavía la enfermedad más importante causada por un agente único en el mundo (Ilaca et al., 2003). En México la TB ha sido

reportada como problema emergente de salud pública porque ha incrementado de manera considerable su incidencia en varios estados de la República. Según datos oficiales, las principales formas de tuberculosis por las que mueren las personas son de tipo pulmonary,84% y 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 (Secretaria de Salud del Estado de Querétaro 1998).

La TB en el humano puede ser causada por otras especies, como el caso de *M. bovis*, que es la segunda causa más común, de hecho, existe una correlación cruzada de infección de estas dos especies entre el humano y el bovino (2). En México este problema se agrava cuando se estima que la prevalencia de TB en Ganado lechero en el país es del 16%.

En países en vías de desarrollo las muertes por esta enfermedad representan el 25% del total de muertes evitables. Aparte de co-infecciones inmunodepresoras (SIDA) (Ilaca et al.,2003 Shen et al., 2004; Valerga et al., 2005), otros factores han sido asociados al problema: diabetes *mellitus*, linfomas, leucemia, insuficiencia renal, tratamientos inmunosupresores, trastornos asociados con derivación como gastrectomía y cirugía de derivación yeyuno-ileal, desnutrición, sobrepoblación, tabaquismo y drogadicción (Moda et al., 2004; Milián et al 2000 Caminero, 2003; Araujo, 2004; Bernar, 2007; Chayaka, 2007; Gasana, 2007).

JUSTIFICACIÓN

La TB en el humano es causada por *M. Tuberculosis*, pero también puede ser causada *M. bovis* causante de la tuberculosis en el ganado (committe on bovine Tuberculosis, USA, 1994). La transmisión de animales a humanos, de humanos a animales, de humano a humano y de animal a animal es un hecho (kumar et al., 2004); de aquí que los hatos lecheros infectados representen un riesgo para la salud pública. Este riesgo se agrava porque la prevalencia de la TB en el

ganado lechero en México es muy alta (16%- 25%) y en algunos casos puede ser mayor a 60% (comunicación personal de Médicos de campaña). Además, cerca del 30% de la leche que se produce en el país se vende cruda (NOM-031ZOO-1995). El problema en el ganado lechero ha tenido una tendencia creciente en los últimos años debido a la casi nula participación (< 30%) de productores en actividades de campaña (Milián et al., 2000).

Así, el riesgo por contacto con el ganado es también alto, en especial para trabajadores de establos, veterinarios y trabajadores de rastro, personas que trabajan en contacto estrecho con animales (Toledo 1997). Indudablemente, la presencia de *M. bovis* en el ambiente representa en si un riesgo para la población en general, dada la presencia de grupos altamente susceptible (SIDA, diabetes, pobreza, marginación, drogadicción, y cepas resistentes), lo que desde luego preocupa al gremio veterinario, cuya responsabilidad es mantener poblaciones animales libres de enfermedades para beneficio de la sociedad. Sin embargo, a pesar de que existe una campaña nacional para erradicar esta enfermedad, la realidad es que en ganado lechero no ha sido muy exitosa. Ante esto, para el sector pecuario es fundamental conocer el papel de *M. bovis* en la epidemiología de la tuberculosis humana a fin de justificar la mayor incorporación de recursos al combate de esta enfermedad en el ganado.

El papel de *M. bovis* en casos de tuberculosis humana ha sido reportado por mucho tiempo. Así, estudios retrospectivos sobre bancos de muestras reportan que la TB por *M. bovis* es entre el 8% y el 10%(Cosivi et al., 1998; Tohen et al., 2006; de Kantor et al., 2006); sin embargo, ni en México ni en el mundo existen estudios que determinen un parámetro específico (prevalencia o incidencia) utilizando una muestra representativa obtenida de una población en riesgo. Un trabajo de nuestro grupo en una zona lechera arrojó un 7% de prevalencia por *M. bovis* a partir de muestras de pacientes sintomáticos (Pérez et al ., 2008; Milián-Suazo et al., 2010). Estudios en la zona de San Diego (Rodwell et al., 2008) indican que el 45 % de los casos de TB son debidos a *M. bovis* donde una

alta proporción de ellos son de origen mexicano. Más que eso, una comparación de espoligotipos de *M. bovis* obtenidos del ganado en México y aquellos obtenidos de humanos en la zona fronteriza de San Diego, muestran patrones comunes (Rodwell et al., 2010). Todo esto indica que *M. bovis* puede tener un papel importante en casos de tuberculosis humana y que esto puede estar favoreciendo la presentación de cepas resistentes ya que *M. bovis* es resistente a la pirazinamida. Este problema puede ser mayor en el caso de regiones donde la prevalencia de la enfermedad es alta en el ganado, como es el caso de Querétaro.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de la enfermedad. La enfermedad producida por *M. bovis* se caracteriza por el desarrollo progresivo de tubérculos en cualquiera de los órganos.

Etiología. *M. bovis* es una bacteria en forma de bastoncillo, gram+, de 2-4 micras de largo, rectos o ligeramente curvos, a veces con aspecto granular y en ocasiones filamentosos. Son miembros de un gran grupo de microorganismos de tinción ácido-alcohol resistente (esto se correlaciona con su alto contenido de lípidos de su pared celular y la presencia de ácidos micólicos que aumentan su carácter hidrófobo) conocidos como micobacterias. Son inmóviles y de crecimiento aerobio, no forman esporas, se multiplican en promedio cada 20 a 22 horas a una temperatura de 37°C y un pH de 7-7.2 (3,4).

En el caso de los humanos el agente etiológico es *Mycobacterium tuberculosis* miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* al cual pertenece además *M. bovis*, *M. Africanum*, *M. Microti*, *M. Canetti*. *M. Africanum* produce la tuberculosis en África. *M. microti* produce tuberculosis en ratas silvestres y *M. canetti* también es capaz de producir tuberculosis en humanos (5).

M. bovis en específico es una bacteria lábil, no sobrevive al calor ni a la exposición al calor, tampoco lo beneficia el ambiente seco. Conserva su vitalidad hasta 40 días en el moco traqueal almacenado, en el agua de bebida estancada puede conservar su poder infectante hasta 18 días después de su contaminación (2,6).

La enfermedad es crónica, transmisible entre humanos y de diagnóstico difícil, a no ser por las pruebas de tuberculina (reacción al antígeno inoculado, con característica hinchazón de la piel en el sitio de inyección luego de un periodo de

72 horas). La enfermedad provoca tubérculos en nódulos repartidos por el sistema linfático, alojados principalmente en la cabeza y en el tracto intestinal (1,2).

Epidemiología. En regiones pantanosas contaminadas, como alrededor de los pozos para beber, charcos y acumulación de estiércol, los bacilos de la tuberculosis bovina sobreviven muchos años bajo condiciones favorables de temperatura y pH. Sin embargo, no se multiplican fuera del cuerpo de un huésped, excepto en medios especialmente preparados (4).

El animal infectado es la principal fuente de diseminación, aunque puede ocurrir contagio mediato, los microorganismos se eliminan en el aire expirado, esputo, heces procedentes de lesiones intestinales y del esputo deglutido, que a su vez deriva de lesiones pulmonares; leche, orina, secreciones vaginales, uterinas y de nódulos linfáticos periféricos abiertos. Los animales con lesiones macroscópicas que comunican con las vías aéreas, la piel o la luz intestinal son claros diseminadores de la enfermedad. La entrada suele efectuarse por inhalación o ingestión (3). La inhalación es la puerta de entrada casi invariable por animales estabulados e incluso por aquellos que se encuentran en los pastos. Las lesiones activas pueden contener miles de bacilos y cuando se comunican con orificios naturales del cuerpo los organismos pueden ser ampliamente diseminados. Esto ocurre con mayor frecuencia a través del aparato respiratorio del ganado enfermo(3,5).

La infección por ingestión del bacilo de la TB es mas probable en los pastos cuando las heces contaminan los alimentos, el agua común de bebida y los comederos. La ingestión de leche infectada en animales jóvenes es una de las vías mas frecuentes de diseminación. Vías menos comunes incluyen la infección intrauterina durante el coito, el uso de semen infectado, la inseminación con pipetas uterinas contaminadas y la infección intramamaria por empleo de pezoneras contaminadas (7).

La propagación de la tuberculosis de los animales al humano la convierte en una importante zoonosis. La infección en el humano depende en gran medida del consumo de leche infectada, sobretodo para la población infantil debido a que son los mayores consumidores en la población, aunque también puede ocurrir por inhalación o por heridas principalmente en las personas que conviven con los animales infectados (8,9).

Signos Clínicos. La tuberculosis pulmonar crónica, que es la mas frecuentemente observada, se manifiesta primero por tos corta y fuerte, que se produce en particular en particular después de que se levantan los animales; al moverse y en la respiración acentuada. La tos es seca al principio pero se torna húmeda y va disminuyendo progresivamente. Se presenta entonces con más frecuencia y va acompañada con signos de dolor. Ocasionalmente se expulsa una secreción bronquial gris amarillenta, viscosa purulenta, que los animales en fase avanzada de la enfermedad suelen lamer del hocico (4).

Además de disnea se aprecia frecuencia respiratoria aumentada, y en muchos casos se escuchan estertores crepitantes y dolor al comprimir la pared torácica. Los periodos exentos de fiebre se alternan con otros de temperatura corporal elevada. La ingestión y el aprovechamiento de la ración, que al principio no están alterados, disminuyen, lo que hace empeorar la condición corporal (10).

La anemia que esto conlleva, se manifiesta por palidez de las mucosas. La piel pierde su elasticidad y adopta textura de cuero. A medida que aumentan las dificultades respiratorias y el abatimiento de los animales, progresa el proceso de derrumbamiento orgánico que termina con la muerte del animal (3). Los nódulos linfáticos de la cabeza y el cuello pueden estar visiblemente afectados y a veces se rompen y drenan hacia el exterior (4).

La participación pulmonar se caracteriza por tos crónica debida a bronconeumonía. Esta tos casi nunca es fuerte o paroxística y suele presentarse en forma de uno o dos golpes de una vez con carácter apagado, retenido y húmedo. Se estimula fácilmente por presión sobre la faringe o por el ejercicio y es mas frecuente en la mañana o en tiempo frio. En casos avanzados, cuando gran parte del pulmón ha sido destruido es evidente la disnea con aumento de la frecuencia y de la profundidad de las respiraciones. En esta etapa pueden descubrirse anormalidades por auscultación o y percusión del tórax. En las zonas sin murmullo vesicular y mates a la percusión suelen percibirse estertores rechinantes. Se observa a veces pleuresía tuberculosa casi siempre asintomática y sin derrame. La participación de los ganglios linfáticos bronquiales puede producir disnea por constricción de las vías aéreas y el agrandamiento de los ganglios linfáticos del mediastino suele acompañarse de timpanismo ruminal, primero recidivante y luego persistente.

Los signos más frecuentes de participación del aparato digestivo dependen de la presión ejercida por los ganglios linfáticos hipertrofiados sobre los órganos circundantes; rara vez las ulcers tuberculosas del intestino delgado producen diarrea. La hipertrofia de los ganglios linfáticos retrofaríngeos da origen a disfagia y respiración ruidosa por obstrucción de la faringe. Estas hipertrofias ganglionares pueden ser parte del complejo primario o depender de diseminación posprimaria. La palpación faríngea con ayuda de un espejulo revela una tumefacción redondeada y firma en el dorso de la faringe (4).

Es rara la inflamación crónica, indolora de los ganglios supramamarios, precurales, preescapulares y submaxilares. Tampoco es frecuente la tuberculosis del útero por cepas bovinas salvo en casos avanzados. Puede observarse como consecuencia de coito o por el uso de sondas uterinas contaminadas o por continuidad de peritonitis tuberculosa, pero en la mayor parte de casos depende de diseminación hematógica generalizada (4).

Hallazgos a la necropsia. En los bovinos, ovinos y caprinos se advierten lesiones idénticas con distribución estándar. Pueden encontrarse granulomas tuberculosos en cualquiera de los ganglios linfáticos, pero sobre todo en los mediastínicos y bronquiales. En el pulmón los abscesos miliares se extienden a veces para producir bronconeumonía supurada (4). El pus tiene color crema o anaranjado característico y su consistencia varía de la crema espesa a la de queso grumoso. Se observan a veces nódulos en pleura y peritoneo que poseen pus tuberculoso pero que carecen de líquido (4).

Todas las lesiones localizadas de tuberculosis tienden a estimular la formación de una capsula fibrosa envolvente pero el grado de encapsulamiento varía con la velocidad de desarrollo de las lesiones. Aparte el valor diagnóstico de la necropsia, el estudio minucioso de las lesiones puede indicar la importancia de un animal determinado como propagador de la enfermedad. Los casos activos o abiertos son los diseminadores más peligrosos que se manifiestan por tuberculosis miliar con pequeñas lesiones transparentes parecidas a perdigones en muchos órganos, o por lesiones pulmonares. La presencia de bronconeumonía o hiperemia en torno a las lesiones indica enfermedad activa. Se consideran también como casos activos los de mastitis y metritis tuberculosa con emisión de secreciones (5).

Las lesiones cerradas son nodulares y poseen material caseoso espeso, anaranjado o amarillo, con frecuencia calcificado y rodeado de una capsula fibrosa gruesa. Aunque es menos probable que produzcan contaminación masiva del medio ambiente, en comparación con las abiertas, los animales afectados pueden representar todavía una fuente de infección importante (11).

Diagnóstico. Para el diagnóstico de los bovinos sirven los signos clínicos así como las lesiones anatomopatológicas e histopatológicas, datos bacteriológicos y pruebas inmunológicas. El diagnóstico definitivo solo se puede lograr por pruebas de laboratorio (7,12).

Las tuberculinas autorizadas en bovinos para efecto de campaña son: derivado proteico o PPD (*Purified Protein Derivative*) elaborado con *M. bovis* cepa AN5 que se utiliza en la prueba anocaudal y el PPD aviar, elaborado con *M. avium* cepa D4, que es utilizado en la prueba cervical comparativa. Así el método clásico para la detección de la tuberculosis bovina es la prueba de la tuberculina, que requiere la inyección intradérmica de tuberculina bobina (0.1ml) y posterior detección, transcurridas 72 hrs, de una inflamación en el punto de inyección.

La prueba de la tuberculina se aplica normalmente en el pliegue caudal de la cola (anocaudal). Aunque en circunstancias especiales puede realizarse en la región de la tabla del cuello (cervical simple). La piel del cuello es más sensible a la tuberculina que la del pliegue caudal.

Diagnostico de campo. Pruebas de tuberculinización. Las pruebas aprobadas de tuberculina según la norma oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*) son: la prueba anocaudal, la cervical comparativa y la cervical simple.

Prueba anocaudal. Es la prueba básica operativa de rutina cuando se desconoce la situación sanitaria del hato en materia de tuberculosis. La interpretación de esta prueba se realiza mediante observación y palpación del sitio donde se aplico la tuberculina, realizándose a las 72+ 6 hrs posteriores a la aplicación del biológico. Las reacciones se clasifican como: negativa, cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación (engrosamiento menor a 5mm), y como positiva, cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación (engrosamiento mayor a 5mm).

Prueba cervical comparativa. Esta es la única prueba autorizada para confirmar y descartar animales reactivos a la prueba anocaudal, o bien después

de transcurridos 60 días naturales. Se aplica en hatos o regiones con presencia de *M. paratuberculosis* y/o *M. avium* .

Esta prueba no se recomienda en hatos previamente confirmados como positivos o cuando el diagnóstico se haya obtenido por el aislamiento de *M. bovis* de las muestras de animales sacrificados, debido a que ya se sabe que en el lugar se tiene la presencia de *M. bovis* y no vale la pena hacer doble gasto para diferenciarlo de otras micobacterias.

Prueba cervical simple. Esta prueba se emplea para probar hatos en los que se sospecha de la existencia de la enfermedad en el hato o bien para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis*, los resultados de la prueba se obtendrán a las 72 hrs + 6 hrs a la aplicación del biológico. Las pruebas se clasifican como negativa, cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación (engrosamiento menor a 5mm) y positiva, cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor, o necrosis en sitio de aplicación (engrosamiento mayor a 5mm).

Diagnóstico de laboratorio. Se ha desarrollado una prueba comercial para medir el interferón gamma (IFN) (Bovine gamma Interferón Test BOVIGAM). La prueba consiste en incubar sangre completa de bovinos sospechosos de tuberculosis diagnosticados con PPD bovina y PPD aviar, bajo condiciones especiales. Si el animal ha estado en contacto con el antígeno. Sus linfocitos liberarán interferón gamma, el cual será detectado por una ELISA (Ensayo Inmuno Enzimático Absorbente) por sus siglas en inglés, en sándwich (utiliza anticuerpos monoclonales contra el interferón gamma bovino), donde los anticuerpos anti-gamma interferón unidos a una placa de 96 pozos capturan el gamma interferón bovino. La reacción se detecta por la adición de un anticuerpo específico anti-gamma interferón conjugado a una peroxidasa, la cual reacciona con un sustrato produciendo color. Estudios muestran que esta prueba en

general tiene una sensibilidad y una especificidad más alta que la prueba de la tuberculina (13).

Tratamiento. El tratamiento en animales tuberculosos ha experimentado algunas revisiones, confiándose en la eficacia de la medición por vía oral a largo plazo con isoniacida, con combinaciones de estreptomina y otros ácidos, tanto terapéutico como profiláctico, aunque, el tratamiento de los animales afectados no se recomienda, el periodo largo (6 meses como mínimo), el alto costo del tratamientos, los efectos adversos en la flora del rumen por la vía de aplicación (oral), la excreción del medicamento en la leche, así como por el temor de que la bacteria desarrolle resistencia al medicamento, complica el tratamiento y los animales y los animales son mejor enviados a sacrificio (14).

Control y erradicación. En muchos países como Canadá y Estados Unidos se ha logrado la erradicación de la tuberculosis bovina (15). Los métodos utilizados han dependido de varios factores, pero en última instancia la política de prueba (tuberculización) y sacrificio de reactores ha sido la única forma de lograr la erradicación eficaz. México por muchos años ha tenido acciones encaminadas a eliminar la tuberculosis, así como otras enfermedades de la ganadería nacional, y fue por esto que en 1995 se publicó la primera norma oficial para el control y la eliminación de la enfermedad, lo que daba inicio a la campaña nacional.

Actualmente el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 24 estados en fase de erradicación y 22 en fase de control; 21 regiones de baja prevalencia en tuberculosis bovina, de las cuales 11 regiones pueden exportar solo con la prueba de la tuberculina del lote, 9 regiones con prueba de hato y de lote (a exportar) y una región que no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos (16).

HIPÓTESIS

M. bovis es eliminado a través de la leche de animales infectados, por lo tanto, puede ser aislado a partir de este tejido en medios selectivos.

OBJETIVO

Determinar la presencia de *M. bovis* en leche de animales infectados para discutir el probable mecanismo de diseminación de la tuberculosis del ganado al humano.

METODOLOGÍA

El estudio se desarrolló en una zona endémica de tuberculosis en ganado lechero en los límites del estado de Guanajuato y Querétaro. Esta zona cuenta con un aproximado de 200 establos productores de leche con un promedio de 300 a 350 cabezas cada uno, donde la prevalencia de tuberculosis por cabeza es del 16% al 25% y la del hato aproximadamente del 70%. Aunque no es de las más grandes, la cuenca lechera de Guanajuato-Querétaro tiene una alta proporción de la producción nacional de leche.

Se trabajaron 200 muestras de leche cruda proveniente de 2 establos ubicados en el estado de Guanajuato en los límites con el estado de Querétaro. El primer rancho está ubicado en San Miguel de Allende, tiene una población de 2300 vacas en línea, con un sistema tecnificado de ordeña de 3 veces al día y con una prevalencia promedio de 35% de reactores a la prueba anocaudal simple de la tuberculina. Las muestras de leche fueron colectadas en la segunda ordeña del día a la 1:30 pm en viales de plástico de 50 ml de capacidad y puestas en refrigeración inmediatamente para llevarlos al laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales para su cultivo el mismo día para evitar la contaminación.

El segundo rancho está ubicado en Apaseo el Grande, cuenta con una población de 1000 vacas en línea o producción con un sistema de ordeño tecnificado de 2 veces al día y con una prevalencia promedio de 20% de reactores a la prueba anocaudal simple de la tuberculina. En este rancho las muestras fueron colectadas en la ordeña de la tarde, a las 2 pm aproximadamente, en viales de plástico de 50 ml y refrigerados de inmediato para llevarlos al laboratorio para su cultivo en medios selectivos de cultivo.

El medio de cultivo usado fue el de Stonebrink para *M. bovis* que es un agar a base de huevo adicionado con piruvato para facilitar el crecimiento de esta micobacteria.

El cultivo de las muestras se hizo siguiendo el método de Petroff Modificado, donde dado el tipo de tejido y sobre lo cual no existe mucha información, se hicieron algunas modificaciones en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Naturales buscando eliminar la contaminación y lograr el crecimiento del *Mycobacterium*.

De manera resumida, antes de comenzar con el cultivo se esterilizo el material así como la campana donde se realiza el proceso de descontaminación y el cultivo de las muestras. Las muestras de leche recién ordeñada se colocaron en tubos Fálcon de 10 ml a los cuales se les adicionó 20 ml de ácido clorhídrico y se dejaron reposar por 20 minutos. Posteriormente, se agregaron tres gotas de rojo de fenol como indicador para después adicionar hidróxido de sodio gota por gota hasta que el contenido se neutralizó y cambió de color a lila-morado. En seguida las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 20 minutos para luego retirar el sobrenadante y resuspenderlo, finalmente se tomó el contenido y se cultivó en un medio Stonebrink. Una vez cultivado, el tubo del medio se metió a la estufa de incubación a 37°C y se verificó constantemente para ver que no se contaminen y detectar el crecimiento, esto se hizo cada semana por un periodo de 8 semanas.

Las pruebas sospechosas positivas se confirmaron mediante tinción de Ziehl-Neelsen, para identificar los clásicos bacilos tuberculosos. Este protocolo lo que busca primero es abrir la membrana de la bacteria por medio de calor para que así permita la entrada del colorante (fucsina), después se decolora con alcohol ácido al 3% para retirar el exceso de colorante y finalmente se tiñe con azul de metileno para tener un fondo de contraste con la fucsina y así poder hacer más fácil la identificación de la bacteria.

Dentro del laboratorio se utilizó siempre medidas extremas de seguridad usando bata, cubrebocas, guantes además de trabajar en una campana nivel 2 de bioseguridad al momento que se cultivaron las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De las 200 muestras de leche cultivadas, seis fueron cultivo-positivas, lo que corresponde al 3% del total, 13 se contaminaron y de las restantes no hubo crecimiento después de 8 semanas de incubación. De las seis muestras positivas, todas correspondieron al hato 1, que tiene una prevalencia del 35% de reactores a la prueba simple caudal, por lo que la proporción de positivos para este hato en particular fue de 4% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Proporción de muestras de leche obtenidas de vacas pertenecientes a hatos infectados de TB positivas al cultivo.

	No. de muestras	No. de positivos	Proporción de positivos
Hato 1	150	6	4.0
Hato 2	50	0	0.0

En la literatura mundial se argumenta que la transmisión de *M. bovis*, el agente causal de la tuberculosis en el ganado, al humano ocurre por el consumo de leche bronca y queso fresco elaborado con leche bronca (Grange y Yates, 1994; Ashford et al., 2001). De 1997 al 2001 reportes en la literatura mundial sobre casos de TB humana por *M. bovis* van del 1.7 % al 3.2%, cuando se analizan entre 200 y 289 muestras (ESR, 1998; Perkers et al., 1999; Kieft et al., 2000; Lopez et al., 2001; Sneyd et al., 2002). Cuando se han hecho análisis de muestras considerando lo aislado en varios años en diferentes países, la proporción de casos por *M. bovis* va del 1.1% al 10.5% (Pérez et al., 2009). En el caso de México, un estudio en una zona endémica de la enfermedad en el ganado, arrojó una prevalencia por *M. bovis* del 6% (Pérez et al., 2009). No

obstante, la mayoría de los aislamientos considerados en estos trabajos vienen de tejidos diferentes a la leche.

De trabajos recientes, solo existe uno donde de 230 muestras de queso fresco colectado de viajeros que entraban a los Estados Unidos de Norteamérica en la frontera San Isidro-San Diego California entre marzo y agosto del 2005, 10 (4.9%) fueron positivas a la presencia de bacterias del género *Mycobacterium*, pero solo una fue positivamente identificada como *M. bovis* (Harris et al., 2007). Otros trabajos más viejos también han reportado el aislamiento de *M. bovis* de muestras de leche en ganado con alta prevalencia de la enfermedad (Kazwala et al., 1998; Leite et al., 2003). Hasta donde se tiene conocimiento, este es el primer trabajo que demuestra la presencia de *M. bovis* en muestras de leche recién ordeñada en vacas de hatos infectados en México. Por lo tanto, se confirma que la leche bronca puede ser un mecanismo para la transmisión de la tuberculosis del ganado al humano en zonas de alta prevalencia de la enfermedad en el ganado.

De la figura 1 a la figura 4 se muestran algunos de los pasos del proceso de preparación de las muestras y el cultivo de las mismas, así como de muestra la presencia de los clásicos bacilos de la tuberculosis en la tinción de Ziehl-Neelsen.



Figura 1. Centrifugación de leche bronca como paso previo al cultivo en medios enriquecidos para el aislamiento de *M. bovis*.

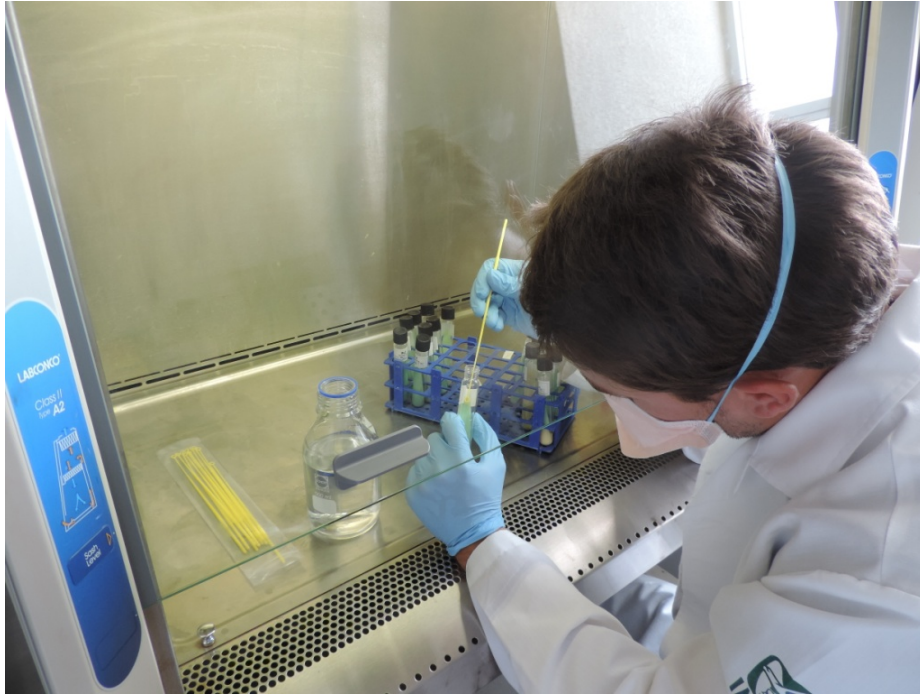


Figura 2. Cultivo de muestras de leche bronca en medio enriquecido para el aislamiento de *M. bovis* en una campana nivel 2 de bioseguridad

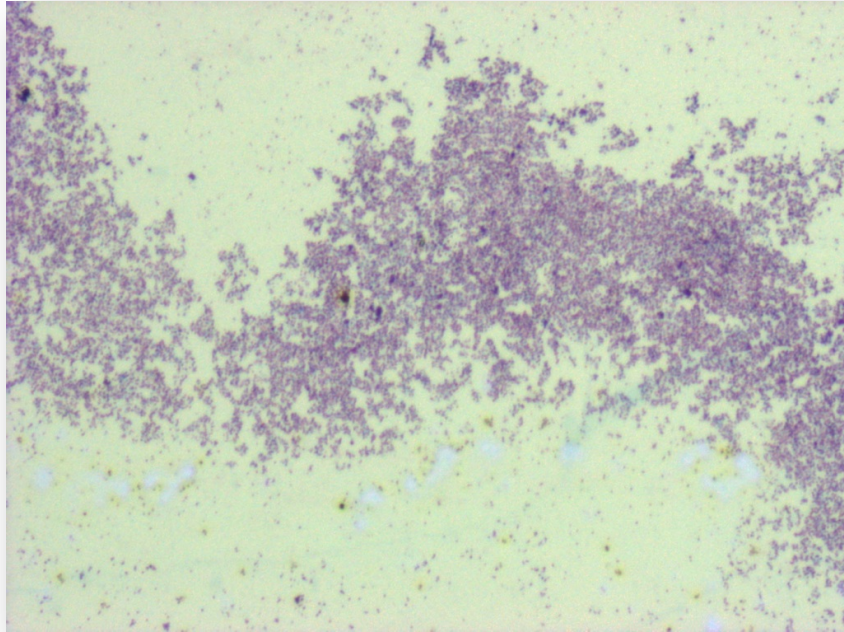


Figura 3. Presencia de gran cantidad de bacilos de *Mycobacterium* obtenidos del cultivo de una muestra de leche bronca en un frotis de Ziehl-Neelsen.

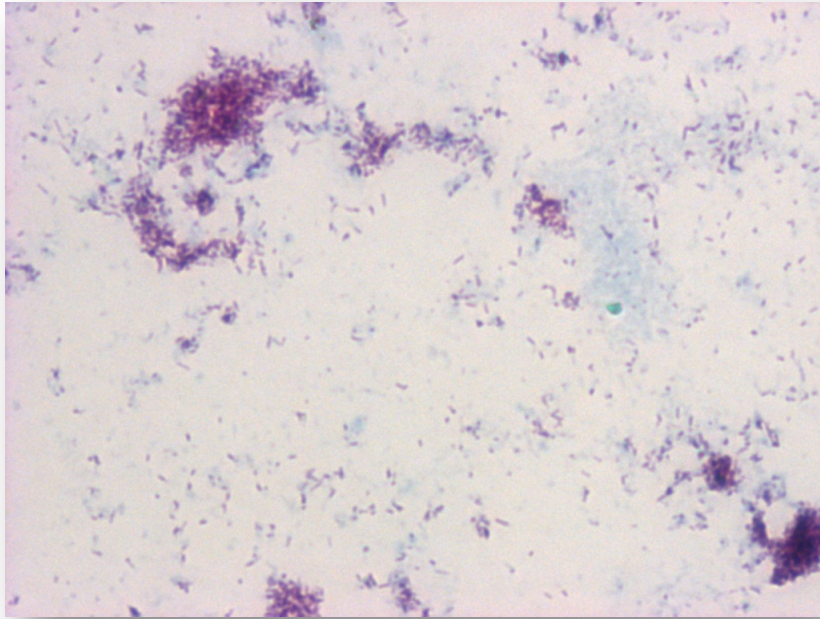


Figura 4. Presencia de gran cantidad de bacilos de *Mycobacterium* obtenidos del cultivo de una muestra de leche bronca en un frotis de Ziehl-Neelsen.

Literatura citada

- Aguilar, H E., Santos, F, J ., 2002 Manual de prácticas Módulo de producción Bovina. Conocimientos y habilidades para el uso de instrumentos y aplicación de técnicas involucradas en el proceso de producción Bovina. FMVZ. Mérida Yucatán, México. Pp 35-67.
- Blood,D, C. Y Radostis, O. M. 2000. Medicina Veterinaria. Tomo I y II. Ed. Mc Graw Hill. México DF. Pp 1540-1615.
- Cole, S, T., 2002. Comparative and Functional Genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology; pp. 148: 2919-28.
- Cousins, D, V Roberts, J L. 2001. Australian campaign to eradicate bovine tuberculosis: the battle for freedom and beyond tuberculosis 81:5-15.
- Eisenach,K,D.,Cave, M,D., Crawfor, J,T., Persing, D, H., Smith, T, F., Tenover, F, C., 1993. PCR detection of *Mycobacterium Tuberculosis*. En eds Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. Washington, D.C; American Society for Microbiology., pp. 191-196.
- Harris NB, Payeur J, Bravo D, Osorio R, Stuber T, Farrell D, Paulson D, Treviso S, Mikolon A, Rodriguez Lainz A *et al*: Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Appl Environ Microbiol* 2007, 73(3):1025-1028.
- Jerome E. Freier. 2003. Mapping outbreaks Using Gis USDA: APHIS: VS. Center for epidemiology and animal health for collons, Colorado.
- Kazwala, R. R., C. J. Daborn, L. J. Kusiluka, S. F. Jiwa, J. M. Sharp, and D. M. Kambarage. 1998. Isolation of *Mycobacterium* species from raw milk of pastoral cattle of the Southern Highlands of Tanzania. *Trop. Anim. Health Prod.* 30:233–239.
- Leite, C. Q., I. S. Anno, S. R. Leite, E. Roxo, G. P. Morlock, and R. C. Cooksey. 2003. Isolation and identification of mycobacteria from livestock specimens and milk obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98:319–323.
- Madalaine Norstorm. Geographical information system (GIS) as a tool in surveillance and Monitoring of animal disease. Ullevalsvn 68 P.B 8156 Dep. N-0033 Oslo, Norge. 2006.
- Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium Bovis*).
- Office International des Epizooties (O.I.E) 2002. Organización mundial de la salud. OMS http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_chaprite_2.3.3.htm Fecha de consulta 23/1/14.
- Organización Panamericana de la Salud. El control de la tuberculosis en las Americas. Boletín Epidemiológico. OPS.; 19(2):1-8.284: 1520- 1523.

- Phillips, C, J., Foster, C, R., Morris P, A., Teverson, R., 2003. The transmission of *Mycobacterium bovis infection* to cattle. Res Vet Sci. 74 (1) : 1-15.
- Ramírez, R,N., Ronzón, B, E., Mendez, P, A., Arenas, J., Julio- Diciembre 2002. *Mycobacterium Tuberculosis* : su pared celular y la utilidad diagnostica de las proteínas 16 y 38 kDa. Departamento de patología experimental Facultad de Medicina. Xalapa. Vol.2 Num. 2.
- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria http://senasica.sagarpa.gob.mx/.../campananacional_contra_la_tuberculosis_bovina.html. F . consulta 12 /1/14.
- Valdespino, J,L.,Sepulveda,2000 “seroepidemiologia de la Tuberculosis y Brucelosis en México” Salud pública de Mexico 34 (2): 230-240
- Wood, P, R., Jones L., 2001. BOVIGAM: an in vitro celular diagnostic test for bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 81(1-2): 147-55.
- World Health Organization (WHO).2008. Global Tuberculosis Control.Who report. Geneva: communicable diseases , World Health Organization. Global Disease elimination and eradication as public Health strategies <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/es>.