



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

**Diagnóstico molecular de aislados de *Mycobacterium* spp.
provenientes de pacientes sospechosos a tuberculosis**

TESIS

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable**

Presenta

MVZ. Claudia Angélica Perea Razo

Dirigido por

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Asesores

Dr. Feliciano Milián Suazo

MSPAS. Yezenia Rubio Venegas

M. en C. Elba Rodríguez Hernández

M. en C. Susana Flores Villalva

Santiago de Querétaro, Qro., 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

Diagnóstico molecular de aislados de *Mycobacterium* spp. provenientes de
pacientes sospechosos a tuberculosis

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ. Claudia Angélica Perea Razo

Dirigido por

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

Asesores

Dr. Feliciano Milián Suazo

MSPAS. Yezenia Rubio Venegas

M. en C. Elba Rodríguez Hernández

M. en C. Susana Flores Villalva

Campus Juriquilla

Santiago de Querétaro, Qro., México

2015



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Diagnóstico molecular de aislados de *Mycobacterium* spp. provenientes de pacientes sospechosos a tuberculosis

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:

MVZ. Claudia Angélica Perea Razo

Dirigido por:

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón

SINODALES

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Presidente

Dr. Feliciano Milián Suazo
Secretario

MSPAS. Yezenia Rubio Venegas
Vocal

M. en C. Elba Rodríguez Hernández
Suplente

M. en C. Susana Flores Villaiva
Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús
García Gasca

Directora de la Facultad de Ciencias Naturales

Dra. Ma. Guadalupe Flavía
Loarca Piña

Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2015
México

RESUMEN

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas de mayor contagio en el mundo y ha sido la principal causa de muerte debido a un solo agente infeccioso en personas adultas. *Mycobacterium tuberculosis* es la principal causa de tuberculosis en humanos, pero existen reportes de casos ocasionados por *M. bovis*. El objetivo de este trabajo fue identificar las infecciones causadas por *M. bovis* en pacientes humanos sospechosos a la enfermedad mediante el análisis molecular de las muestras. Se analizaron 2736 muestras de esputo mediante la técnica de BAAR (tinción Ziehl-Neelsen de Bacilos Ácido-Alcohol Resistentes) y posteriormente se hizo la siembra en mezcla de las muestras seriadas en medios de cultivo Lowenstein-Jensen (*M. tuberculosis*) y Stonebrink (*M. bovis*). Se realizó la extracción de ADN de los 21 cultivos positivos para llevar a cabo la PCR tiempo real para la diferenciación entre las dos especies. Los aislados de *M. bovis* analizados en este estudio fueron secuenciados y tipificados mediante polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs). En este trabajo se analizaron 2736 muestras de 1154 pacientes, 531 mujeres (46%) y 496 hombres (43%). De 127 muestras (11%) no se obtuvo información sobre el género. Se obtuvo una frecuencia del 1.8% (21) de casos positivos a la enfermedad, 6 mujeres, 7 hombres y 8 de género desconocido; de los 15 aislados secuenciados, 2 (13%) resultaron *M. bovis* y 13 (87%) *M. tuberculosis*, lo que implica una incidencia de 9.5% de *M. bovis* en pacientes positivos a la enfermedad. Los resultados obtenidos indican que existe una frecuencia considerable de infecciones en humanos causadas por *M. bovis*, por lo cual resulta importante realizar la diferenciación de especie del complejo *M. tuberculosis*, que nos permita realizar un diagnóstico acertado y administrar el tratamiento adecuado para el paciente.

Palabras clave: tuberculosis, zoonosis, BAAR, *Mycobacterium*

SUMMARY

Tuberculosis is amongst the most contagious of infectious diseases in the world and it has been the main cause of death due to a single infectious agent in adults. *Mycobacterium tuberculosis* is the main cause of tuberculosis in humans, but there have been cases of disease caused by *M. bovis* as well. The principal objective of this study is to determine the role of *M. bovis* in human tuberculosis through the molecular analysis of isolates obtained from patients suspected of having tuberculosis. Human sputum specimens were examined by direct microscopy and culture was also performed in Lowenstein-Jensen (*M. tuberculosis*) and Stonebrink (*M. bovis*) mediums. From the positive cultures, DNA extraction was performed in order to do real time PCR analysis for the identification of species. Furthermore, whole genome sequencing was done for the *M. bovis* isolates for genotyping by single nucleotide polymorphisms (SNPs). There was a total of 2736 specimens from 1154 patients, of which 531 were women (46%), 496 men (43%), and of 127 (11%) it wasn't possible to obtain such information. The total frequency obtained was of 1.8% (21) positive cases of tuberculosis, 6 women, 7 men and 8 had no information. Of the 15 isolate that were sequenced, 2 (13%) were identified as *M. bovis* and 13 (87%) as *M. tuberculosis*. That is 9.5% of the tuberculosis cases were due to *M. bovis*. These results show how important it is to perform species identification for the appropriate treatment.

Key words: tuberculosis, zoonosis, AFB stain, *Mycobacterium*

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, que me ha permitido continuar mi preparación profesional en el camino a cumplir metas personales para alcanzar mi realización como capital intelectual dentro de la comunidad académica y científica.

A mi mamá y mi hermano de quienes siempre he contado con su apoyo incondicional.

A mi director de tesis, quién con su ejemplo me da el empuje y la motivación, además de los jalones de orejas, para sobresalir y desarrollar mi potencial.

A mis sinodales quienes han aportado generosamente sus conocimientos a lo largo de este proceso.

A mis compañeros y amigos quienes hicieron de esta experiencia una especial convivencia.

AGRADECIMIENTOS

No puedo expresar en palabras el agradecimiento que le merezco a mi madre. Gracias a ella, por su constante lucha e incansable espíritu, porque su gran amor y apoyo incondicional le han dado firmeza al suelo donde ahora piso. Gracias por enseñarme a través de tu perseverancia y coraje.

Agradezco ampliamente al Dr. Cantó por su guía, paciencia y cariño. Él ha inculcado en mi un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa.

Gracias Dr. Milián por permitirme ser parte de su área de investigación y trabajo de vida, y abrirme las puertas y proporcionarme las herramientas para desarrollar esta tesis.

Gracias sinceras a todo el apoyo técnico por parte de compañeros y maestros, su ayuda fue verdaderamente valiosa.

Además doy agradecimiento especial al IMSS y todo su personal quien estuvo involucrado en este proyecto, puesto que fueron una parte esencial para su realización. Así como al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (2014), ya que fue una importante fuente de financiamiento.

Y finalmente, gracias a Dios por su infinita generosidad hacia conmigo.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 ANTECEDENTES.....	3
2.1.1 Situación de la tuberculosis humana en México.....	3
2.1.2 Situación de la tuberculosis bovina en México	5
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO.....	7
2.2.1 Características generales del género <i>Mycobacterium</i>	7
2.2.2. El complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
2.2.3 Características del genoma.....	16
2.3 PATOGENIA.....	16
2.3.1 Tuberculosis humana	16
2.3.2 Tuberculosis bovina	20
2.4 EPIDEMIOLOGÍA	23
2.4.1 Espectro de hospedadores y transmisión.....	23
2.4.2 Supervivencia del microorganismo.....	25
2.4.3 La zoonosis	27

2.5 DIAGNÓSTICO.....	31
2.5.1. Métodos de diagnóstico de TB en humanos	31
2.5.2. Métodos de diagnóstico de TB en bovinos.....	38
III. OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	46
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	46
IV. METODOLOGÍA.....	47
V. RESULTADOS	50
VI. DISCUSIÓN.....	57
VII. CONCLUSIONES.....	64
LITERATURA CITADA.....	66
APÉNDICES.....	83
Apéndice 1. Alineamiento de SNPs del aislado 13-1212317FM comparado con la cepa de referencia AF2122/97.....	83
Apéndice 2. Alineamiento de SNPs del aislado 14-805568FM comparado con la cepa de referencia AF2122/97.....	87

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Tabla de contingencia para determinar la sensibilidad de la prueba de BAAR comparada con el cultivo.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Tipo de muestras remitidas para baciloscopía al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014 de pacientes sospechosos a tuberculosis.	50
2	Muestras de esputo de pacientes con sospecha de tuberculosis remitidas al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014, de acuerdo a su consistencia.	50
3	Origen de los casos sospechosos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014.	51
4	Género de los pacientes sospechosos a tuberculosis que remitieron muestras al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014.	52
5	Grupo etario de los pacientes sospechosos a tuberculosis que remitieron muestras al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014.	52
6	Prevalencia de tuberculosis en los pacientes sospechosos a la enfermedad que se examinaron en el IMSS de la Ciudad de Querétaro entre los meses de octubre de 2013 a julio de 2014.	53
7	Número de casos positivos a tuberculosis por tipo de muestra, obtenidos de pacientes sospechosos a la enfermedad entre los meses de octubre 2013 a julio 2014 del IMSS de la Ciudad de Querétaro.	53
8	Género de los pacientes positivos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre 2013 a julio 2014.	54
9	Pacientes positivos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre de 2013 a	55

	julio de 2014 por grupo etario.	
10	Origen de los casos positivos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre de 2013 a julio de 2014 por grupo etario.	55
11	Especies de <i>Mycobacterium</i> spp. provenientes de pacientes sospechosos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre de 2013 a julio de 2014	63

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) reporta que cada año se estima una ocurrencia cercana a 8 millones de casos nuevos de tuberculosis (TB), de los cuales tres millones se convierten en defunciones (WHO, 2008). Por consiguiente, la tuberculosis se posiciona como la segunda causa de muerte debido a una enfermedad infecciosa a nivel mundial. Los factores de riesgo que pueden predisponer a un individuo a contraer la enfermedad ya han sido estudiados, dentro de los cuales están el tabaquismo, malnutrición, diabetes mellitus y el uso de terapias inmunosupresivas; además, el consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados y el contacto directo con animales infectados puede favorecer la infección zoonótica. Sin embargo, el principal factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad es la coinfección con el virus de inmunodeficiencia (VIH), principalmente (de Kantor et al., 2008). El control y la erradicación de la tuberculosis en humanos, depende en gran medida de la identificación de todos los reservorios de la enfermedad. Aunque hasta la fecha a *Mycobacterium bovis* se le ha atribuido un pequeño porcentaje de los casos reportados de tuberculosis en humanos, el ganado infectado es un reservorio importante para la diseminación del microorganismo al humano (Grange, 2001).

La prevalencia de la tuberculosis bovina en México se ha reportado como menor de 0.5% en 66% del territorio nacional. Doce estados se encuentran en fase de erradicación, con una prevalencia menor al 2%, y 21 estados están en fase de control, con una prevalencia mayor al 2% o desconocida. En general, se ha estimado una prevalencia de tuberculosis en ganado lechero en México del 16%. La normatividad actual no hace obligatoria la pasteurización de la leche, por lo cual existe un gran riesgo de infección por *M. bovis* en humanos a causa del consumo de productos lácteos no pasteurizados. Estudios que se han realizado en México, reportaron incidencias de 28% y 6.7% (Milián et al., 2013).

Los métodos de diagnóstico precisos se hacen necesarios para obtener ventaja en la batalla contra la tuberculosis. La biología molecular es una herramienta excelente para tipificar cepas de microorganismos causantes de enfermedad, además de que son capaces de proporcionar datos en cuanto al origen de la infección de los pacientes. Dicho esto, el presente estudio, además de determinar la importancia de *M. bovis* como agente zoonótico, explora la epidemiología de la enfermedad basada en la biología molecular de *M. tuberculosis* y *M. bovis* mediante los SNP, con lo que se puede genotipificar la cepa involucrada en la infección de las personas y bovinos de manera acertada.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Situación de la tuberculosis humana en México

Debido a la alarmante situación de la tuberculosis humana, muchos de los países desarrollados instauraron programas de control para esta enfermedad, lo cual supuso un descenso significativo en la incidencia de la misma durante los últimos 50 años. La tuberculosis ha sido considerada como una enfermedad de la pobreza, y tanto hacinamiento y como las carencias en la dieta han contribuido a la morbilidad y a la difusión de la enfermedad en los países del tercer mundo, en los que nunca ha dejado de ser un problema sanitario importante. Sin embargo hoy en día, esta enfermedad, casi olvidada en los países industrializados, está recobrando nuevamente la atención a nivel mundial. Las cifras oficiales demuestran que la incidencia de la tuberculosis aumenta alrededor del mundo; se estima que 1,700 millones de personas (un tercio de la población mundial) están infectadas con el bacilo tuberculoso; de estos, 60 millones padecen tuberculosis de forma activa y cada año aparecen 10 millones de nuevos casos (WHO, 2009). El número de muertos por esta infección se estima en 3 millones al año en todo el mundo (Dawson 1990; Bloom, 1992). La tuberculosis es responsable de más del 6 % del total de muertes en el mundo y se identifica como la enfermedad infecciosa que causa un mayor número de defunciones. La tuberculosis es primariamente un problema de los países en vías de desarrollo, en los que se registran más del 95% de los casos actuales. Sin embargo, en los últimos 5 años, la tendencia decreciente en las cifras de incidencia de los países desarrollados ha sufrido una inversión (WHO, 2009).

En los Estados Unidos de América (EE. UU.) se encontró un aumento en el número de pacientes tuberculosos debido principalmente al crecimiento

exponencial del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Sunderam et al., 1986; Bermejo et al., 1992). En Europa se ha observado un fenómeno similar y el número de casos activos ha aumentado en porcentajes cifrados entre el 4% (Reino Unido) y el 33% (Suiza) (Kaufmann y Van Embden, 1993). La epidemia global del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA) ha tenido un gran impacto en la situación actual de la tuberculosis y se estima que a nivel mundial 4.4 millones de personas están infectadas a la vez con *M. tuberculosis* y VIH. Además, y debido a los problemas que la quimioterapia conlleva en estos pacientes, han aparecido cepas multirresistentes de *M. tuberculosis* que han sido la causa de infecciones nosocomiales en hospitales e instituciones (Bloom, 1992).

En los países industrializados, especialmente en el continente Europeo, la emigración ha jugado también un papel muy importante en la difusión de esta enfermedad. Aunque la tuberculosis en el hombre está principalmente producida por *M. tuberculosis*, otras especies como *M. bovis* y *M. africanum*, pueden provocar procesos patológicos idénticos que constituyen un importante problema de salud pública (Dawson, 1990).

Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada por tuberculosis; de éstos, 1 de cada 10 desarrollará la forma activa y contagiosa en algún momento de sus vidas y aquellos con tuberculosis activa infectarán a un promedio de 10 a 15 personas por año si no son tratados oportunamente (WHO, 2009). A la fecha, no existe un solo país que haya logrado erradicar por completo la tuberculosis, lo cual se debe a varios factores que impactan directamente en la incidencia de la enfermedad, como las enfermedades inmunodepresoras, diabetes, la explosión demográfica, la pobreza y los movimientos migratorios, entre otros (Milián et al., 2013).

La tasa de incidencia se mantuvo casi estable desde 1990 hasta el 2001, cuando comenzó a decaer lentamente. No obstante, a pesar del

incremento de la población, el número de casos nuevos per cápita ha disminuido, a menos de 1% por año. De los 8.7 millones de casos nuevos en el 2011, la mayoría ocurrieron en Asia (59%) y África (26%), una proporción menor en el Mediterráneo (7.7%), Europa (4.3%) y las Américas (3%). Los cinco países con el mayor número de casos nuevos en ese año fueron la India (2.0-2.5 millones), China (0.9-1.1 millones), Sudáfrica (0.4-0.6 millones), Indonesia (0.4-0.5 millones) y Pakistán (0.3-0.5 millones). En cuanto a la prevalencia, la tasa se ha reducido en un 36% a nivel mundial desde 1990. La tasa de mortalidad (sin incluir muertes entre las personas VIH positivas) ha disminuido en un 41% desde 1990. En 2011, fue 14 muertes por cada 100,000 habitantes (WHO, 2009).

Según reportes de la OMS específicos para México, la incidencia estimada en 2014 fue de 26,000 casos de TB por año, lo que incluye todas las formas de la enfermedad, esto es 23 casos nuevos por cada 100,000 habitantes. En el caso de la prevalencia, ésta fue estimada en 32,000 casos, equivalente a 28 por cada 100,000 habitantes. La mortalidad fue de 2,000 muertes por año, equivalente a 1.7 por cada 100,000 habitantes (sin incluir muertes entre las personas VIH positivas) (OMS, 2013).

De acuerdo con información del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), en México se ha presentado una disminución en la incidencia de la tuberculosis, aunque continúa presente con más de 18,000 casos nuevos y cerca de 2,000 muertes por año, donde la edad promedio de muerte es de 54 años (Milián et al., 2013).

2.1.2 Situación de la tuberculosis bovina en México

La tuberculosis bovina no sólo tiene importancia por sus implicaciones zoonóticas sino también porque origina enormes pérdidas económicas debidas a los decomisos en las canales, pérdidas en la producción láctea, y el

impedimento en la comercialización del ganado. Cuando no se establecen las medidas de control adecuadas para esta enfermedad, los efectos en la economía y en la salud humana progresan lenta y constantemente (de Kantor y Ritacco, 1994).

En países con gran tradición ganadera como Argentina, las pérdidas en la producción de leche en vacas tuberculosas respecto a vacas sanas se han cifrado en un 18%; estas pérdidas son debidas principalmente a un retraso en la primera lactación y a una disminución del número y duración de sucesivas lactaciones. Un problema añadido es el cierre de los mercados de exportación a aquellos países que no estén libres de la enfermedad (Nader y Husberg, 1988).

Varios países, aún con el uso de las técnicas diagnósticas más modernas, no han erradicado la enfermedad debido a la participación de la fauna silvestre que actúa como reservorio de *M. bovis*. Como ejemplos de esta situación se puede citar a Nueva Zelanda, cuyo reservorio es la zarigüeya (*Trichosus vulpecula*) o Gran Bretaña, cuyo reservorio es el tejón (*Meles meles*). Además, en diversos países, otros animales como cerdos, jabalíes, ciervos, bisontes, búfalos, etc., se han mostrado como posibles reservorios de la tuberculosis. La situación actual en la Comunidad Europea según datos de 1991 es la siguiente: la enfermedad ha sido erradicada en Dinamarca, Luxemburgo y Holanda; Bélgica, Alemania, Francia, Gran Bretaña, Grecia y Portugal tienen índices de prevalencia en rebaños menores al 0.4 %, e Italia, Irlanda y España muestran aún índices elevados de incidencia en rebaños (Caffrey, 1994). En el caso de Canadá la erradicación total se espera para dentro de pocos años (8 de sus 10 provincias están hoy en día libres de la enfermedad). En una situación similar se encuentran los EE. UU. aunque cuentan con dos graves problemas: las importaciones de ganado mexicano y la existencia de núcleos de tuberculosis en cérvidos en cautiverio y salvajes (Essey y Koller, 1994). En los países de América Latina y del Caribe las cifras

de incidencia en rebaños oscilan entre el 37% de Argentina y el 0.04%, de Panamá. En esta área el censo de ganado se estima en 300 millones de cabezas, de los cuales 80 millones están en países con baja o nula incidencia, y los restantes 220 millones se encuentran en países con alta incidencia de infecciones por *M. bovis* (de Kantor y Ritacco, 1994).

Australia fue considerada como libre de tuberculosis bovina en 1992, aunque durante 1993 y 1995 se dieron pequeños focos de la enfermedad en lugares concretos que están bajo un control estricto. En Nueva Zelanda existen aún zonas endémicas en las que la enfermedad persiste en reservorios salvajes (Tweddle y Livingstone, 1994).

Se estima que aproximadamente el 54.5% del ganado sacrificado debido a TB bovina son bovinos lecheros. En Gran Bretaña, en abril de 2013, 2,728 bovinos fueron sacrificados como resultado de la enfermedad, lo que disminuyó la población en un 8.2%. La TB bovina en Chile tiene diferentes zonas de prevalencia según la región geográfica, la zona norte con 16.5%, la zona centro-norte con 56.3%, la zona centro-sur con 0.30%, y la zona sur con 0.46% (Proyecto de Control y Erradicación de Tuberculosis bovina en Chile, 2010). En el caso de Perú, se ha reportado una prevalencia de 37% y 18% en la zona de Lima y a nivel nacional, respectivamente. En República Dominicana, estudios de prevalencia realizados por la Dirección General de Ganadería (DIGEGA) en 1992, se señaló que un 1.14% de los bovinos y un 9.63% de las fincas ganaderas estaban infectados (de Kantor y Ritacco, 1994).

En México, actualmente, el 66% del territorio nacional tiene una prevalencia menor a 0.5% y se tienen 25 regiones o estados considerados como de baja prevalencia (SENASICA, 2013). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA) ha reconocido 25 regiones de baja prevalencia de tuberculosis bovina, de las cuales 13 regiones pueden exportar con una sola prueba de tuberculina de lote, 11 regiones con prueba de lote y

prueba de hato de origen y una región no requiere pruebas de tuberculina para exportar ganado castrado a los Estados Unidos (SENASICA, 2013).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

2.2.1 Características generales del género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* pertenece al filo Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden Actinomycetales, y se le ha otorgado su propia familia, la Mycobacteriaceae (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2005). De acuerdo a Euzéby, 1997, el género incluye 153 especies publicadas con validez y 11 subespecies. El género comprende especies responsables por un gran número de enfermedades de gravedad en humanos y animales a nivel mundial, como lo es la tuberculosis (Complejo *Mycobacterium tuberculosis*) y lepra (*Mycobacterium leprae*). Las primeras descripciones de micobacterias datan del siglo IX cuando Gerhard Henrik Armauer Hansen describió el agente causal de la lepra *Bacillus leprae* (Hansen, 1874), y Robert Koch describió al bacilo tuberculoso *Bacterium tuberculosis* (Koch, 1882).

Las características que comparten las especies del género *Mycobacterium* son: bacilos ácido-alcohol resistentes, forma tubular delgada, inmovilidad, aerobios y su incapacidad de esporulación. Otros estándares mínimos para clasificar una cepa dentro del género *Mycobacterium* incluye el contenido de las bases nitrogenadas guanina y citocina (G+C) en el ADN en un rango de 61-71%, y la síntesis de ácidos micólicos de cadena larga que contienen entre 60 y 90 átomos de carbono, los cuales están anclados a los ésteres metílicos de ácidos grasos C22 a C26 por medio de pirolisis (Lévy-Frébault y Portaels, 1992). Ahora se sabe que las micobacterias patógenas tienen una estructura "capsular" que las protege de la actividad microbicida de los macrófagos y además contribuye a la barrera de permeabilidad de la

envoltura celular de la micobacteria (Daffé y Draper, 1998; Rastogi et al., 2001).

Una característica de este género es que posee una pared celular muy gruesa (Draper, 1982), con una estructura de 3 capas que comprende:

1. Una capa basal de peptidoglicano (compuesto por N-acetil-glucosamina y el Ácido N-acetilmurámico).
2. Una capa intermedia compuesta de complejos ácido micólicoarabinogalactanos (mantienen estable la unión de la mureina interna con la envoltura externa de ácidos micólicos).
3. Una capa externa rica en depósitos lipídicos (micósidos, factor cordón (6,6-O dimicoltrealosa), sulfolípidos, etc.) (Imaeda et al., 1968).

Rastogui y colaboradores, en 1986, describieron otra capa adicional compuesta por polisacáridos acídicos. Minnikin en 1991 propuso un modelo estructural para la fracción lipídica de la pared micobacteriana. Este autor propone la existencia de una matriz de ácidos micólicos (unida a los arabinogalactanos) a la cual se asocian covalentemente toda una variedad de complejos lipídicos libres (tiocerolos o ceras no polares, glicolípidos fenólicos, glicopéptidolipidos y los lipooligosacáridos muy polares). La matriz de ácidos micólicos se estructura a su vez en 4 subcapas: la barrera estructural de permeabilidad, la región de uniones paralelas, la región de interacción hidrofóbica y la región hidrofílica exterior.

El peso seco de la pared contiene más de un 60% de lípidos (Kotani et al., 1959), esta fracción lipídica es la responsable de la propiedad de ácido-alcohol resistencia de las micobacterias (Harada, 1976). Ésta consiste en la capacidad del material lipídico para formar complejos estables con ciertos colorantes solubles en lípidos, los cuales no se decoloran mediante el tratamiento con mezclas de alcoholes y ácidos o con ácidos minerales. Esta

propiedad se demuestra mediante las tinciones de Ziehl-Neelsen (Carleton, 1967) o mediante tinción con auramina O (Winblad y Duchek, 1973).

Las micobacterias difieren de otros actinomicetos poseedores de ácidos micólicos (ácidos grasos de elevado peso molecular que poseen un hidroxilo en posición beta y una ramificación en posición alfa) en la complejidad de los tipos de ácidos micólicos presentes; las micobacterias son los únicos microorganismos capaces de sintetizar ácidos micólicos de 60 a 90 átomos de carbono, contienen sólo una o dos insaturaciones y diferentes funciones oxigenadas en su molécula. Esto permite que el análisis de estos lípidos mediante técnicas cromatográficas (cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, etc.) sea útil en la identificación de múltiples especies micobacterianas; se ha comprobado también que la longitud de las cadenas de ácidos micólicos está íntimamente relacionada con la capacidad de ácido-alcohol resistencia (Jenkins, 1981).

Existen varias clasificaciones para las especies del género; en un principio se utilizó la diferencia en el tiempo de reproducción de las micobacterias para dividir las de crecimiento lento y de crecimiento rápido. Las de crecimiento rápido claramente forman colonias visibles dentro de dos a siete días, mientras que las de crecimiento lento tienen un tiempo promedio de división de 12-24 horas, así que requieren alrededor de 15 a 24 días para su formación. Las de rápido crecimiento usualmente son raramente patógenas, incluso las saprófitas. Las de lento crecimiento son generalmente patógenas para animales y humanos y han sido subdivididas en tres grupos de acuerdo a la producción de pigmentos carotenoides visibles: las fotocromógenas producen colonias coloreadas de amarillo después de exponerlas a la luz (grupo I), las escotocromógenas producen colonias de un color amarillo oscuro o anaranjado (grupo II) y las no-cromógenas no tienen pigmento (grupo III). Por motivos prácticos, el género también puede ser dividido en tres grupos basándose en sus características clínicas: el complejo

M. tuberculosis (MTBC), las no cultivables y las micobacterias aparte de tuberculosis (MOTT), también llamadas atípicas o no tuberculosas (NTM) (Timpe y Runyon, 1954).

Los avances en el desarrollo de las técnicas moleculares ahora permiten distinguir las especies del género *Mycobacterium* mediante técnicas sensibles y rápidas basadas en la amplificación de la subunidad 16S del ARN ribosomal (ARNr 16S) (Boddinghaus et al., 1990; Rogal et al., 1990). El ARNr es un constituyente esencial de los ribosomas bacterianos que contiene fragmentos de secuencias altamente conservadas y otros con alguna variabilidad, lo cual es característico para casi todos los organismos (Woese et al., 1987). El ARNr 16s tiene una longitud aproximada de 1,500 nucleótidos y es un componente de la subunidad más pequeña (30s) del ribosoma procariótico 70s. Las pequeñas, pero conservadas, diferencias en las secuencias de la molécula del ARNr permiten el diseño de oligonucleótidos específicos para diferencias al género, grupo ó especie (Tortoli, 2003). Generalmente, las micobacterias de lento crecimiento guardan una copia del ARNr 16s, excepto de *M. terrae* (Ninet et al., 1996) y *M. celatum* (Reischl et al., 1998), mientras que las micobacterias de rápido crecimiento usualmente guardan dos fragmentos de ARNr 16s, excepto *M. chelonae* y *M. abscessus* (Tortoli et al., 2003). El análisis de esta molécula ha sido la herramienta más ampliamente utilizada para los estudios taxonómicos del género (Tortoli, 2006; Biet et al., 2005; Tortoli, 2011).

El género *Mycobacterium* exhibe un potencial zoonótico considerable, que engloba muchos patógenos tanto en humanos como en animales, algunos responsables por enfermedades conocidas desde tiempos antiguos. Más aún, dos miembros del complejo *Mycobacterium avium* (MAC), *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y *M. avium* subespecie *hominissuis*, son considerados agentes zoonóticos importantes debido a su posible participación en la enfermedad de Crohn (*M. a. paratuberculosis*) y como patógeno

oportunista en pacientes con VIH (*M. a. hominissuis*) (Inderlied et al., 1993). Otros agentes zoonóticos importantes son *M. marinum*, *M. fortuitum* y *M. chelonae*, los cuales causan micobacteriosis en los peces y humanos; en humanos esta enfermedad meramente ocupacional también es conocida como “granuloma de pecera” o “enfermedad del manejador de peces” (Decostere et al., 2004). El grupo de micobacterias atípicas comprende especies de lento crecimiento, como *M. abscessus*, *M. goodii*, *M. wolinskyi* y *M. immunogenum*, así como especies de rápido crecimiento como por ejemplo *M. genavense*, *M. celatum*, *M. bohemicum* y *M. interjectum*. Las MOTT son patógenos oportunistas que han cobrado importancia durante las últimas tres décadas debido al incremento de SIDA ya que a menudo ocasionan enfermedad en pacientes inmunocomprometidos. Una amplia gama de patologías pueden ser causadas por las MOTT, como linfadenitis cervical, infecciones post-traumáticas y pos-quirúrgicas, enfermedad pulmonar crónica, infecciones cutáneas o pneumonitis por hipersensibilidad (Tortoli, 2009). Finalmente, de igual o mayor importancia zoonótica, existe *M. bovis*, del MTBC, micobacteria capaz de causar tuberculosis en bovinos y humanos, ya sea de presentación pulmonar o extrapulmonar, esta última es la de mayor incidencia debido a la ingestión de productos lácteos no pasteurizados por parte del humano (de la Rúa-Domenech, 2006).

2.2.2. El complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Las especies de micobacterias que producen tuberculosis en humanos y animales se encuentran agrupadas en el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Este grupo de bacterias se caracteriza por tener un 99.9% de similitud a nivel de su genoma (Boddinghaus et al., 1990; Sreevatsan et al., 1997; Huard et al., 2006). El complejo tiene una estructura poblacional altamente clonable con poca a nula evidencia de recombinación (intercambio de ADN cromosómico) entre cepas (Supply et al., 2003; Smith et al., 2006; Hershberg et al., 2009).

A la fecha, el MTBC incluye las siguientes especies: *M. tuberculosis* (Koch, 1882), *M. bovis* (Karlson y Lessel, 1970), *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette y Guérin, 1921), *M. africanum* (Castets et al., 1968; Castets et al., 1969), *M. microti* (Wells and Oxon, 1937; Reed, 1957), *M. canetti* (van Soolingen et al., 1997), *M. pinnipedii* (Cousins et al., 2003), y *M. caprae* (Aranaz et al., 2003); además han sido nombrados los bacilos Oryx (Lomme et al., 1976) y Dassie (Wagner et al., 1958). La división en varias especies tiene un propósito epidemiológico debido a que se basa principalmente en la preferencia de huésped; se ha sugerido que el complejo *M. tuberculosis* representa una serie de grupos con adaptación de huésped consistente con el concepto de ecotipo de Cohan (Cohan, 2002; Smith et al., 2006).

El bacilo tuberculoso fue descubierto por Koch en 1882 y designado en 1896, con el nombre de *Mycobacterium tuberculosis* por Lehmann y Neuman. Durante muchos años *M. tuberculosis* incluyó a los tipos humano y bovino del bacilo. *M. tuberculosis* causa infección en el hombre, aunque también ha sido descrito en perros y gatos (Aranaz et al., 1996) y en otros animales en contacto con humanos infectados. El “bacilo bovino” fue aislado por primera vez por Smith en 1896 e introdujo la nomenclatura de *M. tuberculosis* tipo humano y bovino, el tipo bovino fue denominado *M. tuberculosis typus bovinus* por Lehmann y Neumann en 1907, aunque no fue oficialmente reconocido y publicado hasta 1970 (Karlson y Lessel, 1970). *M. bovis* BCG es una variante atenuada de laboratorio de *M. bovis* producida por Calmette y Guérin en 1908. *M. africanum* fue descrito como una nueva especie por Castets y colaboradores, en 1969, y tiene importancia como productor de la tuberculosis en el continente africano, causa infecciones principalmente en el hombre y en los primates (Thorel, 1980). *M. microti* o “role bacillus” fue descrito por primera vez por Wells y Oxen en 1937 y denominado como tal por Breed y colaboradores, en 1957. Esta especie afecta principalmente a pequeños roedores (Wells y Robb-Smith, 1946; Smith, 1960; Cousins et al., 1994) y aunque se han reportado infecciones en el gato, cerdos (Huitema y Jaartsveld,

1967) y llamas (Pattyn et al., 1970), no es considerado patógeno para el hombre.

Aunque estas especies pueden ser diferenciadas entre sí por un limitado número de pruebas fenotípicas y por sus características epidemiológicas, estudios taxonómicos basados en la relación entre antígenos solubles citoplásmicos y en la homología entre genomas, indican claramente que los integrantes de este complejo son realmente miembros de una única especie. Por ejemplo, estudios de homología ADN-ADN han revelado que no existen diferencias significativas entre ellas, sus porcentajes de homología son entre el 85 y el 100 % (Bradley, 1972; Baess, 1982; Imaeda, 1985). Por ello existe un considerable debate en torno a esta clasificación y algunos autores creen más apropiado clasificarlos como variedades o subespecies de *M. tuberculosis* (Grange, 1979; Collins y Yates, 1982; Imaeda, 1985). Rogall y colaboradores, en 1990, después de secuenciar la subunidad 16S de ARN observaron que no existen diferencias en las secuencias de las distintas cepas del complejo. En un estudio se encontró tras la secuenciación de los espaciadores internos transcritos (ITS) entre las secuencias ribosomales 16S y 23S, que no existían diferencias entre las especies pertenecientes al complejo (Frothingham et al., 1994).

Son microorganismos de crecimiento lento, con una temperatura óptima de unos 37°C, no pigmentados, y aeróbicos o microaerofílicos (según la especie). Como el resto de las micobacterias, son microorganismos ácido-alcohol resistentes, lo cual es aprovechado para la descontaminación de las muestras antes de su siembra. Debido a su lenta velocidad de crecimiento, las micobacterias serían 'ahogadas' por el crecimiento de otros microorganismos si las muestras no fueran tratadas para destruir a las bacterias y hongos acompañantes que pueden estar presentes en las muestras que se reciben para cultivo (Jenkins, 1981).

2.2.2.1. Características de crecimiento

Las micobacterias del complejo MTBC necesitan entre 3 y 5 semanas para conseguir su aislamiento, aunque en algunos casos puede llegar a 4 meses. Se ha comprobado que especies bacterianas con una velocidad de crecimiento mucho más rápida que la de las micobacterias poseen en su genoma múltiples copias de los genes para el ARNr (ARN ribosómico). Bercobier y colaboradores, en 1986, determinaron que las especies de micobacterias de crecimiento rápido poseían 2 copias de estos genes mientras que las especies de crecimiento lento sólo tienen una copia del gen. Para estos autores el bajo número de copias en los genes para el ARNr podría ser la causa de la lenta velocidad de crecimiento (Jenkins, 1981).

Estos microorganismos tienen requerimientos nutritivos complejos y por ello necesitan para su cultivo medios enriquecidos, se han descrito varios medios de cultivo sólidos para las micobacterias del grupo tuberculoso, todos ellos con formulaciones complejas de nutrientes. Entre ellos se incluyen los medios a base de huevo como Lowenstein-Jensen (Jensen, 1932), Coletsos (Coletsos, 1971), y Stonebrink (Stonebrink, 1958), y los medios a base de agar; dentro de estos últimos están aquellos enriquecidos con albúmina sérica bovina como Middelbrook 7H10 (Dubos y Middelbrook, 1947), Middelbrook 7H11 (Gallagher y Horwill, 1977), y aquellos enriquecidos con sangre bovina como B83 (Cousins et al., 1989). Parece ser que la albúmina es un componente esencial para el metabolismo de los lípidos en las micobacterias (Davis y Dubos, 1946, 1947), así mismo el dióxido de carbono tiene un efecto estimulante en el crecimiento de estos microorganismos (Horwitz y Gultiz, 1974).

La micobacteria *M. bovis* crece pobremente en medios glicerinados (Karlson, 1940) y su crecimiento se inhibe con concentraciones de glicerol superiores al 0.5% (Runyon,1970). Sin embargo, se ha comprobado que concentraciones de piruvato sódico entre el 0.2% y el 0.4% favorecen su crecimiento, al igual que el de *M. africanum* (Cohn et al.,1968). *M. tuberculosis* y *M. microti*, sin embargo crecen mejor en medios suplementados con glicerol. Estas características tienden a cumplirse, aunque existen cepas que no muestran preferencia por el sustrato (glicerol o piruvato).En cuanto a las características del crecimiento en medios sólidos, *M. bovis* presenta un crecimiento disgónico en forma de colonias planas de hasta 3 mm de diámetro, de coloración y aspecto ceroso y con apariencia rugosa de superficie; *M. tuberculosis* presenta un crecimiento eugónico con colonias piramidales de gran exuberancia (Royal Commission, 1911).

La morfología de las colonias de *M. africanum* y *M. microti* es muy variable entre cepas, estas características no son constantes y diferenciar entre especies por ellas es, en la mayoría de las veces, inviable. También se utilizan medios líquidos para el cultivo de estos microorganismos como el Kirchner (Mitchison et al., 1973), y se ha comprobado que el crecimiento se favorece con la agitación de los cultivos (Bowles y Segal, 1965). Además la adición de surfactantes como el Tween 80 (mono-oleato de polioxietilen sorbital) o como el Triton X (fenoxi polietoxietanol) a los medios líquidos, mejora la velocidad de crecimiento ya que previene la agregación de las células (Mallmann y Lippe, 1961). El sistema líquido de cultivo BACTEC, que utiliza un sustrato (ácido palmítico) marcado radioactivamente con ^{14}C (Park et al., 1984), se ha utilizado con éxito para el cultivo de *M. tuberculosis* a partir de muestras humanas y para el cultivo de *M. bovis* (Neill et al., 1986), *M. paratuberculosis* (Damato y Collins, 1990) y *M. avium* (Weber y Naumann, 1992), a partir de tejidos animales. Este método de cultivo se basa en la medida de la conversión del sustrato marcado en CO_2 marcado, el cuales

extraído del vial registrándose su actividad como un índice de crecimiento en una escala numérica.

Se han descrito procedimientos para la diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* basados en pruebas de inhibición selectiva del crecimiento con el uso de métodos radiométricos, los cuales requieren un equipo muy costoso y el manejo de radioisótopos, por lo que su uso está limitado (Gross y Hawkins, 1985).

Además de esto, se han descrito varias características moleculares de gran utilidad en la diferenciación de especies y estudios filogenéticos. Estos análisis se pueden realizar con facilidad y en menor tiempo que las pruebas bioquímicas; además son de tipo “binario”, refiriéndose a que proporcionan respuestas de tipo “sí” o “no”. En 1991, un fragmento del genoma, designado como mtp40, fue denominado específico de especie para *M. tuberculosis* (del Portillo et al., 1991; Parra et al., 1991), aunque algunos aislados clínicos de *M. tuberculosis* se encontraron con ausencia de este fragmento (Liebana et al., 1996).

2.2.2.2. Características del genoma

Las micobacterias incluidas en el complejo *M. tuberculosis* presentan un contenido G+C del 65% (Bradley, 1972) y su genoma tiene un tamaño de 2.5 a 2.8×10^9 daltones (Bradley, 1973). Como se mencionó anteriormente, entre todas ellas existe un alto porcentaje de homología en los genomas (Imaeda, 1985). Las secuencias de los genes que codifican para el ARNr están altamente conservadas entre los procariontes y han sido utilizadas para establecer relaciones filogenéticas entre numerosas especies bacterianas (Woese et al., 1983).

2.3 PATOGENIA

Patogénesis es el proceso o mecanismo de enfermedad. En la tuberculosis, este proceso incluye varios elementos que a través de los años se han estudiado como entidades por separado.

2.3.1 Tuberculosis humana

Como ya se mencionó, la tuberculosis en el humano es ocasionada principalmente por *M. tuberculosis*, aunque *M. bovis* también tiene un papel importante. Debido a que es un patógeno obligado, la persistencia de *M. bovis* o *M. tuberculosis* dentro de la población humana depende de su habilidad para llevar a cabo ciclos de infección exitosos, dar lugar a la presentación de la enfermedad (en algunos casos de manera subclínica, seguida de su reactivación), y lograr su transmisión (Warner et al., 2014).

El proceso de infección inicia cuando la bacteria ingresa a los alveolos del pulmón mediante micro-gotas y es ingerida por los macrófagos alveolares. Esto es seguido por un proceso que es importante para la bacteria ya que aparte de sobrevivir, debe llegar al intersticio del pulmón para continuar con el desarrollo de la infección. Una vez en el intersticio, los bacilos son capturados por los monocitos que salen de los capilares o por las células dendríticas que llegan de la superficie o de capilares linfáticos. En la siguiente etapa la bacteria necesita replicarse y llevar a cabo la infección inicial hacia un estado de enfermedad activa. Así, el bacilo dirige los mecanismos esenciales para su transmisión y dar lugar a la necrosis. Un bacilo dentro de un macrófago en un granuloma no puede infectar otro organismo, debe de encontrarse en el espacio extracelular en una cavidad necrótica para lograr esto (Orme, 2014).

La expansión de la micobacteria a otras partes del organismo desde el sitio primario de infección (principalmente el ápex del pulmón y los ganglios linfáticos regionales) ocurre por medio del sistema linfático y sanguíneo. La tuberculosis extrapulmonar de la pleura, huesos, sistema genitourinario, peritoneo, meninges o piel ocurre en aproximadamente 15% de los pacientes afectados (Dube et al., 2012).

El contagio se produce habitualmente por vía aerógena a partir de pacientes bacilíferos con lesiones pulmonares “abiertas”, es decir, conectadas con el exterior por un bronquio de drenaje; al toser se generan aerosoles de pequeñas partículas líquidas, en cuyo interior se encierran uno o dos bacilos, cuando se evapora queda tan sólo el núcleo de bacilos que permanecen suspendidos en el medio ambiente y se desplaza con las corrientes de aire y de esta manera puede ser aspirado por otras personas. Las partículas de tamaño superior a 10 μm quedan retenidas en la barrera mucosa de las vías respiratorias superiores y son eliminadas por el sistema defensivo mucociliar, pero las de menor tamaño (entre 1 y 5 μm) tienen la capacidad de llegar hasta los alvéolos y desencadenan la primoinfección (Orme, 2014).

En la mayoría de las ocasiones, los escasos bacilos que llegan hasta los alvéolos son fagocitados y destruidos por los macrófagos. Sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas (aproximadamente, el 10%) llegará a desarrollar la enfermedad; la mitad de ellos, a los pocos meses de la infección, mientras que el otro 5% necesitará de un largo intervalo (a veces, de varias décadas) para que se produzca la reactivación endógena de lesiones aparentemente curadas que albergan en su interior micobacterias en condiciones metabólicas adversas pero potencialmente viables (Dube et al., 2012).

La aspiración de *M. tuberculosis* hasta los alvéolos desencadena una serie de respuestas tisulares e inmunológicas conocidas como primoinfección

tuberculosa. En primer lugar, se produce un foco de alveolitis exudativa; los macrófagos eliminan un determinado número de micobacterias y si la invasión no ha sido masiva, muchas veces no se pasa esta fase local. Cuando la infección se propaga por las vías linfáticas intrapulmonares hasta los ganglios regionales paratraqueales o mediastínicos da lugar al llamado complejo bipolar (foco pulmonar y adenopatías). En esta fase es habitual que se produzcan pequeñas diseminaciones bacilares por vía hematógena a los segmentos apicales pulmonares, riñones, hígado y huesos, que por lo general suelen controlarse localmente y que no tienen trascendencia clínica alguna (Dube et al., 2012).

En las 2-10 semanas posteriores a la infección se pone en marcha una respuesta inmunológica celular desencadenada por los antígenos de la membrana y del citoplasma de las micobacterias. Los macrófagos reconocen y procesan dichos antígenos y los muestran a los linfocitos T para que estimulen mediante liberación de citosinas, la transformación de un gran número de macrófagos en células que están altamente especializadas en la lucha contra las micobacterias (células epiteliales y gigantes de Langhans) (Warner et al., 2014; Orme, 2014; Dube et al., 2012)

Los linfocitos activadores de los macrófagos, las células epiteliales y las gigantes, se sitúan concéntricamente para rodear e intentar destruir a los bacilos intrusos, lo que origina el característico granuloma tuberculoso que al cabo de un tiempo se reblandece en su centro y deja un núcleo de necrosis caseosa. En muchos casos, este sistema defensivo controla totalmente la infección y una vez cumplido su cometido se reabsorbe y solo queda una pequeña cicatriz fibrosa que, para mayor seguridad, acostumbra a calcificarse. En estas circunstancias es posible que la primoinfección haya sido asintomática y que incluso no deje secuelas detectables en la radiografía de tórax; lo que sí queda es la memoria inmunológica que se pondrá de manifiesto con la prueba de la tuberculina y permitirá diferenciar los individuos infectados de los no infectados. Así pues, según el balance inicial entre el

sistema inmunitario del huésped y las micobacterias tuberculosas, se distinguen tres situaciones diferentes: exposición sin infección, infección sin enfermedad y enfermedad activa (Warner et al., 2014; Orme, 2014; Dube et al., 2012)

La tuberculosis posprimaria, también denominada secundaria o tuberculosis de tipo adulto, es la forma clinico-radiográfica más frecuente, aunque en general el individuo no tiene constancia de la primoinfección previa por haber sido ésta asintomática o poco aparente (Dube et al., 2012).

En algunos casos, sobre todo en los países con alta prevalencia de tuberculosis, la tuberculosis posprimaria se debe a una reinfección exógena pese al relativo grado de inmunidad del sujeto infectado. No obstante, lo más común es la reinfección endógena por micobacterias latentes capaces de resistir ocultas en el interior de algunas células, o en pequeños focos caseosos en condiciones metabólicas adversas en un continuo equilibrio con las defensas orgánicas, que se rompe tras muchos años por alteraciones, transitorias o persistentes, de la inmunidad (Warner et al., 2014; Orme, 2014; Dube et al., 2012).

2.3.2 Tuberculosis bovina

La tuberculosis ocurre en una amplia variedad de especies de mamíferos, una gran parte del conocimiento adquirido sobre la patogenia de la enfermedad ha sido desarrollado en relación al padecimiento en humanos, más que de los animales domésticos. Aun así, el reconocimiento de lesiones tuberculosas macro- y microscópicas en ganado ha ayudado a entender el proceso de la enfermedad y a erradicar la infección de hatos y países. La base del conocimiento acerca de la patología de la enfermedad fue establecida durante las campañas de erradicación llevadas a cabo durante la primera

mitad del siglo XX en varios países Europeos, Norte América, y Australia. La erradicación se inició por el riesgo zoonótico que tiene *M. bovis* y el gran impacto económico que tiene la enfermedad en la agricultura y el comercio (Domingo et al., 2014).

En la actualidad incluso se pueden utilizar modelos de animales (ratones) de laboratorio a los cuales se les inactivan genes específicos para expresar o no una característica en particular e investigar por ejemplo, cómo se comporta la infección de tuberculosis en los bovinos, de esta manera la enfermedad se puede clasificar en ciertas fases de desarrollo y grado de severidad (Cassidy, 2006).

La tuberculosis bovina se manifiesta como un proceso granulomatoso, caseoso-necrosante e inflamatorio crónico que afecta primordialmente a los pulmones y los ganglios linfáticos asociados a éste, pero también puede afectar otros órganos según la vía de entrada de la infección. Esta puede permanecer de manera subclínica durante meses o años hasta que la invasión micobacteriana es tan severa que ocasione interrupción en el funcionamiento del organismo. Las lesiones pueden permanecer localizadas o generalizarse a otros tejidos y órganos (Domingo et al., 2014). Las diferentes fases en el desarrollo de la infección dan lugar a lesiones de distintos tipos morfológicos y en la actualidad la mayoría de los animales infectados en los países con campañas vigentes de erradicación se descubren en las etapas iniciales de la infección. De cualquier manera, los cambios patológicos se dan de acuerdo a la interacción de los mecanismos de defensa del huésped con los factores de virulencia de las micobacterias, lo cual conlleva un delicado equilibrio entre la respuesta inmunológica y los procesos inflamatorios dañinos (Domingo et al., 2014).

De manera predominante, la distribución de las lesiones tuberculosas se da en el tracto respiratorio y los ganglios linfáticos asociados a éste, lo cual ha

llevado a varios autores a confirmar que la infección ocurre con la inhalación de la micobacteria (Francis, 1947). Collins y Grange, en 1983, llevaron a cabo estudios donde se realizó la infección experimental de becerros y proponen que la dosis mínima requerida para que la infección se establezca en el tracto respiratorio es hasta 1000 veces menor que para la vía oral. Existen otros estudios donde se confirma al tracto respiratorio como el sitio primario de infección por medio de la inoculación directa o contacto directo y las lesiones resultantes confinadas a esta área (Neil et al., 1988, 1989; Buddle et al., 1994; Cassidy et al., 1998; Villareal-Ramos et al., 2003).

En el ganado infectado de manera natural las lesiones tuberculosas frecuentemente se encuentran en la región dorso-caudal, o ápex, de los pulmones, muy cercanas a la superficie pleural. Se sugiere que factores tales como el tamaño de las microgotas infecciosas inhaladas y la orientación topográfica del pulmón dentro del cuerpo determinan la dinámica del flujo del aire y la distribución de las lesiones. Pequeñas lesiones “satélite” han sido detectadas con mayor facilidad en los linfonódulos broncomediastínicos en vez de los pulmones debido al menor volumen de tejido de los nódulos en comparación a los pulmones (Cassidy, 2006).

La entrada de las micobacterias hacia las membranas mucosas o hacia los espacios alveolares da lugar al reconocimiento de los componentes de la pared bacteriana y la activación de vías de señalización en los fagocitos. Las micobacterias entonces son fagocitadas por los macrófagos, los neutrófilos son atraídos y se acumulan en el sitio de la infección. Estas células interactúan con otras células involucradas en las respuestas innata y adquirida del sistema inmunológico (Arentz y Hawn, 2007). Cuando el animal se encuentra inmunológicamente competente, aproximadamente el 90% de las infecciones son controladas por esta respuesta inmune inicial, y células TCD4+ específicas y macrófagos activos eliminan las micobacterias o controlan su multiplicación durante años o décadas (tuberculosis latente). Consecuentemente, una

pequeña proporción de los individuos infectados desarrollan la tuberculosis activa (O'Garra et al., 2013).

Después de la infección inicial, las micobacterias viables son transportadas mediante las células fagocíticas a través de vasos linfáticos capilares al nódulo linfático correspondiente, donde se establece un nuevo foco de infección. Esta infección dual se conoce como el complejo primario, y se encuentra principalmente en el tracto respiratorio inferior, aunque la lesión inicial en el pulmón sea muy pequeña o ausente (Domingo et al., 2014).

La típica lesión tuberculosa se conoce como tubérculo, el cual es un nódulo inflamatorio granulomatoso amarillento de aproximadamente 2 a 20mm de diámetro que se encuentra encapsulado por tejido conectivo y puede contener necrosis caseosa central y mineralizada. Histológicamente, los granulomas tuberculosos están formados por neutrófilos, macrófagos epiteloideos que a veces tienen un citoplasma espumoso, y algunas células gigantes multinucleadas (células de Langerhans) (Neill et al., 2001).

La presencia de este tipo de lesiones de gran tamaño, caseosas y necróticas, que están mineralizadas, fibrosas, y regularmente confluentes en un órgano, se conoce como tuberculosis crónica. En el ganado, estas lesiones crónicas ocurren frecuentemente en el pulmón o los linfonódulos mediastínicos. En el pulmón, la lesión crónica se caracteriza por extenderse a través de todo el árbol bronquial con necrosis caseosa multifocal, lo que eventualmente lleva a la formación de lesiones cavernosas dentro del lóbulo afectado. También pueden aparecer lesiones ulcerativas en los bronquios y la tráquea. Así mismo, los nódulos linfáticos afectados de manera crónica pueden estar considerablemente incrementados de tamaño, e invadidos de material granulomatoso caseoso, rodeado de tejido fibroso irregular (Domingo et al., 2014).

Si la respuesta inmune inicial es ineficaz, la infección primaria se puede generalizar durante su etapa inicial; a esto se le conoce como generalización temprana. De manera similar, la generalización puede ocurrir en la fase post-primaria, en este caso se conoce como generalización tardía. La generalización se da como resultado de la diseminación linfática y sanguínea de las micobacterias después de la erosión de pequeños vasos sanguíneos o linfáticos debido a tubérculos crecidos. La forma más común de la generalización es la tuberculosis miliar, la cual se caracteriza por un gran número de pequeños focos o puntos de color amarillo-grisáceo, que no están bien delimitados. Esto se da a consecuencia de la liberación masiva de micobacterias hacia la circulación y su invasión de los pulmones y otros órganos. Aunque de rara ocurrencia, incluso se pueden ver afectadas las superficies serosas, lo cual también sucede debido a la diseminación linfohemática o por la erosión de los granulomas (Domingo et al, 2014).

2.4 EPIDEMIOLOGÍA

2.4.1. Espectro de hospedadores y transmisión de la infección

M. bovis posee uno de los más amplios espectros de hospedadores entre los patógenos conocidos, la epidemiología de esta infección es muy compleja y engloba interacciones entre el hombre, animales domésticos y animales salvajes. Entre los posibles hospedadores de esta especie se encuentran el hombre, los primates no humanos, vaca, cabra, oveja, cerdo, jabalí, caballo, asno, gato, perro, ciervo, bisonte, búfalo, antílope, oryx, camello, llama, alpaca, reno, tejón, zarigüeya, liebre, conejo, hurón, feneco, elefante, jirafa, rinoceronte, tigre, león, foca, etc. En el ganado bovino, los resultados de infecciones experimentales por las vías respiratoria y digestiva, junto a la distribución de las lesiones encontradas en el ganado naturalmente infectado, muestran que aproximadamente un 80-90% del ganado se infecta por inhalación (Francis, 1947; Pritchard, 1988).

Varios estudios clásicos realizados con infecciones experimentales apoyan también esta teoría, y se ha comprobado que mientras que bastan unos pocos bacilos para producir la infección por vía respiratoria, se necesitan varios miles de millones de ellos para hacerlo por vía oral (McFadyean, 1910; Chausé, 1913).

La lesión más frecuentemente encontrada es un foco bronconeumónico en pulmón y lesión en el ganglio linfático correspondiente (complejo primario). La forma en que se desarrollan las lesiones en los linfonódulos retrofaríngeos es aún desconocida; Thoen y Himes, en 1986, propusieron la teoría de que estas lesiones podrían deberse a la inhalación de bacilos que no penetran en el tracto respiratorio inferior y que empiezan a multiplicarse en la orofaringe, la cual drena en los retrofaríngeos.

Tradicionalmente, y de un modo erróneo, se ha considerado que sólo excretan *M. bovis* aquellos animales con lesiones en pulmón claras y evidentes. Al contrario, se ha comprobado que los animales en las primeras fases de la enfermedad y antes del desarrollo de lesiones visibles, contribuyen notablemente a la producción de aerosoles infectivos (McIlroy et al., 1986; Neill et al., 1988). Neill et al., en 1991 y 1992, comprobaron que existe una relación inversamente proporcional entre la dosis infectante y el tiempo que transcurre hasta la liberación por vía respiratoria de *M. bovis*, además de que en las infecciones naturales la eliminación de bacilos comienza a los 87 días después de la infección, lo que ocurre en algunos casos en ganado negativo a la tuberculina. Aunque en el pasado las vías de transmisión oral y genital pudieron tener importancia epidemiológica, desde el establecimiento de los programas de erradicación la vía dominante de transmisión es la aerógena (Morris et al., 1994).

La vía de transmisión determina la ubicación y el espectro de las lesiones observadas en la tuberculosis bovina. La inhalación es la ruta de infección más común y ocasiona lesiones en la nasofaringe y el tracto respiratorio inferior, como los pulmones y ganglios linfáticos asociados. En contraste, la ingestión de *M. bovis* por medio de pastura, alimento o agua infectados usualmente ocasiona lesiones en los linfonodos mesentéricos, y en ocasiones en la pared intestinal. Otras rutas de infección como la transplacentaria, genital o intramamaria son infrecuentes debido a la situación epidemiológica de la mayoría de los países con programas de erradicación vigentes (Menzies y Neill, 2000). La transmisión transplacentaria hacia el feto probablemente resulta de una endometritis tuberculosa y lleva a un complejo primario en el hígado y/o los nódulos linfáticos portales. Los becerros nacidos con infecciones congénitas usualmente desarrollan la enfermedad generalizada en las primeras semanas o meses de vida. La transmisión sexual de la tuberculosis bovina puede ocurrir cuando la infección se establece en los órganos sexuales; la transmisión intramamaria ocurre de manera iatrogénica de vaca a vaca mediante el uso de tratamientos intramamarios. Por último, la transmisión alimentaria en becerros lactantes es frecuentemente consecuencia de la presencia de *M. bovis* en la leche materna (Vural y Tunca, 2001).

Ciertos estudios parecen demostrar que dentro del ganado bovino existen variaciones en la resistencia a la tuberculosis, de forma que las razas africanas y asiáticas (cebús) son más resistentes a la enfermedad que el ganado europeo (Carmichael, 1939, 1941). En el caso de los primates no humanos hay que señalar que son igualmente susceptibles a la infección por *M. bovis* y *M. tuberculosis*, de igual manera también se han notificado infecciones por *M. africanum*. La infección aparece raramente en animales en libertad, aunque existen comunicaciones de casos ocurridos por ingestión de carcasas procedentes de ganado tuberculoso (Tarara et al., 1985). Sin embargo, en cautividad la incidencia de tuberculosis en estos animales es extremadamente alta y se han comunicado varios brotes de enfermedad en

zoológicos (Wilson et al., 1984) y animalarios (Thoen et al., 1977), por lo que la vía de transmisión aerógena juega un papel importante.

2.4.2. Supervivencia de *M. bovis* en el ambiente

Aunque *M. bovis* es un patógeno obligado, puede sobrevivir en el ambiente durante largos períodos de tiempo si las condiciones son favorables. Los principales factores que influyen en esta capacidad de supervivencia son: temperatura, humedad, pH, tensión de oxígeno, exposición a la luz solar, disponibilidad de nutrientes, microflora existente y localización en el ambiente. En 1994, Morris y colaboradores, indican que la duración de la infectividad de *M. bovis* en pastos, orina y heces debe medirse en semanas y no en meses, ya que bajo las mismas condiciones, los microorganismos existentes en el material contaminado de forma natural mueren mucho más rápidamente que los presentes en el mismo tipo de material pero contaminado experimentalmente. Si se contaminan heces o suelo estéril con *M. bovis* y se almacenan protegidos de la luz, los microorganismos pueden sobrevivir varios meses. Sin embargo, a medida que las condiciones ambientales se acercan a las naturales, el tiempo de supervivencia disminuye considerablemente. Estos hechos, unidos a la elevada dosis infectiva que se requiere para producir infección vía oral, hacen pensar que la importancia real de la existencia de productos contaminados en el medio ambiente es menor de lo que se había considerado tradicionalmente.

En el caso de los cadáveres de animales infectados, la supervivencia de *M. bovis* depende del grado de putrefacción de los mismos y por lo tanto de la temperatura ambiente y grado de humedad. Little y colaboradores, en 1982, demostraron que el aislamiento de *M. bovis* a partir de cadáveres de tejones podía conseguirse después de 2 semanas (cadáveres en la superficie de los pastos) o de 6 semanas (cadáveres enterrados) de la muerte del animal. Pfeiffer y Morris, en 1991, fueron capaces de recuperar *M. bovis* a partir del

interior de cadáveres secos con, al menos, un mes de antigüedad. Estos cadáveres son entonces fuente de infección para los carroñeros y para el ganado que pasta en sus proximidades.

En ausencia de reservorios salvajes, la tuberculosis bovina es una enfermedad controlable y el éxito de su control está determinado por los hábitos de comportamiento de ganaderos y tratantes de ganado y por el ganado en sí mismo. La existencia de pruebas con una sensibilidad adecuada que se apliquen con un intervalo menor de un año, la inmediata eliminación de los animales positivos a las mismas, y la instauración de una política de seguimiento estricta han permitido la erradicación de la enfermedad en varios países. Hay que destacar que el movimiento de ganado entre rebaños y la actitud de los ganaderos ante el saneamiento, son los factores más importantes que condicionan el éxito o fracaso del control (Aranaz et al., 1996).

La situación es completamente diferente cuando existe un reservorio salvaje. Cuando una especie es considerada como un reservorio, existe transmisión y mantenimiento de *M. bovis* dentro de esa especie y transmisión desde la misma al ganado. En estos casos la dificultad de controlar a las poblaciones salvajes y el conocimiento incompleto de sus cadenas epidemiológicas, hacen que la erradicación de la tuberculosis bovina en esas áreas sea prácticamente inviable. Hasta el momento existen varios reservorios reconocidos (tejón, zarigüeya, algunos ungulados) en los que la vía principal de transmisión intra- e inter-específica es la vía respiratoria. Además existe una larga lista de posibles hospedadores salvajes de *M. bovis*, y debido a que la tuberculosis no es una enfermedad estática, deberíamos preguntarnos si en un futuro esta infección no se hará endémica en un espectro dinámico de hospedadores salvajes. Por ello los programas de control deben poner un especial interés en limitar al máximo los posibles contactos de estos hospedadores con ganado afectado (Morris et al., 1994).

2.4.3. La zoonosis

En 1888, Walley expresó su teoría de que la tuberculosis bovina podía ser transmitida al hombre mediante leche, productos lácteos, carne o directamente por contacto con animales infectados; por lo que propuso, como medida de control, que la inspección de las canales se hiciese bajo supervisión veterinaria.

En los EE. UU., Ravenel en 1902 y Park en 1913, presentaron pruebas irrefutables de la transmisión de *M. bovis* del ganado al hombre. Como respuesta, en 1906 y después de constatar que en aquel año el 25% de las muertes por tuberculosis en humanos se debieron a *M. bovis*, se creó un Comité Federal Veterinario encargado de la inspección de la carne. Posteriormente, en 1917, se comenzó con un programa de erradicación de la enfermedad en el ganado, lo cual no se hizo en Europa hasta 1935, debido en gran parte a las erróneas ideas difundidas por Koch de que el bacilo bovino no era tan patógeno y transmisible como el bacilo humano (de la Rúa-Domenech, 2005).

A principios de siglo empezaron a ser frecuentes las descripciones de casos clínicos de tuberculosis humana originados por *M. bovis*; así McFadyean, en 1902, denunció que la leche procedente de vacas tuberculosas era la causa de tuberculosis intestinal en niños escoceses. En este mismo año, Ravenel fue el primero en aislar e identificar una cepa de *M. bovis* de un niño muerto por meningitis tuberculosa y Griffith, en 1914, describió el primer caso bacteriológicamente confirmado de tuberculosis pulmonar por *M. bovis*, por lo que fue posible observar que *M. bovis* era capaz de producir cuadros clínicos de tuberculosis en el hombre.

En 1929 el 5% de los casos de tuberculosis humana en el Reino Unido se debían a *M. bovis*, este porcentaje era del 30% en los casos de niños

menores de 5 años. *M. bovis* era aislado de lesiones en piel, lesiones cervicales, meningitis tuberculosas, lesiones en huesos y articulaciones, tuberculosis genitourinaria, y sólo en un 1 a 3 % de los casos en procesos de tuberculosis pulmonar (Cutbill y Lynn, 1944). En estos años, la principal vía de infección por *M. bovis* era la ingestión de leche, seguida por la exposición ocupacional (carniceros, lecheros etc.), por ello la enfermedad aparecía preferentemente en localizaciones no pulmonares.

El papel de la leche como vehículo para la transmisión de la tuberculosis bovina es conocido por los veterinarios desde hace más de un siglo (Fleming, 1875). La fuente habitual de *M. bovis* en la leche es la infección mamaria, pero también puede ocurrir por contaminación con heces, descargas uterinas, polvo del establo, etc. En EE. UU. la pasteurización de la leche se recomendó en 1907, como medida preventiva de la tuberculosis; sin embargo, en gran parte de Europa, existía aún un gran debate sobre el papel inmunizante de la leche tuberculosa, debido a la opinión de algunos sectores médicos de que la patogenicidad de *M. bovis* para el hombre era menor que la de *M. tuberculosis* (Cobbett, 1917; Calmette, 1936), así mismo de que una infección localizada por *M. bovis* protegía de la muerte por tuberculosis. Se hicieron estudios relacionando las tasas de mortalidad por tuberculosis en humanos y las cifras de incidencia de tuberculosis bovina (Francis, 1958; Sjogren y Sutherland, 1975); comprobándose que sobre la población en general, la leche tuberculosa tenía realmente un efecto inmunizante pero también un inaceptable precio para una minoría. Por lo que se concluyó que, si la población realmente necesitaba tal inmunidad, era más adecuado y seguro proporcionársela mediante la vacunación con BCG (bacilo de Calmette y Guérin) (aunque actualmente existen serias dudas sobre la eficacia real de la misma).

Otra de las posibles vías de transmisión de la enfermedad es la carne procedente de ganado infectado. Dado que la carne es un alimento que

generalmente se cocina antes de su consumo, no representa una grave fuente de infección para el hombre. Aun así existen las excepciones del peligro que entraña como enfermedad ocupacional para trabajadores de mataderos y manipuladores de carne, además del riesgo para aquellas culturas en las que la carne se consume cruda o poco cocinada. Ruys en 1939, y Sigurdsson en 1945, demostraron la transmisión de la tuberculosis por inhalación dentro del establo, desde el ganado al hombre; y que era posible la propagación de *M. bovis* entre humanos por vía pulmonar. Esta afirmación plantea aún controversia aunque han sido publicados varios casos (Collins y Grange, 1987).

Debido al avance de las campañas de erradicación en animales, la incidencia actual de casos de *M. bovis* en humanos ha descendido considerablemente. La instauración de las políticas de decomiso de alimentos afectados y de pasteurización de la leche, hacen que los casos actuales de tuberculosis humana por *M. bovis* aparezcan, casi exclusivamente, como reactivaciones de antiguas infecciones. El pulmón es hoy en día el órgano más afectado, seguido por el tracto génitourinario y por linfadenitis cervicales (Yates y Grange, 1988). El hombre puede ser una fuente de infección *M. bovis* para el ganado y estas transmisiones han sido comunicadas en diferentes áreas: Suecia (Magnusson, 1941), Inglaterra (Lesslie et al., 1968), EE. UU. (Baldwin, 1968), Holanda (Huitema, 1969), Checoslovaquia (Rossi y Dokoupil, 1969), Nueva Zelanda (Black, 1972), Canadá (Wigle et al., 1972) y Alemania (Werner, 1981). Estos casos reportaron la transmisión de la enfermedad desde el hombre al bovino por contaminación urinaria y fecal de las camas, pastos y alimentos de los animales, y por vía aerógena.

Existen trabajos aislados sobre la incidencia de estas infecciones en áreas concretas como Argentina, en la que los porcentajes de tuberculosis humana por *M. bovis* están entre el 0.4% y el 6% (Centragolo, 1971; Barrera y de Kantor, 1987). Las cifras de aislamiento de *M. bovis* de humanos para el

Reino Unido en la década de 1980 fueron del 1.9% de los casos de tuberculosis (Davies et al., 1984), así mismo de la Rúa-Domenech (2006) reportó una proporción de 0.5% a 1.5%. Previo a la implementación de la pasteurización de la leche, la cifra se elevaba al 2.6% (Wilkins et al., 1986). En 1981, Collins y Yates confirmaron que el 2.7% de los casos de tuberculosis humana en el sureste de Inglaterra se debían a *M. bovis*. Yates y Grange en 1988, estimaron que en esa misma región, el bacilo bovino era responsable del 1 % de todos los casos de tuberculosis y del 0.6% de los casos de tuberculosis pulmonar.

A nivel global y de acuerdo con los datos publicados por la PAHO/WHO (Pan American Health Organization/World Health Organization), cada año en América Latina aparecen 7,000 nuevos casos de tuberculosis humana por *M. bovis*, lo que representa una tasa de 2 casos por 100,000 habitantes. Las cifras oficiales no son demasiado fiables y la verdadera incidencia podría ser hasta ocho veces superior, sobretodo en países en vías de desarrollo (de Kantor et al., 1991). Esto se debe a que no se lleva a cabo de manera rutinaria la diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* en el diagnóstico de la enfermedad.

2.5 DIAGNÓSTICO

2.5.1. Métodos de diagnóstico de TB en humanos

2.5.1.1. Tuberculosis pulmonar

La localización pulmonar de la TB es la más frecuente pero puede observarse en cualquier órgano. El cuadro clínico es de comienzo insidioso y naturaleza crónica. Esto dificulta el diagnóstico precoz. El síndrome de impregnación bacilar está constituido por síntomas generales como astenia, adinamia, hiporexia, pérdida de peso, febrícula vespertina y sudoración nocturna asociada a signo sintomatología respiratoria (tos, expectoración, disnea). En aproximadamente 20 % de los casos los síntomas constitucionales son el único hallazgo de enfermedad (Dorman, 2010).

El paciente puede presentar disnea, dolor torácico, hemoptisis, la tos es por mucho el síntoma pulmonar más frecuente; al inicio puede ser seca y a medida que avanza la enfermedad se transforma en productiva, con expectoración mucosa, mucopurulenta o hemoptoica (National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2006). Otras formas de presentación son la pseudoneumónica, la hemoptisis franca y un cuadro febril que puede simular un estado gripal. Las manifestaciones clínicas de la TB se ven influenciadas por la edad y el estado de la inmunidad (English et al., 2006).

En pacientes mayores de 65 años los síntomas inespecíficos son los más frecuentes como por ejemplo la fiebre de origen desconocido. Los hallazgos clínicos de la TB en el paciente infectado con el VIH dependen de la severidad de la inmunodepresión. Las personas con niveles de linfocitos T CD4+ > 200/mm³ presentan síntomas similares al inmunocompetente, y la TB queda circunscripta al pulmón. En los individuos con recuentos por debajo de esa cifra es más frecuente el compromiso extrapulmonar y las formas diseminadas (Ruiz et al., 2008).

2.5.1.2. Tuberculosis extrapulmonar

Afecta cualquier órgano que no sea el pulmón. Incluye formas que están ubicadas parcial o totalmente dentro del tórax y son también consideradas

extrapulmonares como la TB pleural, adenopatías hiliares o mediastinales (English et al., 2006).

La incidencia de localizaciones extrapulmonares es del 15 al 20% en pacientes inmunocompetentes, observándose hasta el 70% en inmunosuprimidos. La sintomatología depende de la localización. Las más comunes son la pleural y la ganglionar (National Collaborating Centre for Chronic Conditions, 2006). Otras localizaciones son: laríngea, abdominal, genitourinaria, osteoarticular, meníngea y cutánea pero el bacilo puede afectar cualquier órgano (Dorman, 2010).

2.5.1.3. Tuberculosis diseminada

Esta presentación compromete más de 2 órganos y hay gran deterioro del estado general, hipertermia, disnea, astenia e incluye signos clínicos de aquellos órganos que pueden estar afectados: derrame pleural, trastornos digestivos, hematológicos (anemia, linfopenia, trombocitopenia) hepatoesplenomegalia y a veces signos meníngeos. En las evoluciones crónicas se observa compromiso del estado general y fiebre de origen desconocido. En las formas agudas puede presentarse como síndrome del distrés respiratorio del adulto. La naturaleza no específica de la presentación es probablemente la causa más frecuente del retraso diagnóstico (Dorman, 2010).

2.5.1.4. Prueba dérmica

La prueba de la tuberculina se realiza mediante la técnica de Mantoux y es ampliamente utilizada. Sus ventajas son su escaso coste económico y su fácil realización, aunque tiene también inconvenientes. La prueba puede presentar falsos positivos debido a la sensibilización del sistema inmune

causada por la administración previa de la vacuna BCG o de la exposición a micobacterias no tuberculosas (Sancineto, 2009).

También se pueden obtener falsos negativos en las personas con alteraciones del sistema inmunitario, especialmente en las personas infectadas por el VIH, y aquellas que reciben terapias inmunosupresoras, y también en los casos de infecciones graves por virus o de tuberculosis diseminada. La fiabilidad de la prueba de la tuberculina para la detección de infección tuberculosa en niños menores de 6 meses es menor debido a que el mecanismo inmunitario de respuesta no se ha desarrollado por completo (Ruiz et al., 2008).

2.5.1.5. Diagnóstico por imágenes

2.5.1.5.1. Radiografías tórax

La radiografía de tórax es el primer método de diagnóstico por imágenes y en la mayoría de los casos el único. El primer estudio debe incluir las proyecciones postero-anterior y latero-lateral (frente y perfil). Una radiografía de tórax normal tiene un alto valor predictivo negativo especialmente en pacientes inmunocompetentes, la frecuencia de falsos negativos es de 1%. Este porcentaje se incrementa a un 7 a 15% en pacientes HIV positivos. Las manifestaciones radiológicas dependen de factores del huésped: edad, inmunosupresión, TB previa y varían en la TB primaria y extraprimaria (Mert et al., 2001).

Pueden observarse:

Linfoadenopatias hiliares hasta un 96% en niños, sin embargo también se puede observar en adultos con HIV. Más frecuentes unilaterales y del lado derecho (Burrill et al., 2007).

1. Opacidades parenquimatosas de espacio aéreo: consolidación localizada más frecuentemente en los lóbulos inferiores, y en el pulmón derecho.
2. Opacidades parenquimatosas del intersticio: la forma miliar es la más común y corresponde a nódulos de entre 2-3 mm de distribución homogénea, con gradiente ápico basal y ligero predominio en las bases. Pueden coalescer y formar consolidaciones focales y difusas.
3. Enfermedad traqueobronquial: atelectasias e hiperinsuflación.
4. Derrame pleural: puede ser la única manifestación de tuberculosis. El engrosamiento pleural y la calcificación pueden observarse como secuelas de la enfermedad.

2.5.1.5.2. Tomografía axial computada (TAC)

La mayor parte de los casos de TB pueden seguirse solo con radiografía simple de tórax, aunque existen circunstancias en las que es necesario el uso de la TAC. Esta permite detectar lesiones mínimas, enfermedad de la vía aérea y diseminación endobronquial; se puede observar el denominado patrón de árbol en brote, que corresponde al llenado de bronquios centrilobulillares con exudado inflamatorio. En el caso de adenopatías hiliares puede demostrar la hipodensidad central de los ganglios secundaria a necrosis, hallazgo altamente sugestivo de enfermedad activa (MacAdams et al., 1995).

2.5.1.5.3. Ultrasonografía

La ecografía o ultrasonografía es un método auxiliar importante a indicar en determinadas localizaciones de la TB:

1. Estudio de colecciones en serosas: líquido en cavidad libre, tabicaciones, engrosamiento (pleura, pericardio, peritoneo).
2. Determinación del contenido sólido o líquido de adenopatías.

3. En abdomen es altamente sugestivo de enfermedad granulomatosa diseminada (especialmente TB pero no es un patrón específico) en inmunocomprometidos (HIV/Sida, por ejemplo) la presencia de imágenes hipoecoicas a nivel hepático y esplénico asociado a múltiples adenopatías, frecuentemente hipoecoicas, abdominales y retroperitoneales (Méndez et al., 1995).

2.5.1.4. Baciloscopía (BAAR)

La baciloscopía o examen microscópico de extendido de esputo, líquidos de punción, material purulento y homogeneizados de tejidos es ampliamente usado como método diagnóstico de enfermedad tuberculosa pulmonar en países subdesarrollados. En muchos de estos países, la prevalencia de la enfermedad es elevada, por esto los resultados de muchos estudios han mostrado rendimientos diagnósticos muy variables. Se trata de un método rápido, sencillo de practicar y poco caro. Los métodos clásicos de tinción son el método de Ziehl-Neelsen y el método de Kinyoun que se evalúan con luz natural reflejada o artificial. Otro método muy utilizado es la tinción con auramina y la evaluación con luz ultravioleta, que detecta los bacilos por fluorescencia. Este método de cribado permite el examen de múltiples preparaciones con una mayor rapidez y menor cansancio del observador (WHO, 2008).

Además, para aumentar la capacidad de detección de cualquiera de estos métodos, el esputo debe ser previamente procesado para conseguir una homogeneización y una concentración. La sensibilidad de esta prueba es mayor en secreciones respiratorias, como esputo, lavados bronquiales, etc. (normalmente ricas en bacilos) a lo contrario de otras muestras corporales, como orina, jugo gástrico, etc. (a menudo paucibacilares) (Sancineto, 2009).

La OMS clasifica un caso de tuberculosis pulmonar como definitivo cuando se obtiene el resultado de un cultivo positivo a *M. tuberculosis*, sin

embargo en los países en los que el cultivo no se encuentra disponible de forma rutinaria se define como la presencia de dos baciloscopías positivas (WHO, 2008). Esta definición refuerza la necesidad de la obtención de tres muestras para el examen microscópico según los estándares internacionales.

2.5.1.5. Cultivo

El cultivo positivo a *Mycobacterium tuberculosis* se considera el patrón de referencia para el diagnóstico de tuberculosis y según la OMS, un único cultivo define un caso de tuberculosis (WHO, 2008). La obtención de una muestra de secreción respiratoria permite realizar una baciloscopía y un cultivo capaz de recuperar micobacterias. A partir del cultivo se puede obtener el perfil de sensibilidad del microorganismo a diferentes antibióticos. Clásicamente el cultivo de las muestras se realiza en un medio sólido, de Löwenstein-Jensen. En este medio de cultivo, la mayoría de los resultados se obtienen entre la segunda y cuarta semana, mientras que para un resultado negativo se debe esperar hasta las seis u ocho semanas. Además, el cultivo puede presentar resultados falsos negativos, por error humano en la realización del mismo, y falsos positivos por contaminación cruzada, lo cual consiste en la transferencia accidental de bacilos de una muestra con alta carga bacilar a la o las procesadas subsecuentemente (Alonso et al., 2007). Existen métodos de cultivo en medio líquido con el objetivo de aumentar la rentabilidad y obtener resultados en el menor tiempo posible, desde 7 a 8 días (BACTEC MGIT960, BacTALERT 3D, ESPII) (Dinnes et al., 2007).

2.5.1.6. Histopatología

En muestras de biopsias (pleural, ganglionar, transbronquial, dérmica, etc.) el hallazgo microscópico del granuloma caseificante característico de la TB es altamente sugestivo de la enfermedad. Aunque las tinciones para BAAR sean positivas, no confirman en forma absoluta la enfermedad. Parte del

material obtenido debe enviarse en solución fisiológica al laboratorio de TB para homogeneización y cultivo (Sancineto, 2009).

2.5.1.7. Interferón gamma (INF- γ)

En estos últimos años han aparecido nuevas técnicas con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la infección tuberculosa latente. Estas técnicas detectan el interferón gamma producido por las células T previamente estimuladas (sensibilizadas) por antígenos específicos de *M. tuberculosis* como el ESAT-6 (Early Secretory Antigen Target-6) y el CFP-10 (Culture Filtrate Protein 10) y el TB7.7. Existen dos pruebas comerciales: el QFT (QuantiFERON TB Gold o QuantiFERON TB Gold in-Tube, laboratorios Cellestis) y el T-SPOT.TB (de laboratorios Oxford Immunotec, Ltd.). El QFT Gold In-Tube incorpora, además de los dos antígenos citados, un tercero, el TB7.7. El QFT estimula la sangre total incubada con los antígenos y determina por ELISA (pg/ml ó UI/ml) la cantidad de interferón. El T-SPOT TB requiere separar primero las células mononucleares, estimularlas con los antígenos y hacer la lectura por medio de la técnica del ELISPOT en la cual cada punto representa una célula T secretora de interferón gamma (Menzies et al., 2007).

2.5.1.8. ELISA

También existen métodos inmunológicos basados en la detección de anticuerpos, antígenos e inmunocomplejos. Se trata de métodos diagnósticos indirectos. Los más evaluados tienen como objetivo la detección de la respuesta humoral (IgG, IgA, IgM) a las micobacterias a través del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA) (Menzies et al., 2007).

2.5.1.9. Métodos moleculares

Recientemente se han desarrollado métodos moleculares basados en la identificación de secuencias de ADN específicas de las micobacterias con el objetivo de aumentar la precisión y obtener resultados en un tiempo mucho menor a los del cultivo. La técnica más conocida es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con pruebas comercializadas o con protocolos desarrollados con pruebas no comerciales (Menzies et al., 2007), mediante la hibridación con sondas que detecten genes específicos del complejo *M. tuberculosis* y de resistencia a R (*rpoB*) y a H (*katG* e *inhA*) y un posterior revelado (Domínguez et al., 2008).

Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos son caras, de alta especificidad y sensibilidad, por lo que para evitar falsos positivos solamente se analizan esputos BAAR positivos.

2.5.2. Métodos de diagnóstico de TB en bovinos

El diagnóstico preciso y confiable de la tuberculosis en bovinos juega un papel primordial en los esfuerzos de control y erradicación que se llevan a cabo por parte de las autoridades sanitarias en cada país. Es necesario la implementación de nuevas herramientas que contribuyan con la identificación de animales infectados que actúen como diseminadores del bacilo dentro del hato (García-Casanova, 2013).

2.5.2.1. Pruebas ante mortem

La prueba de la tuberculina es la prueba primaria ante mortem para realizar el diagnóstico de tuberculosis bovina y está prescrita por la

Organización Internacional de Epizootias para llevar a cabo el comercio internacional (OIE, 2009).

La prueba consiste en la aplicación intradérmica de derivados proteícos puros de *Mycobacterium bovis* (PPD bovino) y *Mycobacterium avium* (PPD aviar), que se aplica a los bovinos partir de los dos meses de edad. El resultado de la prueba se obtiene a las 72 horas de la inoculación, cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor, necrosis o cualquier cambio por mínimo que sea en el sitio de aplicación indica positividad. Estas pruebas deben aplicarse a los bovinos por Médicos Oficiales y/o Médicos Veterinarios aprobados (OIE, 2009).

Existen tres pruebas de la tuberculina:

a) Prueba en el pliegue anocaudal. Consiste en inocular intradérmicamente 0.1ml de PPD bovino en el pliegue anal, en la base interior del maslo de la cola o en la zona media cervical (NOM-031-ZOO-1995).

b) Prueba doble comparativa. Se emplea para diferenciar animales infectados por el bacilo *M. bovis* de *M. avium*. Se aplican en la tabla del cuello, de manera independiente, 0.1ml de PPD aviar y 0.1ml de PPD bovino. La diferencia entre las mediciones del grosor de la piel antes y después de la aplicación de los PPD's se grafican en una cuadrícula específica que indicará el resultado de la prueba (NOM-031-ZOO-1995).

c) Prueba cervical simple. Solo se aplica 0.1ml de PPD bovino en la tabla del cuello. Se emplea en hatos con antecedentes de tuberculosis (NOM-031-ZOO-1995).

Otra prueba muy utilizada a parte de la tuberculinización es la medición de interferón gamma (IFN- γ) por medio de la obtención de muestras

sanguíneas del bovino. La detección de IFN- γ en plasma es una prueba alternativa o complementaria, y se emplea una técnica que se basa en una prueba inmunoenzimática de sándwich. En esta prueba, la placa es sensibilizada con un anticuerpo específico hacia IFN- γ , la cual recibe el plasma obtenido de sangre completa sensibilizada con tuberculina aviar o con tuberculina bovina para posteriormente identificar la presencia del IFN- γ con un sistema de anticuerpo específico marcado en un formato de ELISA. De manera comercial y muy popular existe la prueba Bovigam® (García-Casanova, 2013).

Una variación para detectar IFN- γ es la técnica llamada T-spot TB o ELISPOT. Esta consiste en contar el número de células T antimicobacterias que producen IFN- γ . En las placas se siembran células estimuladas con el antígeno, se incuban toda la noche para posteriormente realizar el revelado con un anticuerpo marcado. La lectura se efectúa a través del recuento de manchas en cada pocillo (Vordermeier y Whelan, 2012).

2.5.2.2. Pruebas postmortem

La detección de lesiones durante el sacrificio representa un procedimiento pasivo de vigilancia de la tuberculosis bovina. Esta inspección se realiza de manera visual principalmente, llegándose a incidir órganos y nódulos linfáticos que cuenten con alguna lesión sospechosa. Los nódulos linfáticos y órganos que se toman en cuenta son submaxilares, parotídeos, retrofaríngeos, traqueobronquiales, mediastínicos, hepáticos, mesentéricos, cervical superior, popítleos, ilíacos, escrotales y mamarios, así como pulmón, hígado, bazo, intestino y riñón (OIE, 2009).

2.5.2.3. Métodos directos

Estos métodos de diagnóstico incluyen la baciloscopía, el cultivo, la histopatología, y pruebas con herramientas moleculares. Se pueden realizar

ante y postmortem, depende de la muestra que se emplee para realizar el diagnóstico, las cuales generalmente son secreciones (exudado nasal y leche) (García-Casanova, 2013).

La baciloscopía consiste en evidenciar la presencia del bacilo a partir de frotis de muestras clínicas o preparados de tejidos y su observación al microscopio. Las micobacterias tienen un alto contenido de lípidos en su pared, característica que facilitan la captura de fucsina fenicada o auramina en su pared, por lo cual se les denomina bacilos ácido-alcohol resistentes. La tinción Ziehl-Neelsen ocasiona que se observen bastoncitos de color rosado o rojo, mientras que la auramina los hace fluorescer, lo que facilita su identificación al microscopio (Barrera, 2008).

El cultivo de la micobacteria involucra la homogenización de la muestra, descontaminación con detergentes ácido o álcalis, neutralización del homogenizado, centrifugación de éste y el sembrado del sedimento en medios Lowenstein-Jensen (*M. tuberculosis*) y Stonebrink (*M. bovis*), o Middlebrook o en agar sangre. El cultivo se incuba por lo menos 8 semanas a 37°C y se revisa periódicamente; cuando se observa crecimiento se realiza un frotis y se tiñe para confirmar que sea un bacilo ácido-alcohol resistente (Parra et al., 2008).

El estudio histopatológico permite la identificación de estructuras celulares específicas y determinantes en el desarrollo de la tuberculosis bovina, tales como los descritos previamente en la patología de la enfermedad.

Además existen otros métodos indirectos que emplean evidencias de la presencia de los bacilos a través de la estimulación específica de la respuesta inmune. Entre estos se pueden mencionar la prueba de ELISA, inmunotransferencia (MAPIA), captura de anticuerpos específicos, aglutinación con perlas de látex, y la fluorescencia polarizada (García-Casanova, 2013).

2.5.2.4. Métodos moleculares

Este tipo de diagnóstico es extremadamente sensible y específico, aunque de mucho mayor costo. Son útiles no solo para determinar la presencia del género *Mycobacterium* en el animal, también son más discriminatorios puesto que identifican la especie involucrada, lo cual puede ser útil en la diferenciación de casos vacunados de infecciones reales.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es una de las técnicas de diagnóstico más importantes en la tuberculosis bovina, ya que se puede detectar rápidamente la infección en el animal sospechoso. Además juega un papel importante en la caracterización de cepas. La técnica se basa en la amplificación in vitro del ADN de *M. bovis*. Diferentes métodos de PCR se han propuesto para una rápida detección de cantidades mínimas de ADN, entre las cuales existen la PCR dot blotting, PCR anidado, PCR múltiple y PCR tiempo real (Veerman et al., 1990; Thacker et al., 2011; Shah et al., 2002;. Se puede realizar a partir de muestras como cultivo, nódulos linfáticos, sangre, leche y tejido parafinado o formalinado. Las secuencias blanco son varias: IS6110, IS1081, gen que codifica para el antígeno proteico b, últimos 99 codones del gen *murA*, la región promotora del operón ARNr, secuencias polimórficas largas de DR, operón *mce3*, genes *oxyR*, *gyrA*, *hsp65*, *rpoB* y una secuencia ribosomal usada para identificar la especie (Liébana et al., 1995).

Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el ADN que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre micobacterias. Estas secuencias de restricción presentan usualmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el ADN de diferentes micobacterias de una población. Los RFLP son marcadores génicos del ADN y se pueden encontrar

en regiones que codifican proteínas o exones, en los intrones o en el ADN que separa un gen de otro. Lo único que se necesita para que puedan ser marcadores genéticos es que sean polimórficos y tengan más de un alelo. La técnica está basada en las variaciones generadas por el elemento de inserción IS6110 (transposición). La variación de las cepas está basada en el número de copias del IS6110 y en la posición donde se inserta en el ADN bacterial (Cousins et al., 1998).

Espoligotipificación. Explora la variación que existe en el locus DR del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (exclusiva de esta bacteria). El locus DR (Direct Repeat) es una región cromosómica que consiste de regiones repetidas de 36 nucleótidos muy conservados. Cada DR está separado por secuencias espaciadoras no repetitivas de 34 a 41pb. Las cepas varían en el número de DRs y en la presencia o ausencia de los espaciadores particulares. La técnica utiliza 43 diferentes espaciadores para identificar los diferentes genotipos del complejo MTB (Kamerbeek et al., 1997).

Variable Number Tandem Repeat (MIRU por sus siglas en inglés). Son secuencias repetitivas en tándem similares a minisatélites de eucariotas que han sido identificados dispersos en las regiones intergénicas del genoma del complejo MTB. Estos segmentos repetitivos o minisatélites contienen de 46-100 bp y difieren entre las cepas en su número de copias. Se ha demostrado que la tipificación por VNTR es muy útil para patógenos cuya población es altamente clonal como MTB. Las MIRU son VNTR localizadas en el genoma de *Mycobacterium bovis*, se han encontrado 41 posiciones (41 loci) de los cuales 15 son polimórficos en el número de repeticiones de una cepa a otra (Supply et al., 2006).

Secuenciación genómica (WGS) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). La secuenciación del ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de

los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de ADN. Determinar la secuencia de ADN es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales. Además, se puede utilizar la secuenciación del ADN para conocer las mutaciones somáticas, como las sustituciones de bases, generadas entre distintos organismos. A pesar de las distintas técnicas que permiten secuenciar el ADN, no siempre se puede llegar a conocer el genoma completo de los organismos, lo que puede llevar a errores en la reconstrucción de los linajes y en la estimación del tipo de mutaciones y del número de mitosis generadas (Stucki y Gagneux, 2013).

En 2003, Garnier y colaboradores, lograron secuenciar el genoma de *Mycobacterium bovis*, lo cual dio lugar al análisis de genético del microorganismo para conocer sus características fenotípicas. La cepa caracterizada se denomina AF2122/97, altamente virulenta, originaria de Inglaterra, y es ahora el genoma de referencia contra el cual se comparan las demás cepas de *M. bovis* secuenciadas. Dentro de los análisis genómicos disponibles, el más utilizado para fines epidemiológicos es la comparación de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP) entre aislados (Robbe-Austerman, 2014).

Los SNPs representan diferencias de un solo nucleótido entre dos o más secuencias. El término "SNP" frecuentemente es intercambiado por "mutación", "polimorfismo", o "sustitución". En términos estrictos, un cambio en una sola base es denominado mutación de punto, y esto sucede por medio de errores durante la replicación del ADN o como consecuencia de daño al ADN. Cualquier mutación puede incrementarse en frecuencia debido a un desvío genético aleatorio. Cuando un alelo alcanza cierto grado de frecuencia entre la población, se le refiere como polimorfismo. El umbral para definir una nueva variante como un "polimorfismo" en vez de "mutación" es arbitrario, y normalmente se establece en al menos el 1% de la población (Stucki y Gagneux, 2013).

Según su posición en el genoma, los SNPs pueden ser codificantes o no codificantes; la mayoría (90-96%) de los SNPs del complejo MTB se encuentran en regiones codificantes. Los SNPs codificantes incluso se pueden dividir en sinónimos o no sinónimos, esto si dan lugar a cambios en la secuencia de amino ácidos correspondientes. Ya que los SNPs no sinónimos suelen tener un mayor efecto sobre el estado biológico del organismo (ya sea de manera benéfica o maligna), se mantienen bajo una mayor presión de selección, a lo contrario de los SNPs sinónimos que no ocasionan cambios en el organismo (Stucki y Gagneux, 2013).

De cualquier forma, los SNPs son eventos de rara ocurrencia dentro del complejo MTB, ya que suceden aproximadamente cada 3 kb en una secuencia de ADN. Esta baja frecuencia y la limitada transferencia horizontal de genes dentro del complejo MTB resultan en disminuidos niveles de homoplasia (e.g. la ocurrencia independiente del mismo SNP en aislados que no están relacionados filogenéticamente). De esta manera, los SNPs representan marcadores para inferir filogenias y para la clasificación de cepas. Además, los SNPs tienen utilidad en la medición de distancias evolutivas entre aislados, por ejemplo, para estimar el tiempo de divergencia de un aislado de su antecesor genético. Así, mientras más aislados contengan un SNP en particular, más antiguo se considera dicho SNP (Stucki y Gagneux, 2013).

El primer paso en la generación de bases de datos de SNPs se refiere como el descubrimiento de SNPs, e involucra la secuenciación comparativa de múltiples genes o genomas completos de dos o más aislados o cepas de interés. Una vez que un grupo de SNPs es identificado, estos pueden ser utilizados posteriormente para analizar aislados adicionales al usar alguna de las varias plataformas de tipificación de SNPs. Es muy importante realizar la identificación de SNPs de manera meticulosa puesto que una representación

inadecuada puede ocasionar inferencias filogenéticas erróneas (Stucki y Gagneux, 2013).

La discriminación de cepas patógenas es crucial; desde el punto de vista epidemiológico, la tipificación molecular contribuye al conocimiento de la virulencia, transmisibilidad, etc. Ayuda en la identificación de relaciones no sospechosas entre casos, nuevos casos y casos inusuales de transmisión de la enfermedad. También es útil en la evaluación de la transmisión de genotipos entre animales con o sin nexo epidemiológico (Robbe-Austerman, 2014).

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de *M. bovis* en la epidemiología de la tuberculosis humana, a través del análisis molecular de aislados de ambas especies con el uso del método de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) para su genotipificación.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las infecciones por *M. bovis* y/o *M. tuberculosis* en pacientes sospechosos a la enfermedad.
2. Identificación de los aislados obtenidos a partir de pacientes del IMSS, mediante secuenciación
3. Determinar la distribución de los SNPs de los aislados de *M. bovis* obtenidos.

IV. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, cuyas instalaciones están ubicadas en Av. de las Ciencias s/n, Juriquilla, Delegación Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, Querétaro. La duración del estudio fue de un año (octubre del 2013 a septiembre del 2014).

4.1 Origen de las muestras

Diariamente, se obtuvieron muestras de pacientes sospechosos a tuberculosis del IMSS, ubicado en Av. 5 de Febrero esq. Av. Zaragoza s/n, Centro, Querétaro, Querétaro. Los criterios de inclusión fueron: síntomas respiratorios de más de 2 a 3 semanas de duración consistentes en tos, expectoración, en ocasiones hemoptoica, dolor torácico y sintomatología general (febrícula o fiebre, sudoración, astenia, anorexia y pérdida de peso), así como infección por VIH y niños con evidencia de meningitis.

La toma de muestras se realizó por y bajo las instrucciones de personal capacitado del IMSS en sus instalaciones utilizando vasos estériles con sellado hermético. Las muestras se trasladaron dentro de una hielera con refrigerantes y se analizaron inmediatamente al llegar al laboratorio. Se registró información referente al género y edad de cada paciente. Los tipos de muestras incluidas en el estudio fueron esputo, orina, líquido cefalorraquídeo, jugo gástrico, y líquido pleural.

En total, se recolectaron 2,736 muestras de 1,154 pacientes. La edad de los pacientes fue desde 0 hasta 90 años, de ambos hombres y mujeres.

4.2 Prueba de BAAR

Las muestras se trasladaron al laboratorio donde se prepararon para su análisis mediante baciloscopía con la prueba de BAAR, mediante la tinción de Ziehl-Neelsen (Secretaría de Salud, 2003), para obtener el diagnóstico de cada paciente y reportarlo al IMSS.

4.3 Cultivo

Cada serie de muestras de cada paciente se mezcló para conseguir una sola muestra y esta procesarla para el cultivo. El cultivo se llevó a cabo mediante el método de Petroff modificado (Organización Panamericana de la Salud, 2008), en medios de cultivo Lowenstein-Jensen con glicerol (que favorece el crecimiento de *M. tuberculosis*) y Stonebrink adicionado con piruvato de sodio como fuente de carbono (especializado para *M. bovis*). Los cultivos se mantuvieron en horno de incubación a 37°C durante un periodo de 3 a 6 semanas. La revisión de los cultivos se llevó a cabo semanalmente. Finalmente, las colonias que crecieron en los cultivos fueron analizadas mediante la tinción de Ziehl-Neelsen para confirmar la presencia de *Mycobacterium* spp.

4.4 Extracción de ADN de las colonias del cultivo

La extracción de ADN se realizó mediante la técnica CTAB, la cual incluye lisozima-proteinasa K y fenol-cloroformo para la obtención y purificación del ADN (Rodríguez-Hernández et al., 2014). Las purezas obtenidas estuvieron en un rango de 1.6 a 1.9, y concentraciones promedio de 200 ng/μl. Se consiguieron 21 aislados en total.

4.5 PCR

Se llevó a cabo PCR tiempo real para la identificación de *M. bovis* de los aislados obtenidos. Los oligos utilizados fueron diseñados por el Laboratorio

de *Mycobacterium* y *Brucella*, de los Laboratorios de Servicios Veterinarios, de la Secretaría de Agricultura de los EE. UU., específicamente para la detección de *M. bovis*. La PCR tiempo real se llevó a cabo con oligos diseñados específicamente para la detección de *M. bovis*; Locus3_F (5'-ATCAGCAGCGATGTGAGCAT-3'), Locus3_R (5'-GACGGCTACCGGCAAGAC-3') y la sonda Locus3_Pnew (5'-CGGATGATTGCCAGCGGTTTGC-3'), en un volumen final de reacción de 20 µl (utilizando 5 µl de ADN). Se utilizó un equipo ViiA7, con condiciones de ciclado una primera etapa de 1 ciclo a 50°C por 2 minutos, una segunda etapa de 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, y una tercera etapa de 40 ciclos a 95°C por 15 y 60°C por 60 segundos. El reportero fluorescente utilizado fue FAM. El método de PCR y los oligos fueron diseñados por el Laboratorio de *Mycobacterium* y *Brucella* perteneciente a los Laboratorios de Servicios Veterinarios, de la Secretaría de Agricultura de los EE. UU., en Iowa, donde se llevó a cabo esta parte del estudio, así como la secuenciación. Se tomaron como positivos aquellos con valores de Ct entre 25 y 38. Dos de los aislados resultaron positivos a *M. bovis*.

4.6 Secuenciación de los aislados de *M. bovis*

Se realizó la secuenciación del genoma completo de los aislados de *M. bovis* obtenidos. Esta se llevó a cabo con el equipo MiSeq de Illumina, el cual se basa en la tecnología de secuenciación mediante síntesis, con el uso del kit Nextera XT y el protocolo de Nextera (Illumina, 2012).

La información obtenida a partir de la secuenciación fue procesada y analizada a través de software especializado del NVSL-USDA (Todd Stuber Pipeline) para determinar y localizar los SNP dentro de las secuencias obtenidas de cada aislado. Las secuencias fueron comparadas con el genoma de referencia *M. bovis* AF2122/97 (Garnier et al., 2003) mediante el programa "Integrated Genomic Viewer" del Broad Institute (Robinson et al., 2011).

V. RESULTADOS

Se analizaron un total de 2,736 muestras de pacientes sospechosos a tuberculosis que acudieron al IMSS de la Ciudad de Querétaro, entre los meses de octubre de 2013 a julio de 2014; de estas muestras, 2,265 (83%) fueron esputo, 434 (16%) orina y 37 (1%) correspondió a otro tipo de muestras, tales como jugo gástrico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, y líquido ascítico, entre otras (Figura 1). Las muestras de esputo también fueron evaluadas conforme a la consistencia de la muestra, por lo que se dividieron en saliva y flema, 329 (14.5%) y 1936 (85.5%), respectivamente (Figura 2).

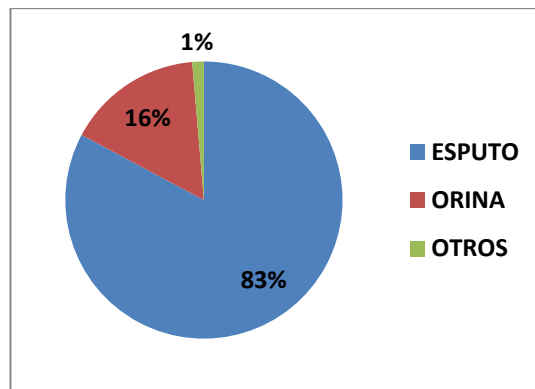


Figura 1. Tipo de muestras remitidas al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014 de pacientes sospechosos a tuberculosis para baciloscopía

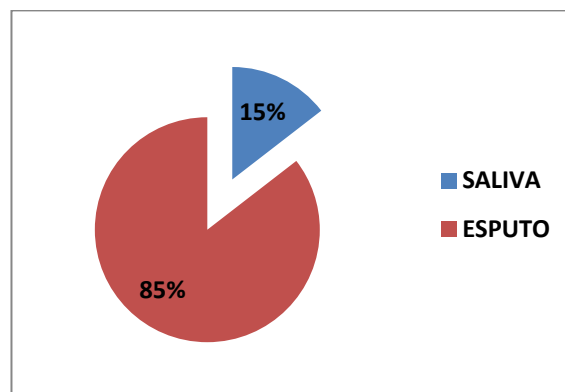


Figura 2. Muestras de esputo de pacientes con sospecha de tuberculosis remitidas al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014, de acuerdo a su consistencia

El total de las muestras correspondió a 1,154 pacientes sospechosos a tuberculosis. La información del origen de la muestra fue limitada, la escasa información que se pudo obtener acerca de los pacientes, incluyó género, edad y origen de los casos; es decir, si el paciente se encontraba hospitalizado (urgencias) o provenía de consulta externa (Unidad Médica Familiar). En su mayoría, los casos provinieron de consulta externa (55%), el 22% correspondió a casos hospitalizados, y de un 23% no fue posible obtener datos. Las figuras 3, 4 y 5 muestran estas proporciones, respectivamente.

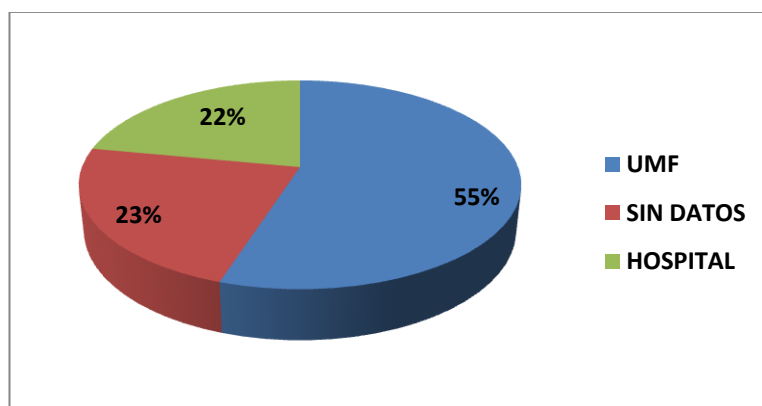


Figura 3. Origen de los casos sospechosos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014

En cuanto a género, 46% fueron mujeres, 43% hombres y del 11% restante no se pudieron obtener datos de género (Figura 4). En referencia a la edad, la población se dividió en tres grupos etarios principales, de 0 a 30 años, de 31 a 60 años, y de más de 60 años de edad. Los porcentajes fueron 50%, 23% y 27% respectivamente (Figura 5).

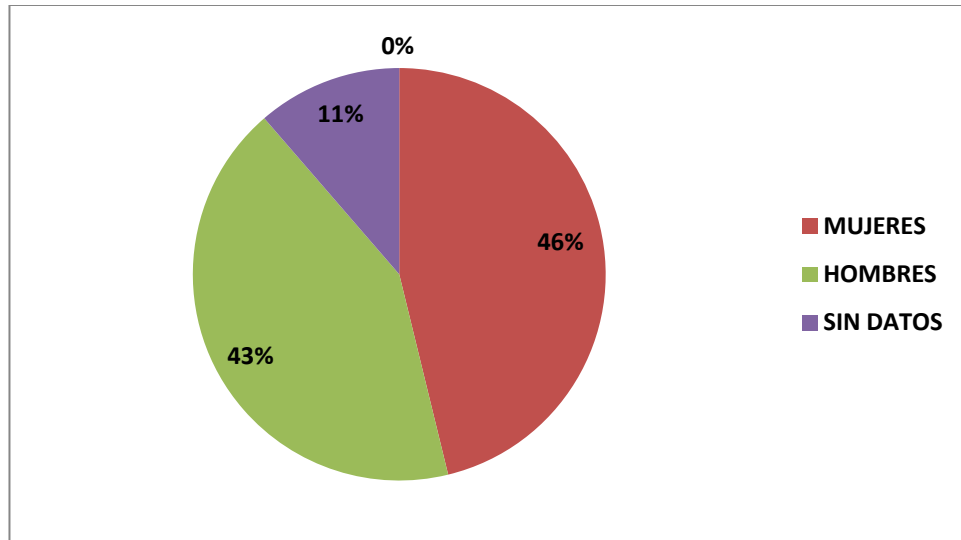


Figura 4. Género de los pacientes sospechosos a tuberculosis que remitieron muestras al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014

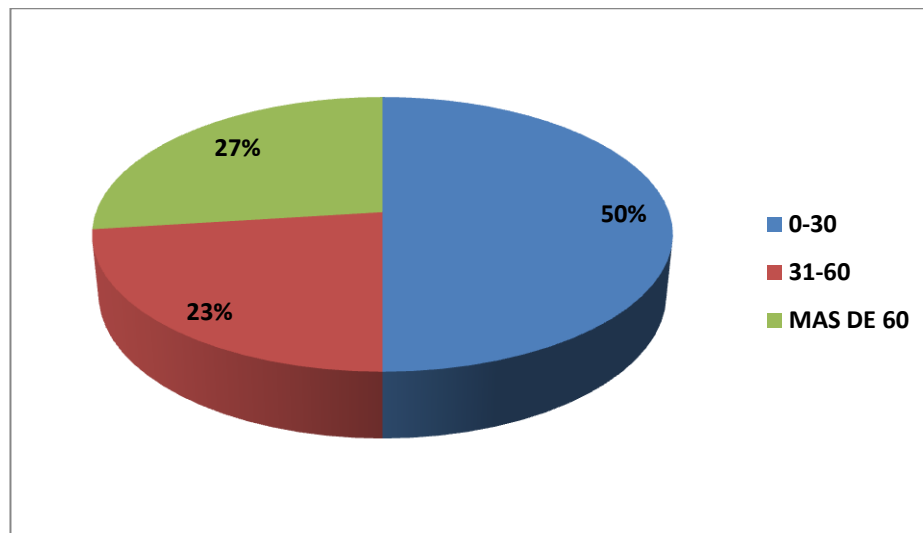


Figura 5. Grupo etario de los pacientes sospechosos a tuberculosis que remitieron muestras al IMSS de la Ciudad de Querétaro de octubre del 2013 a julio del 2014

Durante el estudio se analizaron en promedio 2.4 muestras por paciente, ya que la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013 Para la Prevención y Control de la Tuberculosis exige que se recolecten un mínimo de 3 muestras por paciente. En total, se obtuvieron 21 pacientes positivos a tuberculosis, lo cual representa una prevalencia del 1.8% en la población de

estudio (Figura 6). Todas las muestras de pacientes que resultaron positivas a tuberculosis provinieron de esputo (Figura 7). De estos, 17 fueron confirmados mediante baciloscopía, y los 4 restantes, aunque negativos a la baciloscopía, fueron positivos al cultivo. Esto quiere decir que la prueba de BAAR tuvo una sensibilidad de sólo el 80% (Cuadro 1).

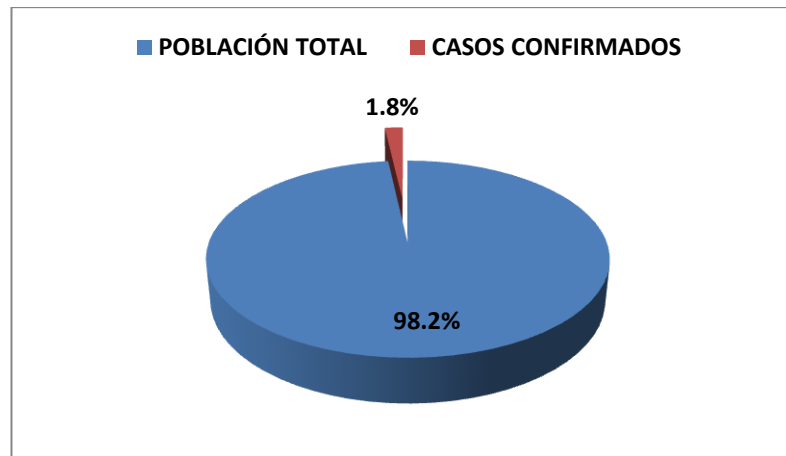


Figura 6. Prevalencia de tuberculosis en los pacientes sospechosos a la enfermedad que se examinaron en el IMSS de la Ciudad de Querétaro entre los meses de octubre de 2013 a julio de 2014

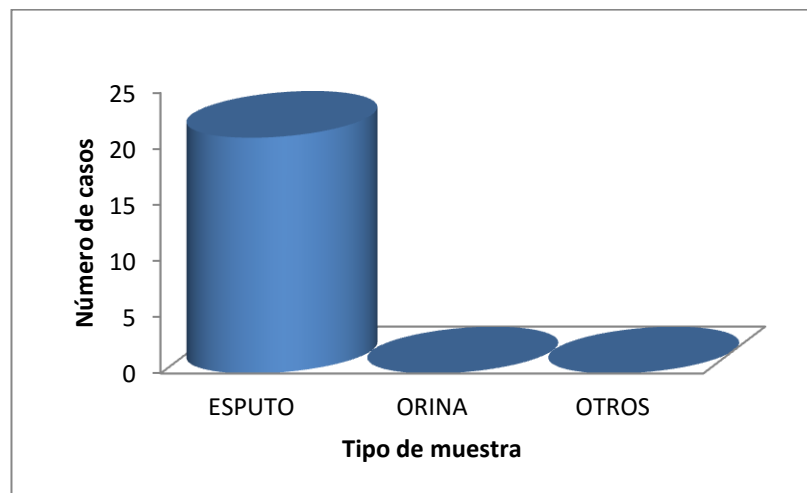


Figura 7. Número de casos positivos a tuberculosis por tipo de muestra, obtenidos de pacientes sospechosos a la enfermedad entre los meses de octubre 2013 a julio 2014 del IMSS de la Ciudad de Querétaro.

		CULTIVO		
		POSITIVO	NEGATIVO	
BAA R	POSITIVO	16	1	17
	NEGATIVO	4	0	4
		20	1	21
		SENSIBILIDAD		80%

Cuadro 1. Tabla de contingencia para determinar la sensibilidad de la prueba de BAAR contra el cultivo.

En cuanto al género de los pacientes positivos, 6 (29%) fueron mujeres y 7 hombres (33%), no se pudo obtener datos de los 8 (38%) restantes (Figura 9). Al observar la edad de pacientes, se determinó que 5 (24%) tenían entre 31 a 60 años, y 4 (19%) fueron mayores de 60 años de edad, del restante no fue posible obtener datos (Figura 10).

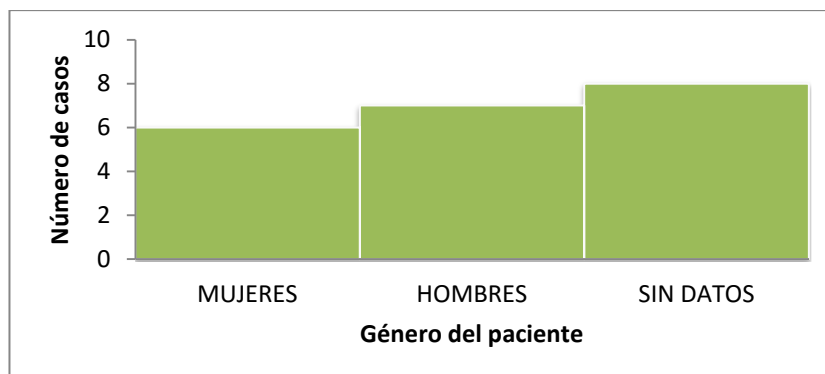


Figura 8. Género de los pacientes positivos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre 2013 a julio 2014

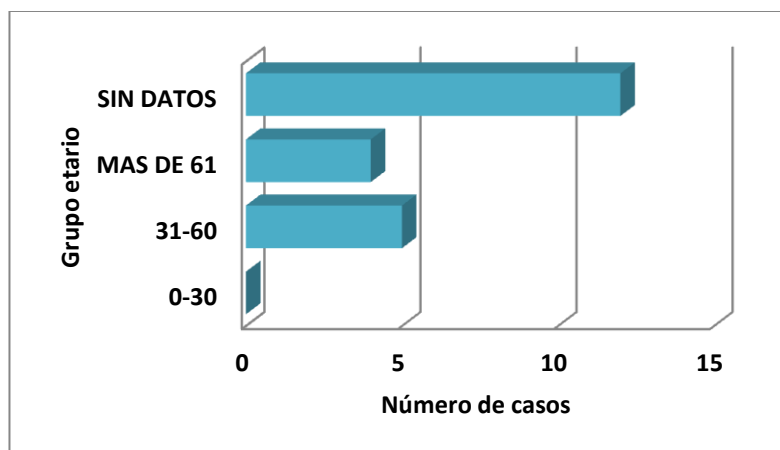


Figura 9. Pacientes positivos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre de 2013 a julio de 2014 por grupo etario

Los casos positivos correspondieron principalmente a pacientes hospitalizados, con una proporción de 57%, mientras que los casos de consulta externa tuvieron una proporción de 29%, y del 14% no se obtuvo esta información (Figura 11).

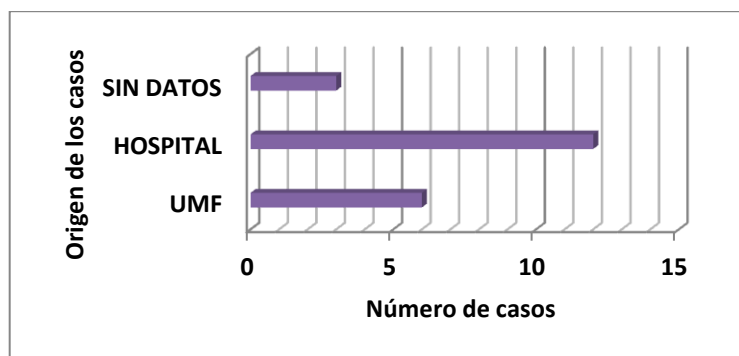


Figura 10. Origen de los casos positivos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre de 2013 a julio de 2014

De los aislados obtenidos (21), se secuenciaron 2 (9%), ya que solamente se identificaron estos como *M. bovis*. Los aislados de *M. tuberculosis* (18) correspondieron al 85%, lo que significa que del total de pacientes positivos el 9.5% se encontraban infectados por *M. bovis* (Figura 12). El genoma de uno de los aislados con referencia 13-1206497FM, tuvo una

cobertura de identidad del mostró características genómicas posiblemente de la especie *M. terrae*, la cual no pertenece al complejo MTBC.

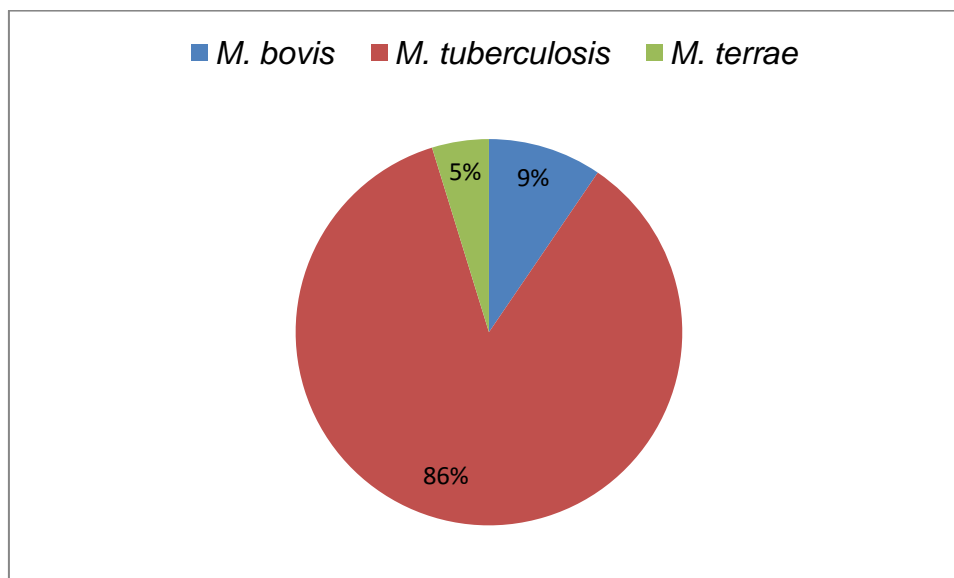


Figura 11. Especies de *Mycobacterium* spp. provenientes de pacientes sospechosos a tuberculosis presentados al IMSS de la Ciudad de Querétaro durante los meses de octubre de 2013 a julio de 2014

Los aislados de *M. bovis* obtenidos se compararon con aislados provenientes de bovinos de México, proporcionados por el Dr. Milián, de la Universidad Autónoma de Querétaro, Laboratorio de Microbiología, y se analizaron los SNPs encontrados. Se elaboraron cuadros donde se alinean estos SNPs para demostrar la relación genética que existe entre los aislados provenientes de los pacientes positivos y los aislados provenientes de bovinos de la región. De igual manera se pudieron comparar con aislados de bovinos de EE. UU., gracias a la colaboración del Laboratorio de *Mycobacterium* y *Brucella*, de los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios de APHIS de la Secretaría de Agricultura de los Estados Unidos (NVSL-USDA).

El aislado con identificación 13-1212317FM, proveniente de uno de los pacientes positivos a tuberculosis, demostró tener una relación genética muy estrecha con aislados de bovino de Aguascalientes. Por otra parte, el segundo

aislado de origen humano (14-805568FM), demostró estar relacionado genéticamente con aislados de bovinos del estado de Texas, de EE. UU. (Anexo 1).

VI. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta investigación consistió en obtener la proporción de casos de tuberculosis en humanos ocasionada por *Mycobacterium bovis*, en pacientes sospechosos a la enfermedad. Adicionalmente, se obtuvieron resultados acerca de la prevalencia y los polimorfismos de (SNP) de *M. bovis* que demuestran similitud con aislados de ganado bovino, lo que sugiere la transmisión del bovino al humano.

A pesar de los continuos reportes sobre la tuberculosis zoonótica, la relevancia global de *M. bovis* como agente causal de la tuberculosis humana mínima comparada con la de *M. tuberculosis*. Es difícil estimar la frecuencia de infecciones de tuberculosis humana ocasionada por *M. bovis* puesto que es indistinguible clínica-, radiológica-, e histopatológicamente de la ocasionada por *M. tuberculosis*. Por lo tanto, la única manera de determinar el papel que cada patógeno sobre la presentación de la enfermedad es mediante la identificación y diferenciación de especies a través del diagnóstico molecular.

En cuanto a la situación global de la tuberculosis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) calculó que en el 2013 contrajeron la enfermedad 9 millones de personas y que 1.5 millones fallecieron por esta causa. Dentro de este mismo reporte, México reportó una tasa de 26 casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes, la cual es ligeramente mayor que la obtenida en este estudio donde se encontró una tasa de 18 por cada 100,000. Otros estudios a nivel nacional han reportado tasas de tuberculosis en humanos de 14.5 (Mercado et al., 1992), 51.7 (García-García et al., 1995), 151 (Sánchez-Pérez et al., 2002), y 5.4 por cada 100,000 habitantes (Higareda de Sales et al., 2015). Los datos obtenidos de estos estudios varían significativamente ya que fueron realizados en distintas regiones del país, aunque Sánchez-Pérez representa una zona principalmente rural. De igual manera, a nivel mundial la prevalencia de la enfermedad es mayor en zonas rurales debido a los escasos

recursos disponibles para su diagnóstico, tratamiento, y vigilancia epidemiológica (WHO, 2008).

Dentro de los resultados obtenidos, también se puede observar que las proporciones entre hombres y mujeres fueron de 33% y 29%, respectivamente. La OMS reporta en México, de igual manera, al género masculino con la mayor proporción de casos de tuberculosis con una relación hombre-mujer del 1.6. De manera contraria, existen investigaciones donde se le atribuyó a las mujeres con el mayor número de casos de enfermedad (Majoor et al., 2011; Higareda de Sales et al., 2015). Sin embargo, no se ha reportado diferencia significativa en cuanto a la presentación de la enfermedad entre géneros (Montero-Mendoza et al., 2001). Para esto tal vez sea necesario realizar estudios que profundicen acerca de la respuesta fisiológica por parte de cada género para saber si existe susceptibilidad alguna en el organismo de cada uno, o si los hábitos y actividades de cada género pueden ser un factor de riesgo.

Con referencia a la edad de los pacientes con tuberculosis, en este estudio se encontró que el grupo más afectado se encuentra por arriba de los 31 años de edad. Incluso algunos autores mencionan que a partir de los 15 años de edad hay una mayor presentación de la enfermedad (Higareda de Sales et al., 2014; OMS, 2014; SINAVE, 2012), esto lo atribuyen a varios factores, tanto que el individuo después de los 15 años ya se encuentre en edad productiva puesto que ya puede tener empleo, y como se ha mencionado antes, la tuberculosis puede ser un riesgo de profesión, como trabajadores de rastros y establos, principalmente. Aquí cabe recalcar que en este trabajo se incluyeron muestras de esputo, por lo cual los resultados reflejan la presentación pulmonar de la enfermedad. Dicho esto, es razonable inferir que las personas adultas son más susceptibles a contraer este tipo de infección debido al mayor contacto que pueden tener con personas y/o animales

infectados, así como a factores de riesgo asociados tales como el tabaquismo, alcoholismo, diabetes, SIDA, drogadicción, etc.

En el Reporte Mundial sobre la Tuberculosis 2014, la OMS menciona que *M. bovis* es responsable por el 3.1% de todos los casos de tuberculosis en humanos a nivel mundial, pero esto puede estar considerablemente subestimado. Los casos reportados son principalmente de zonas urbanas o países industrializados, mientras que los países en vías de desarrollo escasamente o de manera esporádica tienen acceso a recursos para realizar los análisis de diferenciación del agente causal debido a su alto costo. Por lo mismo, en los países donde aún prevalece la tuberculosis, el diagnóstico se basa en métodos económicos como la prueba de BAAR, la cual solamente determina la presencia de las micobacterias y no diferencia entre *M. tuberculosis* o *M. bovis*.

Investigaciones realizadas en los últimos años han logrado demostrar resultados de tuberculosis humana causada por *M. bovis* del 4.5% (Laniado-Laborín et al., 2014), 6% (Milián et al., 2010), 13.8% (Pérez-Guerrero et al., 2008), 28% (Portillo-Gómez y Sosa-Iglesias, 2011) y 31.6% (Toledo-Ordoñez et al., 1999) en México, 6.9% en Uganda (Oloya et al., 2008), 5% en Nigeria (Cadmus et al., 2006), 0.5% en Taiwan (Jou et al., 2008) y entre el 0 y 2.5% en 10 países de América Latina (de Kantor et al., 2008). En el presente trabajo se obtuvo una proporción del 9.5%, la cual es similar a los resultados mencionados previamente para México, en cuanto a tuberculosis pulmonar. Sin embargo, es importante mencionar que el tamaño de la población de estudio en este estudio fue mucho mayor que los mencionados anteriormente.

La detección de casos es de vital importancia para el control y prevención de la tuberculosis. En la actualidad existen varios métodos de diagnóstico, algunos de mayor sensibilidad que otros, aunque de mayor costo. El método más común a nivel mundial, y especialmente en países en vías de desarrollo,

donde cabe mencionar que la enfermedad tiene prevalencias más elevadas, es la baciloscopía. Aunque es el método de menor costo, no siempre es cien por ciento confiable, ya que se pueden dar falsos positivos, o lo que puede ser peor, la detección de falsos negativos (Lipsky et al., 1984). En este estudio, la baciloscopía tuvo una sensibilidad del 80% y una especificidad del 99.9%. Es muy importante para esta enfermedad en específico la detección de los casos que son verdaderamente positivos, ya que si algún paciente es dado de alta como "falso negativo", éste puede diseminar la enfermedad, además de que no recibirá el tratamiento adecuado lo cual puede ocasionar su muerte. Los valores obtenidos aquí son bastante aceptables, pero existen reportes donde la sensibilidad tuvo una variación desde un 38-80% (Toledo-Ordoñez et al., 1999; Swai et al., 2011; Llaca-Díaz et al., 2003; Betancourt et al., 2002). Por este motivo, es muy importante reiterar que un punto crítico en el control de la tuberculosis radica en la detección de casos. Es muy lamentable que aunque la tuberculosis sea una enfermedad perfectamente tratable, aún exista una tan elevada tasa de mortalidad debido a ella (OMS, 2014).

Del mismo modo, así como un falso negativo puede resultar catastrófico, una baciloscopía positiva no siempre indica tuberculosis. Aquí radica la importancia de solicitar cultivos de manera rutinaria por parte de los médicos que sospechan de la enfermedad. La detección de bacilos alcohol-ácido resistentes en un frotis teñido constituye la primera evidencia bacteriológica de la presencia de micobacterias en caso de sospecha de tuberculosis. Sin embargo, este hecho no debe ser considerado como sinónimo de tuberculosis ya que puede indicar, además de la presencia de *M. tuberculosis* o *M. bovis*, la de micobacterias no tuberculosas e incluso la de otros gérmenes con propiedades tintoriales de ácido-resistencia, como la *Nocardia* spp (Laniado-Laborín y Cabrales-Vargas, 2005). El cultivo proporciona además, un método para la diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Otro punto crítico en el tratamiento y control de la enfermedad, pues *M. bovis* es naturalmente resistente al antibiótico pirazinamida, el cual es utilizado como medicamento

de primera línea para los casos de tuberculosis. En consecuencia, el paciente no podrá mejorar, en consecuencia, el paciente no tendrá una mejora, incluso en casos severos o asociación con enfermedad que ocasionen una inmunosupresión, ser una causante de muerte. El tratamiento es de larga duración, desde los 3 meses hasta un año, por lo que es gran importancia dar el tratamiento indicado desde el inicio. Si de primera instancia no se medica con los antibióticos que atacaran de manera efectiva al patógeno, el tratamiento se prolongará y el paciente, al no ver mejoría, puede entrar en depresión, desesperación y abandonarlo. Debido a la estrecha relación que se tuvo con el IMSS durante esta investigación, se pudo observar claramente que cuando se obtiene un resultado positivo a la baciloscopía, no se realizan análisis posteriores para la identificación del agente causal, lo cual, como ya se mencionó, es muy grave.

El uso de la baciloscopía como el único método para el diagnóstico de casos sospechosos a tuberculosis, aunque es un requerimiento esencial para cualquier programa de control contra esta enfermedad, es el motivo por el cual podría existir un bajo grado de notificación de casos causados por *M. bovis*. El diagnóstico por cultivo y la identificación de especie no se llevan a cabo, y aún cuando sí se realiza el cultivo, *M. bovis* no crece adecuadamente en medios Lowenstein-Jensen, el cual es el de mayor uso para el cultivo de muestras sospechosas a TB. Por esta razón y para evitar cuestionamientos por parte de agencias sanitarias, la enfermedad en el humano se notifica simplemente como TB. Así, los casos por *M. bovis* podrían pasar desapercibidos y la problemática de la TB por *M. bovis* en el humano persistir.

La proporción de casos de tuberculosis humana ocasionada por *M. bovis* obtenida en este trabajo fue de casi 1 de cada 10 casos positivos a TB. Este es un dato verdaderamente alarmante si se considera que los reportes nacionales (SINAVE, 2012) mencionan que la incidencia de la enfermedad ha disminuido anualmente. En general, se desconoce con exactitud la verdadera

frecuencia de *M. bovis* involucrado en las infecciones de tuberculosis humana, pero este estudio da resultados contundentes en cuanto a la importancia de la zoonosis. Existe la necesidad de comprender la dinámica de las poblaciones del complejo *M. tuberculosis* causantes de tuberculosis en humanos mediante métodos que involucran el análisis de genomas completos, en vez de sólo enfocarse a ciertos genes o proteínas. Así, la genómica comparativa ha ayudado a obtener un mayor entendimiento sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas dentro del MTBC (Mostowy y Behr, 2005). Por lo mismo, ha sido necesario analizar con detalle los genomas de estos microorganismos, con lo que se obtiene los SNP. El análisis de estos polimorfismos en dos o más microorganismos incluso puede proporcionar temporalidad respecto a la evolución de los mismos. Esto quiere decir que los SNPs pueden dar, de cierta manera, un camino cronológico de la transmisión de la micobacteria a través de los hospederos.

Además de las cifras ya mencionadas en cuanto a frecuencia y tipificación de los casos, los análisis moleculares y filogenéticos lograron establecer una posible vía de transmisión directa del bovino al humano. Con el estudio de los SNPs obtenidos a partir de las secuencias genómicas de los aislados de *M. bovis* de las muestras de esputo de los pacientes positivos a la enfermedad, para dos de los aislados fue posible encontrar relaciones estrechas a aislados de bovinos. El aislado 13-1212317FM demostró tener una similitud significativa con aislados de bovinos procedentes del estado de Aguascalientes, mientras que el aislado 14-805568FM tuvo relación con aislados de bovinos lecheros de Texas, EE. UU. Ambos aislados fueron obtenidos a partir de esputo, lo cual indica que la enfermedad del paciente fue de presentación pulmonar. A partir de esto es posible concluir que la transmisión fue directa de bovino a humano mediante la inhalación de aerosoles infectados con *M. bovis*, posiblemente expulsados por los bovinos. Estos dos casos de tuberculosis zoonótica correspondieron a hombres en edad productiva (entre 30-60 años de edad). Es fácil suponer que los trabajadores de ranchos o ganaderos corresponden en su

mayoría a este grupo de personas, por lo que podemos pensar que los pacientes pudieron dedicarse a este oficio. Lamentablemente fue muy escasa y limitada la información pertinente acerca de la historia clínica de los pacientes, por lo que no es posible confirmar el origen, hábitos, u ocupación de los mismos.

Al clasificar de manera filogenética los aislados de *M. bovis* provenientes de pacientes humanos, y de acuerdo a grupos establecidos por la Secretaría de Agricultura de los Estados Unidos de América (Robbe-Austerman, 2014), el aislado 13-1212317FM pertenece al Grupo 23, el cual consta principalmente de aislados de bovinos mexicanos de los estados de Aguascalientes, Sonora, Baja California, Chihuahua, Sonora, Coahuila, Tamaulipas, y algunos de EE.UU. como Texas y Nuevo México. Por otra parte, el aislado 14-805568FM correspondió al Grupo 17, subgrupo B-1, donde se encuentran aislados de bovinos mexicanos y de estados fronterizos de EE.UU. como Texas y Nuevo México. El estado de Querétaro, donde se realizó este estudio, colinda con el estado de México y Aguascalientes, y de manera frecuente es posible que reciba ganado de estos estados. Existen diversas posibilidades en cuanto al contagio de los pacientes por *M. bovis*, ya sea por el contacto directo con el animal infectado o por ingesta de un producto lácteo contaminado proveniente del animal y a que la enfermedad fue de presentación pulmonar, podemos sospechar que el contagio fue debido al contacto directo con aerosoles del animal infectado. Sin embargo, debido a la escasa información proporcionada por el IMSS acerca de los pacientes, como origen y ocupación principalmente, es imposible confirmar cualquiera de los casos.

Aunque es lógico pensar que la diversidad de los aislados de *M. bovis* se debe al movimiento de ganado por diferentes regiones, un estudio por Milián-Suazo et al., en el 2000, trata de explicarlo al mencionar que un análisis de desequilibrio puede indicar que debido a que la amplia diversidad de genotipos puede ser ocasionada por mutaciones, esto aunado a que la tuberculosis es

una enfermedad crónica, la proliferación de generaciones de micobacterias se puede dar en un mismo animal, lo que incrementa la probabilidad de que las mutaciones se acumulen en un solo hato. Pero para confirmar o descartar cualquiera de las dos posibilidades, son necesarios aún más estudios sobre la epidemiología molecular de la tuberculosis, tanto en humanos como en bovinos.

Poner un alto a la transmisión de *M. bovis* hacia el humano por parte del ganado conlleva una revisión de los programas de erradicación y control de la enfermedad en los bovinos. Como mínimo, deben existir leyes estrictas para la pasteurización de la leche dirigida al consumo humano. Debido a las consecuencias causadas por *M. bovis* tanto en la salud pública como en los animales, los programas de monitoreo de la enfermedad en humanos deberían ser considerados como prioridad, especialmente en áreas donde los factores de riesgo están presentes. La existencia de tuberculosis zoonótica en estas áreas da lugar a una colaboración más estrecha entre las profesiones de medicina humana y veterinarios para evaluar y valorar la escala del problema.

VII. CONCLUSIONES

Este es el primer reporte que se realiza en Querétaro sobre la frecuencia de infecciones de tuberculosis causadas por *M. bovis* en pacientes del IMSS. Esta investigación resalta varios puntos importantes referentes a la enfermedad zoonótica causada por *M. bovis*. En primera instancia establece la frecuencia de *M. bovis* en los casos de tuberculosis humana presentados en el IMSS de la Ciudad de Querétaro, la cual fue de casi 1 en 10 casos, lo cual es de impacto en la salud humana. A partir de este resultado es importante recalcar que el diagnóstico de la tuberculosis actualmente no incluye el cultivo y mucho menos la identificación de la especie infectante (*M. bovis* o *M. tuberculosis*), lo cual puede tener consecuencias bastante severas en la salud del paciente, así como en la salud pública en general.

El tratamiento contra la tuberculosis humana incluye medicamentos que pueden ser efectivos contra una especie del género *Mycobacterium* pero completamente ineficaces para otra. Tal es el caso de *M. bovis*, el cual es naturalmente resistente a la pirazinamida. Así que, administrar este medicamento a personas afectadas por *M. bovis* ocasiona un retraso en su recuperación, mientras que el paciente puede infectar a otros a su alrededor, y de manera más grave, la muerte del paciente por diseminación completa del agente infeccioso en su organismo.

La identificación de la especie de micobacteria causal es un punto completamente necesario en el diagnóstico de la enfermedad; los recursos en la actualidad tal vez no son suficientes para realizarlo a cada uno de los pacientes positivos a tuberculosis, pero sí se puede llevar a cabo una breve investigación epidemiológica que ponga cuidadosa atención sobre factores de riesgo asociados a estar infectado con *M. bovis*, como podrían ser la ocupación, hábitos alimenticios, y lugar de residencia u origen, entre otros, y a estos pacientes sí realizar procedimientos de diferenciación de especie.

Por último, los estudios acerca de la epidemiología molecular de la tuberculosis humana y bovina permiten conocer los focos de infección y las regiones donde se necesita poner más atención y medidas más rigurosas para su control y eliminación. Por lo tanto, es importante continuar con este tipo de investigaciones y obtener información concreta acerca del microorganismo y su comportamiento a través de los diferentes hospederos que afecta.

LITERATURA CITADA

- Alonso, V., Paul, R., Barrera, L., Ritacco, V. 2007. Falso diagnóstico de tuberculosis por cultivo. *Medicina*. 67(3): 287-294. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802007000300013&lng=es&nrm=iso. Accedido en 12 oct. 2015.
- Amanfu, W. 2006. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberc*. 86: 330-335.
- Aranaz, A., Liébana, E., Pickering, P., Novoa, C., Mateos, A., Domínguez, L. 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) procedures in the diagnosis of tuberculosis in cats and dogs. *Vet. Rec*. 138: 276-280.
- Arentz, M., Hawn, T.R. 2007. Tuberculosis infection. Insight from immunogenomics. *Drug Discov. Today*. 4: 231–236.
- Bakshi, C.S., Shah, D.H., Verma, R., Singh, R.K., Malik, M. 2005. Rapid differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Vet. Microbiol*. 109: 211-216.
- Baldwin, J.H. 1968. Pulmonary bovine tuberculosis in an owner and in his dairy herd. *Cornell Veterinarian*. 58: 81-87.
- Barouni, A.S., Augusto, C.J., Lopes, M.T.P., Zanini, M.S., Salas, C.E. 2004. A *pncA* polymorphism to differentiate between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell. Probes*. 18: 167-170.
- Barrera, C. 2008. Parte II Cultivo. En: Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Ed. Organización Panamericana de la Salud, México, D.F., pp.7-107.
- Barrera, L., de Kantor, I.N. 1987. Nontuberculous mycobacteria and *Mycobacterium bovis* as a cause of human disease in Argentina. *Trop. Geogr. Med*. 39: 222-227.
- Bermejo, A., Veeken, H., Berra, A. 1992. Tuberculosis incidence in developing countries with high prevalence of HIV infection. *AIDS* 6: 1203-1206.

- Bernabé, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchén, V. 1991. Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Rum. Res.* 5(4): 377-390.
- Betancourt, J., Ruíz, N., Cruces, P., Velázquez, W. 2002. Sensibilidad de los métodos baciloscopia: cultivo y ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis pulmonar: en pacientes del Edo. Vargas-Venezuela. *Kasmera.* 30(2): 137-14. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=362066&indexSearch=ID>. Visto: 20 de octubre de 2014.
- Bhargava, S., Tyagi, A.K., Tyagi, J.S. 1990. tRNA genes in mycobacteria: Organization and molecular cloning. *J. Bacteriol.* 172 (6): 2930-2934.
- Black, H. 1972. The association of tuberculosis in man with a recurrent infection in a dairy herd. *New Zeal. Vet. J.* 20: 14-15.
- Bloom, BR., y Murray, C.J.L. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257: 1055-1062.
- Bóddinghaus, B., Rogalí, I., Flohr, T., Blúcker, H., Bittger, E.C. 1990. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J. Clin. Microbiol.* 28(8): 1751-1759.
- Bouvet, E., Casalino, E., Mendoza-Sassi, G., Lariven, S., Vahee, E., Pernet, M., Oottot, S., Vachon, F. 1993. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* among HIV infected patients. A case-control study. *AIDS* 7: 1453-1460.
- Bouvier, O., Burgisser, H., Schneider, P.A. 1957. Observations sur les maladies du gibier, des oiseaux et des poissons faites en 1955 et 1956. *Schweiz Arch. Tierheilk.* D. 99: 461-477.
- Bradley, S. G. 1972. Reassociation of DNA from selected mycobacteria with that of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium farcinica*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 106: 122-124.
- Bradley, S. G. 1973. Relationships among mycobacteria and nocardiae based upon deoxiribonucleic acid reassociation. *J. Bacteriol.* 113: 645-651.

- Buddle, B.M., Aldwell, F.E., Pfeffer, A., de Lisle, G.W., Corner, L.A. 1994. Experimental *Mycobacterium bovis* infection in cattle: effect of dose of *M. bovis* and pregnancy on immune response and distribution of lesions. *New Zeal. Vet. J.* 42: 167–172.
- Burrill, J., Williams, C., Bain, G. 2007. Tuberculosis: a radiology review. *Radiographics.* 27: 1255-73.
- Caffrey, J. P. 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. *Vet. Microbiol.* 40: 1-4.
- Calmette, A. 1936. L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et les animaux. Editado por A. Boquet and L. Negre. Paris: Masson.
- Carmichael, J. 1939. Bovine tuberculosis in the tropics with special reference to Uganda. Part 1. *J. Comp. Pathol.* 52: 322-335.
- Carmichael, J. 1941. Bovine tuberculosis in the tropics with special reference to Uganda part II. *J. Comp. Pathol.* 97: 329-339.
- Cassidy, J.P. 2006. The pathogenesis and pathology of bovine tuberculosis with insights from studies of tuberculosis in humans and laboratory animal models. *Vet. Microbiol.* 112: 151-161.
- Cassidy, J.P., Bryson, T.D., Pollock, J.M., Forster, F., Evans, R.T., Neill, S.D. 1998. Early lesion formation in cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *J. Comp. Pathol.* 119: 27–44.
- Castets, M., Rist, N., Boisvert, H. 1969. La variété africaine du bacille tuberculeux humain. *Med. Afr. Noire.* 16: 321-322.
- Cetrangolo, A. 1971. Tuberculosis humana provocada por *Mycobacterium bovis*. *Anat. Patol. Clin.* 30: 84-88.
- Chaussé, P. 1913. Des méthodes à employer pour réaliser la tuberculose expérimentale par inhalation. *Bulletin de la Société de Médecine Vétérinaire.* 31: 267-274.
- Chen, Y., Chao, Y., Quantao, D., Liu, T., Xiang, J., Chen, J., Zhou, J., Zhan, Z., Kuang, Y., Cai, H., Chen, H., Guo, A. 2009. Potential challenges to the Stop TB for humans in China; cattle maintain *M. bovis* and *M. tuberculosis*. *Tuberculosis.* 89: 95-100.

- Cleaveland, S., Darren, J.S., Sayoki, G.M., Shirima, G., Kazwala, R.R., Eblate, E., Sharp, M. 2007. *Mycobacterium bovis* in rural Tanzania: Risk factors for infection in human and cattle populations. *Tuberculosis*. 87: 30-43.
- Clifton-Hadley, R.S., Wilesmith, J.W. 1991. Tuberculosis in deer: a review. *Vet. Rec.* 129 (1): 5-12.
- Cobbett, L. 1917. The causes of tuberculosis: together with some account of the prevalence and distribution of the disease. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cohan, F. M. 2002. What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 457-487.
- Collins, C.H., Grange, J.M. 1983. A review: the bovine tubercle bacillus. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 13–29.
- Collins, C.H., Orange, J.M. 1987. Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* infection. *Irish Vet. J.* 41: 363-366.
- Collins, D. M., y de Lisle, G. W. 1985. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *J. Clin. Microbiol.* 21(4): 562-564.
- Collins, J.D. 2006. Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Vet. Microbiol.* 112: 369-381.
- Cook, A.J.C., Tuchili, L.M., Buve, A., Foster, S.D., Godfrey-Faussetts, P., Pandey, G.S., McAdam, K.P.W.J. 1996. Human and bovine tuberculosis in the Monze District of Zambia—A cross-sectional study. *Br. Vet. J.* 152(1): 37-46.
- Cordes, D.O., Bullians, J.A., Lake, D.E., Carter, M.E. 1981. Observations on tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in sheep. *New Zeal. Vet. J.* 29: 60-62.
- Courtenay, O., Reilly, L.A., Sweeney, F.P., Hibberd, V., Bryan, S., Ul-Hassan, A., Newman, C., Macdonald, D.W., Delahay, R.J., Wilson, G.J., y Wellington, E.M.H. 2006. Is *Mycobacterium bovis* in the environment important for the persistence of bovine tuberculosis? *Biol. Lett.* 2: 460-462.
- Cousins, D., Williams, S., Liebana, E., Aranaz, A., Bunschoten, A., Van Embden, J., Ellis, T. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 36(1): 168-178.
- Cutir, L. T., Lynn, A. 1944. Pulmonary tuberculosis of bovine origin. *Brit. Med. J.* 1: 283-285.

- Davies, P.D., Humphries, M.J., Byfield, S.P. 1984. Bone and joint tuberculosis. A survey of notifications in England and Wales. *J. Bone Joint Surg.* 60: 326-330.
- Dawson, D.J. 1990. Tuberculosis in Australia: an unfinished fight. *Med. J. Australia* 154: 75-76.
- De Kantor, I., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Da Silva-Telles, M. A., Osório-Ribeiro, M., Garzón-Torres, M.C., Llerena-Polo, C., Ribón, W., García, V., Kuffo, D., Asencios, L., Vásquez-Campos, L.M., Rivas, C., de Waard, J.H. 2008. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Vet. Microbiol.* 88: 358-365.
- De Kantor, I., Ritacco, V. 2006. An update on bovine tuberculosis programmes in Latin American and Caribbean countries. *Vet. Microbiol.* 112: 111-118.
- De Kantor, IN., L. Barrera, y. Ritacco, & 1. Miceli. 1991. Utilidad del enzimo inmunoensayo en el diagnóstico de la tuberculosis. *Bol. Ofi. San. Panamá* 110: 461-470.
- De Kantor, IN., Ritacco, V. 1994. Bovine tuberculosis in Latin America and the Caribbean: current status, control and eradication programs. *Vet. Microbiol.* 40: 5-14.
- Dinnes, J., Deeks, J., Kunst, H., Gibson, A., Cummins, E., Waugh, N., Drobniowski, F., Lalvani, A. 2007. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol. Assess.* 11(3): 1-196.
- Domingo, M., Vidal, E., Marco, A. 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* 97: S20-S29.
- Domínguez, J., Blanco, S., Lacomá, A., García-Sierra, N., Prat, C., Ausina, V. 2008. Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 9: 33-41.
- Dorman, S. E. 2010. New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside and beyond. *Clin. Infect. Dis.* 50(S3): S173-S177.
- Dube, D., Agrawal, G. P., Vyas, S.P. 2012. Tuberculosis: from molecular pathogenesis to effective drug carrier design. *Drug Discov. Today.* 17 (13/14): 760-773.

- English, R., Bachmann, M.O., Bateman, E.D. 2006. Diagnostic accuracy of an integrated respiratory guidelines in identifying patients with respiratory symptoms requiring screening for pulmonary tuberculosis: a cross-sectional study. *BMC Pul. Med.* 6-22.
- Essey, M. A., Koller, M.A. 1994. Status of bovine tuberculosis in North America. *Vet. Microbiol.* 40: 15-22.
- Etter, E., Donado, P., Jori, F., Caron, A., Goutard, F., Roger, F. 2006. Risk analysis and bovine tuberculosis, a re-emerging zoonosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1081: 61-73.
- Euzeby, J. P. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. *Int. Jour. Sys. Bacter.* 47 (2): 590–2.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M.M., Dale, J., Innes, J.A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R.G., Smith, N.H., Hawkey, P.M., Sonnenberg, P. 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet.* 369: 1270-1276.
- Fanning, A., Edwards, S. 1991. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*Cervus elaplus*) in Alberta, Canada. *Lancet* 338 (Nov 16): 1253-1255.
- Fleming, G. 1875. A manual of veterinary sanitary science and policy. 2. London.
- Francis, J. 1947. Bovine Tuberculosis. Staples Press. Londres.
- Francis, T. 1947. Bovine tuberculosis including a contrast with human tuberculosis. London: Staples Press Ltd.
- Francis, T. 1958. Tuberculosis in animals and man. A study in comparative pathology. London: Cassell.
- Fréthingham, R., Hills, H.O., Wilson, K.H. 1994. Extensive DNA sequence conservation throughout the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *J. Clin. Microbiol.* 32(7): 1639-1643.
- García-Casanova, L. 2013. Diagnóstico de la tuberculosis bovina. En F. Milián (1a Ed.), La tuberculosis bovina en México: Las bases (pp. 139-191). México, D.F.: INIFAP.

- García-García, M. L., Valdespino, J. L., Palacios, M., Mayar, M. E., García, C., Sepúlveda, J. 1995. Tuberculosis y SIDA en México. *Salud Pub. Mex.* 37(6): 539-548.
- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P. R., Parkhill, J., Barrell, B. G., Cole, S. T., Gordon, S. V., Hewinson, G. 2003. The complete genome sequence of *M. bovis*. *PNAS.* 100(13): 7877-7882.
- Grange, J. M., Yates, M. D., y Kantor, I. N. 1996. Guidelines for speciation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Segunda edición. Organización Mundial de la Salud. WHO/EMCZOO/96.4. Documento sin publicar.
- Grange, J.M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis.* 81(1/2): 71-77.
- Griffith, A.S. 1914. Further investigations of the type of tubercle bacilli occurring in the sputum of physical persons. *Brit. Med. J.* 1: 1171-75.
- Gross, W. M., y Hawkins, J.E. 1985. Radiometric selective inhibition tests for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis/Mycobacterium bovis* and other mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 21: 565.
- Gutiérrez, M., García-Marín, J.F. 1993. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *J. Comp. Pathol.* 109: 361-370.
- Haddad, N., Masselot, M., Durand, B. 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res. Vet. Sci.* 76: 1-18.
- Hein, W.R., Tomasovic, A.A. 1981. An abattoir survey of tuberculosis in feral buffaloes. *Aust. Vet. J.* 57: 543-547.
- Hershberg, R., Lipatov, M., Small, P.M., Sheffer, H., Niemann, S., Homolka, S., Roach, J.C., Kremer, K., Petrov, D.A., Feldman, M.W., Gagneux, S. 2008. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS. Biol.* 6: e311.

- Higareda de Sales, L. G., Ramírez-Cervantes, F. J., Razo-Ibarra, F., Milián-Suazo, F., Aguilar-Tipacamú, G., Herrera-Rodríguez, S. E. 2015. Potencial presencia de tuberculosis zoonótica en la región de los Altos Sur de Jalisco, México. *Rev. Med. Cient. Sec. Salud Jalisco*. 2(4): 25-29.
- Honer zu Bentrup, K., y Russell, D.G. 2001. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.* 9(12): 597-605.
- Huard, R. C., Fabre, M., de Haas, P., Lazzarini, L.C., van Soolingen, D., Cousins, D., Ho, J.L. 2006. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Bacteriol.* 188: 4271-4287.
- Huitema, F.I. 1969. The eradication of bovine tuberculosis in cattle in the Netherlands and the significance of man as a source of infection for cattle. The Royal Netherlands Tuberculosis Association. 12: 62-67.
- Illumina. 2012. Nextera XT DNA Sample Preparation Guide. Disponible en: http://www.liaison.org/files/nextera_xt_sample_preparation_guide_15031942_c.pdf. Accedio el 10 de agosto de 2014.
- Imaeda, I. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* (ECO), *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35(2): 147-150.
- Jenkins, P.A. 1981. Lipid analysis for the identification of mycobacteria: an appraisal. *Rev. Inf. Dis.* 3: 862-866.
- Jenkins, A.O., Cadmus, S.I.B., Venter, E.H., Pourcel, C., Hauk, Y., Vergnaud, G., Godfroid, J. 2011. Molecular epidemiology of human and animal tuberculosis in Ibadan, Southwestern Nigeria. *Vet. Microbiol.* 151: 139-147.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van, M., Soolingen, D., Kuijper, A., Bunschoten, H., Molhuizen, R., Shaw, M., Goyal, V., Embden, J. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 35(4): 907-914.
- Karlson, A. G., Lessel, E.F. 1970. *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 273-282.

- Kaufmann, S.H.E., van Embden, D.A. 1993. Tuberculosis: a neglected disease strikes back. *Trends Microbiol.* 3(1): 2-5.
- Laniado-Laborín, F. y Cabrales-Vargas, N. 2005. No siempre una baciloscopía positiva indica tuberculosis. Otra razón para solicitar cultivos rutinariamente. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 18(4): 286-289.
- Laniado-Laborín, R., Muñiz-Salazar, R., García-Ortíz, R. A., Vargas-Ojeda, A. D., Villa-Rosas, C., Ocegüera-Palao, L. 2014. Molecular characterization of *Mycobacterium bovis* isolates from patients with tuberculosis in Baja California, Mexico. *Infect. Genet. Evol.* 27: 1-5.
- Lesslie, W., Birn, K.J., Stuart, P., O'Neill, P.A.F., Smith, J. 1968. Tuberculosis in the pig and the tuberculin test. *Vet. Rec.* 83: 647-651.
- Liébana, E., Aranaz, A., Francis, B., Cousins, D. 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. Clin. Microbiol.* 34: 933-938.
- Lipsky, B. A., Gates, J., Tenover, F. C., Plorde, J. J. 1984. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Clin. Infect. Dis.* 6(2): 214-222.
- Little, T.W.A., Naylor, P.F., Wilesmith, W. 1982. Laboratory study of *Mycobacterium bovis* infection in badgers and calves. *Vet. Rec.* 111: 550-557.
- Llaca-Díaz, J. M., Flores-Aréchiga, A., Martínez-Guerra, M. G., Cantú-Martínez, P. C. 2003. La baciloscopía y el cultivo en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. *Rev. Salud Pub. Nut.* 4(3). Disponible en: http://www.respyn.uanl.mx/iv/3/articulos/tbexp_co.htm. Visto: 3 de agosto de 2014.
- LoBue, P.A., Enarson, D.A., Thoen, C.O. 2010. Tuberculosis in humans and animals: an overview. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14(9): 1075-1078.
- Lomme, J. R., Thoen, C.O., Himes, E.M., Vinson, J.W, King, R.E. 1976. *Mycobacterium tuberculosis* infection in two East African oryxes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 169: 912-914.
- MacAdams, H.P., Erasmus, J., Winter, J.A. 1995. Radiological manifestations of pulmonary tuberculosis. *Radiol. Clin. North Am.* 33(4): 655-78.
- Magnusson, H. 1941. The relations between bovine and human tuberculosis from the veterinary point of view. *Acta Medicina Scandinarica* 135: 201-239.

- McFadyean, I. 1902. Tubercle bacilli in cow's milk as a possible source of tuberculous disease in man. British Congress on Tuberculosis 1901, en Londres.
- McFadyean, I. 1910. What is the common method of infection in tuberculosis? London: Annual Report of the Veterinary Department.
- McIlroy, S.G., Neill, S.D., McCracken, R.M. 1986. Pulmonary lesions and *Mycobacterium bovis* excretion from the respiratory tract of tuberculin reacting cattle. Vet. Rec.118: 718-721.
- Méndez, N., Di Lonardo, M., Sawicki, M., Gancedo, E., Rasgido, A., Fainboim, H. 1995. La ultrasonografía abdominal como método diagnóstico orientador en tuberculosis y/o micobacteriosis en pacientes HIV. Rev. Argent. Radiol. 59(2): 87-91.
- Menzies, D., Pai, M., Comstock, G. 2007. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. Ann. Intern. Med. 146(5): 340-54.
- Menzies, F.D., Neill, S.D. 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet. J. 160: 92–106.
- Mercado, F. J., Gloyd, S., Durning, J., López, J. L., Barrera, F. J. 1992. Riesgo de infección por tuberculosis en las jurisdicciones sanitarias de Jalisco, México. Salud Pública México. 34(5): 499-505.
- Mert, A., Bilir, M., Tabak, F. 2001. Miliary tuberculosis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 38 adults. Respirology. 6(3): 217-24.
- Milián-Suazo, F., Pérez-Guerrero, L., Arriaga-Díaz, C., Escartín-Chávez, M. 2010. Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. Prev. Vet. Med. 97(1): 37-44.
- Milián-Suazo, F., Salman, M. D., Black, W. C., Triantis, J. M., Ramírez, C., Payeur, J. B., Torres, M. C. 2000. Molecular epidemiologic analysis of *Mycobacterium bovis* isolates from México. Am. J. Vet. Res. 61(1): 90-95.
- Montero-Mendoza, E., Zapata-Martelo, E., Vázquez-García, V., Beutelspacher-Nazar, A., Sánchez-Pérez, H. J. 2001. Tuberculosis en la Sierra Santa Marta, Veracruz: un análisis desde la perspectiva de género. Papeles de Población. 7(29).

- Morris, R.S., Pfeiffer, D.U., Jackson, R. 1994. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* 40: 153-177.
- Mostowy, S., Behr, M. A. 2005. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Chest. Med.* 26: 207-216.
- Nader, A., Husberg, H. 1988. Estimación de pérdidas de producción por tuberculosis bovina en un rodeo lechero. *Rev. Med. Vet. Buenos Aires* 69: 36-43.
- National Collaborating Centre for Chronic Conditions. 2006. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. Londres: Royal College of Physicians.
- National Tuberculosis Controllers Association; Center for Disease Control and Prevention. 2005. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis; recommendations from The National Tuberculosis Controllers Association and CDC, and Guidelines for using the Quantiferon-TB Gold Test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States. 54(RR-15):1-55.
- Neill, S.D., Bryson, D.G., Pollock, J.M. 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 81: 79–86.
- Neill, S.D., Hanna, I., Mackie, D.P., Bryson, T.O.D. 1992. Isolation of *Mycobacterium bovis* from the respiratory tract of skin test-negative cattle. *Vet. Rec.* 131: 4547.
- Neill, S.D., Hanna, J., O'Brien, J.J., McCracken, R.M. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123: 340-343.
- Neill, S.D., Hanna, J., O'Brien, J.J., McCracken, R.M. 1988. Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet. Rec.* 123: 340–343.
- Neill, S.D., Hanna, J., O'Brien, J.J., McCracken, R.M. 1989. Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. *Vet. Rec.* 124: 269–271.
- Neill, S.D., O'Brien, J.J., Hanna, J. 1991. A mathematical model for *Mycobacterium bovis* excretion from tuberculous cattle. *Vet. Microbiol.* 28: 103-109.
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-2013, Para la prevención y control de la tuberculosis. Disponible en:

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5321934&fecha=13/11/2013. Accedido el 19 de sep. 2013.

- NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4874790&fecha=08/03/1996. Accedido el 21 de dic. 2013.
- O'Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J., Berry, M.P.R. 2013. The Immune Response in Tuberculosis. *Ann. Rev. Immunol.* 31: 475-527.
- O'Reilly, L.M., Daborn, C. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis.* 76(1): 1-46.
- Organización Panamericana de la Salud. 2008. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis, Parte 2. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_details&gid=17477&Itemid=270&lang=es. Accedido el 10 de agosto de 2013.
- OIE. (World Organization for Animal Health). 2009. Bovine tuberculosis. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.4.7: 683.
- Orme, I.M. 2014. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis.* 94: 8-14.
- Park, W. H. 1913. The relation of bovine tuberculosis in the production of human tuberculosis: Department of Health, New York City.
- Parra, A., García, N., García, A., Lacombe, A., Moreno, F., Freire, F., Moran, J., Hermoso de Mendoza, J. 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Vet. Microbiol.* 127: 315-324.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y., García-de-Viedma, D. 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Res. Vet. Sci.* S94-S100.
- Pfeiffer, D.U., Morris, R.S. 1991. A longitudinal study of bovine tuberculosis in possums and cattle. III Symposium on Tuberculosis (Publication No. 732). Veterinary Continuing Education. Palmerston North, N.Z. Massey University.

- Portillo-Gómez, L., Sosa-Iglesias, E.G. 2011. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15(10): 1409-1414.
- Pritchard, V.G. 1988. A century of bovine tuberculosis 1888-1988: Conquest and controversy. *J. Comp. Pathol.* 99: 357-399.
- Ravenel, M. P. 1902. Intercommunicability of human and bovine tuberculosis. *J. Comp. Pathol. Therap.* 15: 112-143.
- Reed, G. B. 1957. Genus *Mycobacterium* (species affecting warm-blooded animals except those causing leprosy), en G. B. Reed, E. G. D. Murray, y N. R. Smith (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams y Wilkins. Baltimore.
- Rehren, G., Walters, S., Fontan, P., Smith, I., Zárraga, A.M. 2007. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 87: 347-359.
- Robbe-Austerman, S. 2014. *Mycobacterium bovis* whole genome sequencing SNP analysis. United States Department of Agriculture, National Veterinary Services Laboratories, Animal and Plant Health Inspection Service.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., Mesirov, J. P. 2011. Integrative Genomics Viewer. *Nature Biotech.* 29: 24–26. Disponible en: <https://www.broadinstitute.org/software/igv/download>. Accedido el 20 de ago. 2014.
- Rodríguez-Hernández, E., Pizano-Martínez, O. E., Milián-Suazo, F., Cantó-Alarcón, G. J., Anaya-Escalera, A. M., Rubio-Venegas, Y., Nava-Vargas, A. 2014. Manual de procedimientos para la identificación molecular y genotipificación de *M. bovis*. CENIDF y MA. Primera Edición. Querétaro, México.
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, I., Bottger, E.C. 1990. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40 (4): 323-330.
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, I., Bottger, E.C.. 1990. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified products. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1915-1920

- Rossi, L., Dokoupil, S. 1969. Causes of reinfection of tuberculosis-free herds of cattle. Vet. Med. Praha 14: 441-448.
- Ruiz, M.J., Blanquer, R., Calpe, J.L., Caminero, J.A., Caylá, J., Dominguez, J.A., García, J.M., Vidal, R. 2008. Normativa SEPAR. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. Arch. Bronconeumol. 44(10): 551-66.
- Ruys, A.C. 1939. On tuberculosis in man due to the bovine type of the tubercle bacillus in the Netherlands. Tubercle 20: 556-560.
- Sánchez-Pérez, H. J., Hernán, M. A., Hernández-Díaz, S., Jansá, J. M., Halperin, D., Ascherio, A. 2002. Detection of pulmonary tuberculosis in Chiapas, Mexico. Ann. Epidemiol. 12(3): 166-172.
- Sancineto, A.E. 2009. Tuberculosis: diagnóstico y tratamiento. Editorial Lajouane. Buenos Aires. 7: 169-175.
- Secretaría de Salud. 2003. Manual de Técnicas de Laboratorio para el Examen Baciloscópico . INDRE. Disponible en: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/descargas/pdf/manual_laboratorio_TB.pdf. Accedido en 5 de ago. 2013.
- SENASICA, 2013. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria), 2013. Tuberculosis Bovina, Situación actual. Consultado marzo 2013. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4370>. Accedido en 12 de sep. 2014.
- Sigurdsson, J. 1945. Studies on the risk of infection with bovine tuberculosis to the rural population. Acta Tuberculosea Scandinavica Supplementum 15: 24-60.
- Sjogren, I., Sutherland, I. 1975. Studies of tuberculosis in man in relation to infection in cattle. Tubercle 56: 113-127.
- Smith, N. H., Kremer, K., Inwald, J., Dale, J., Driscoll, J.R., Gordon, S.V., van Soolingen, D., Hewinson, R.G., Smith, J.M. 2006. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J. Theor. Biol. 239: 220-225.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Whittman, T.S., Musser, J.M. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 9869-9874.

- Stucki, D., Ganeux, S. 2013. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. *Tuberc.* 93(1): 30-39.
- Sunderam, O., McDonald, R., Maniatis, Oleske, J., Kapila, R., Reichman, L.B. 1986. Tuberculosis as a syndrome manifestation of the acquired immunodeficiency (AIDS). *J. Amer. Med. Assoc.* 256: 362-366.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsç-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Locht, C., van Soolingen, D. 2006. Proposal for Standardization of Optimized Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit-Variable-Number Tandem Repeat Typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 44(12): 4498-4510.
- Supply, P., Warren, R.M., Banuls, A.L., Lesjean, S., Van Der Spuy, G.D., Lewis, L.A., Tibayrenc, M., van Helden, P.D., Locht, C. 2003. Linkage disequilibrium between minisatellite loci supports clonal evolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a high tuberculosis incidence area. *Mol. Microbiol.* 47: 529-538.
- Swai, H. F., Mugusi, F. M., Mbwambo, J. K. 2011. Sputum smear negative pulmonary tuberculosis: sensitivity and specificity of diagnostic algorithm. *BMC.* 4: 475.
- Tarara, R., Suleman, M.A., Sapolsky, R., Wabomba, M.J. 1985. Tuberculosis in wild olive baboons, *Papio cynocephalus anubis*, in Kenya. *J. Wildlife Dis.* 21: 137-140.
- Tessaro, S. V., Forbes, L.B., Turcotte, C. 1990. A survey of brucellosis and tuberculosis in bison in and around Wood Buffalo National Park, Canada. *Canadian Vet. J.* 31: 174-180.
- Thoen, C.O., LoBue, P.A., de Kantor, I. 2010. Why has zoonotic tuberculosis not received much attention? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 14(9): 1073-1074.
- Thoen, G.O., Himes, F.M. 1986. *Mycobacterium* in animals. In *Pathogenesis of Bacterial Infections*. Edited por C.L.O. and C.O.T. Ames: Iowa State University Press.
- Thoen, G.O., Himes, F.M. 1986. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection. *Prog. Vet. Microbiol. Immunol.* 2: 198-214.

- Toledo-Ordoñez, P., Milián-Suazo, F., Santillan-Flores, M. A., Ramírez-Casillas, C. I. 1999. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Vet. Méx.* 30(3): 227-229.
- Torgereson, P.R., Torgereson, D.J. 2009. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about? *Trends Microbiol.* 18(2): 72.
- Tweddle, N. E., Livingstone, P. 1994. Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and New Zealand. *Vet. Microbiol.* 40: 23-39.
- Van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., de Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S. 1997. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1236-1245.
- Villarreal-Ramos, B., McAulay, M., Chance, V., Martin, M., Morgan, J., Howard, C.J. 2003. Investigation of the role of CD8+ T cells in bovine tuberculosis in vivo. *Infect. Immun.* 71: 4297– 4303.
- Vordermeier, M. y Whelan, A.O. 2012. ELISPOT assays to enumerate bovine IFN- γ -secreting cells for the development of novel vaccines against bovine tuberculosis. *Methos. Mol. Biol.* 792: 219-227.
- Vural, S.A., Tunca, R. 2001. Generalized tuberculosis in a 45 day-old calf. *DTW. Deut. Tierarztl.Woch.* 108: 468–470.
- Wagner, J. C., Buchanan, G., Bokkenheuser, V., Levisseur, S. 1958. An acid-fast bacillus isolated from the lungs of the *Cape hyrax*, *Procavia capensis* (Pallas). *Nature.* 181: 284-285.
- Walley, T. 1888. Veterinary sanitation. *J. Comp. Pathol. Therap.* 1: 25-32.
- Warner, D.F., Koch, A., Mizrahi, V. 2014. Diversity and disease pathogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 23(1): 14-21.
- Wells, A. O., y Oxon, D.M. 1937. Tuberculosis in wild voles. *Lancet.* 1221.
- Werner, V. E. 1981. Transmission of tuberculosis to cattle herd from livestock attendant with renal tuberculosis. *Monat. Veter.* 36: 819-820.
- WHO, Geneva, Suiza. Implementing the WHO Stop TB Strategy: a handbook for national tuberculosis control programmes. WHO/HTM/TB/2008.401.

- Wigle, W.D., Ashley, M., Killough, E.M., Cosens, M. 1972. Bovine tuberculosis in humans in Ontario. The epidemiologic features of 31 active cases occurring between 1964 and 1970. *Am. Rev. Resp. Dis.* 106: 528-534.
- Wilesmith, J.W. 1991. The epidemiology of bovine tuberculosis in Great Britain: an overview of the badger problem. Symposium on Tuberculosis (Publication No. 232). Veterinary Continuing Education. Palmerston North, N.Z.: Massey University.
- Wilkins, E.G.L., Griffiths, R.J., Roberts, C. 1986. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*. *Thorax.* 41: 685-687.
- Wilkins, E.G.L., Griffiths, R.J., Roberts, C., Green, H.T. 1986b. Tuberculous meningitis due to *Mycobacterium bovis*: a report of two cases. *Postgrad. Med. J.* 62: 653-655.
- Wilson, P., E. Weavers, E. West, M. Taylor, J. Kavanagh, & P. Jones. 1984. *Mycobacterium bovis* infection in primates in Dublin zoo: Epidemiological aspects and implications for management. *Lab. Anim.* 18: 383-387.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2): 221-271.
- Woese, C.R., Gutelí, R., Oupta, R., Noller, H.P. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 47: 621-669.
- Woodford, M.H. 1982. Tuberculosis in wildlife in the Ruwenzori National Park. Uganda (Part 1). *Trop. Anim. Health Prod.* 14: 81-88.
- Yates, M.D., Orange, J.M. 1988. Incidence and nature of human tuberculosis due to bovine tubercle bacilli in South-East England: 1977-1987. *Epidemiol. Inf.* 101: 225-229.

APÉNDICE 1. Alineamiento de SNPs del aislado 13-1212317FM comparado con la cepa de referencia AF2122/97.

reference_pos	reference_call	chrom1-1530862	chrom1-1605839	chrom1-1928563	chrom1-202346C	chrom1-2042473	chrom1-2136634	chrom1-2252243	chrom1-2278789	chrom1-2278824	chrom1-232188	chrom1-2335359	chrom1-2373913	chrom1-2377026	chrom1-2421661	chrom1-2501788	chrom1-2524106	chrom1-2663078	chrom1-2950791	chrom1-2979744	chrom1-3014181	chrom1-3063629	chrom1-309452C
09-0257FM_MEX_JAL_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
13-1902FM_MEX_AGS_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
13-1957FM_MEX_AGS_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
10-0488FM_MEX_COA_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
13-1929FM_MEX_AGS_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
09-0238FM_MEX_JAL_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
09-0328FM_MEX_Edo_Mex_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
13-1914FM_MEX_AGS_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
13-1916FM_MEX_AGS_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
13-1913FM_MEX_AGS_Cattle-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
13-1212317FM_MEX_QUE_Human-Val	T	G	G	A	T	C	A	G	A	C	G	T	A	A	C	C	C	C	G	G	T	G	C
chrom1-3124583	A	G	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-315477C	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-3491098	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-362265	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-3715389	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-3812465	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-3936178	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-3952885	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-4006348	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-4144689	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-4158142	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-507929	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-611077	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-669797	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-67098	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-680416	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-701329	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-712319	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-828003	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-941068	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-976327	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-998183	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1057	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1124238	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1137772	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-116843C	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-120854	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1230847	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-126167	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1356346	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1493708	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1505078	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1527223	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1578004	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-159742C	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-160535	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1649457	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-165799	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1712677	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1841541	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-192846C	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1953565	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-1954568	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2053144	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2093495	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2099545	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2103632	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2141458	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2153644	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2210845	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2218298	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2240044	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2242582	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-225313C	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2278807	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2278805	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-227881C	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2334354	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2372031	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2393523	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-241385C	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2453841	G	A	T	C	G	C	A	C	C	G	T	A	T	C	C	G	A	C	T	T	T	T	A
chrom1-2474596	T	A	C	C	T	G	G	A	C	C													

APÉNDICE 2. Alineamiento de SNPs del aislado 14-805568 comparado con la cepa de

referencia AF2122/97.

reference_pos	reference_call	chrom1-165799	chrom1-166696	chrom1-2800796	chrom1-1986847	chrom1-2681947	chrom1-2552455	chrom1-3107163	chrom1-779997	chrom1-1097018	chrom1-1097084	chrom1-2158534	chrom1-2160322	chrom1-3046950	chrom1-3515023	chrom1-1509187	chrom1-2292599	chrom1-2878309	chrom1-4289154	chrom1-3097735	chrom1-3159168	chrom1-1109444	chrom1-1145165	chrom1-114856
09-0236FM_MEX_JAL_Cattle-Val	A	G	G	T	A	A	T	A	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	A	G	A
02-0302_MEX_TX_Fed	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
06-5439_UNK_KS_Fed-Val	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
06-3430_DUN_TX_Fed	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
09-0275FM_MEX_JAL_Cattle-Val	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
11-7945_VEC_TX_Fed	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
05-1686_UNK_TX_Event_Roping	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
14-805568FM	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
09-5047_TX_Dairy_09-A-Val	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
09-5050_TX_Dairy_09-A-Val	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
09-5187_TX_Dairy_09-A-Val	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
09-5188_TX_Dairy_09-A-Val	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
09-5189_TX_Dairy_09-A-Val	A	G	T	A	A	T	A	T	T	G	T	G	T	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1197685	G	A	A	C	G	A	T	A	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1412865	T	T	A	C	G	A	T	A	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2047550	T	T	A	C	G	A	T	A	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2077035	A	C	G	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2321137	C	G	G	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2325321	A	A	T	A	T	A	T	A	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2357401	G	T	A	C	G	A	T	A	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2364195	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-272942	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3063743	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-309002	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3120991	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3369254	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-346520	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3594894	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3893725	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-4094497	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-4105359	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-671054	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-687585	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-80204	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-830881	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1245658	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1374448	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2306327	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2404801	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3043000	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3658614	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3896113	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-4344306	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-915069	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3184753	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1789830	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3433277	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3735349	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3987654	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-4311362	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-914113	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-157981	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1868755	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1869606	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2548608	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2605547	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3442002	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-788931	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1716601	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3690580	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2381060	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1010915	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1016402	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1686895	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-1709126	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-206863	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2222764	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-2369757	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3309984	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3542369	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G	C	A	T	T	G	G	A	C	T	G	A
chrom1-3630210	A	A	C	G	A	T	A	T	T	G	G	G	G											

