



Universidad Veracruzana

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

---

---

**IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium bovis* A  
PARTIR DE QUESOS FRESCOS EXPENDIDOS EN  
MERCADOS DE LA ZONA CONURBADA  
VERACRUZ-BOCA DEL RÍO Y FACTORES DE  
RIESGO ASOCIADOS**

TRABAJO RECEPCIONAL EN LA MODALIDAD DE:

**TESIS**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE

**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

PRESENTA:

**MVZ. JUAN VÍCTOR ORNELAS CRUZ**

DIRECTOR INTERNO:

DR. DAVID I. MARTÍNEZ HERRERA

CO-DIRECTOR:

DRA. DORA ROMERO SALAS

VERACRUZ, VER.

SEPTIEMBRE 2011



Universidad Veracruzana  
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
 Coordinación de Estudios de Posgrado

POSG/053/2011

H. Veracruz, Ver., a 3de agosto de 2011

ASUNTO: Aprobación de tesis de Maestría

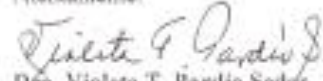
**MVZ JUAN VÍCTOR ORNELAS CRUZ**  
**PR E S E N T E**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencia Animal intitulada:

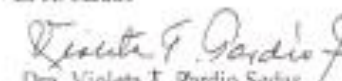
**"Identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de quesos frescos expendidos en mercados de la zona conurbada Veracruz – Boca del Río y factores de riesgo asociados"**

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del Jurado del examen, por lo que está usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.


Atentamente:

  
 Dra. Violeta T. Pardo Sedas  
 Coordinadora de la Maestría en  
 Ciencia Animal

El H. Jurado

  
 Dra. Violeta T. Pardo Sedas  
 Presidenta

  
 Dra. Lorena López de Buen  
 Secretaria

  
 Dr. Ricardo Flores Castro  
 Vocal

  
 M. en C. Laura Quintero Servin  
 Suplente

c.c.p. Mtro. Francisco Valázquez Sarriente - Director  
 - Archivo



**IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium bovis* A PARTIR DE QUESOS FRESCOS  
EXPENDIDOS EN MERCADOS DE LA ZONA CONURBADA VERACRUZ-BOCA  
DEL RÍO Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS**

**Por:**

**MVZ. JUAN VÍCTOR ORNELAS CRUZ**

**Tesis propuesta al Colegio de Profesores del Posgrado  
de la**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**de la**

**UNIVERSIDAD VERACRUZANA**

**Como requerimiento parcial para  
obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**en**

**CIENCIA ANIMAL**

**Septiembre de 2011**

**CONTENIDO**

DEDICATORIA.....	ii
INSTITUCIONES DONDE SE DESARROLLO LA INVESTIGACIÓN.....	iii
RECONOCIMIENTO DE BECA.....	iv
RECONOCIMIENTOS.....	v
INDICE.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii

## DEDICATORIA

A Dios, por estar siempre presente en mi vida y bendecirme para llegar hasta donde he llegado, por darme todo lo que tengo, darme fortaleza, y no dejarme caer nunca.

A mi Familia con mucho cariño, gracias por todo su apoyo y estar conmigo en todo momento. A mis padres, gracias por la confianza que me brindaron y ser una parte muy importante para que el día de hoy este alcanzando esta meta. A mis hermanos, gracias por estar conmigo y apoyarme siempre. Gracias familia porque aunque hemos pasado momentos difíciles siempre hemos estado juntos. Los quiero con todo mi corazón y este logro también es de ustedes, porque sin ustedes no estaría aquí ni sería lo que soy ahora.

A mis padrinos, el MVZ Valentín Noriega Morales (QEPD), gracias por todo, porque a pesar de que no estás aquí con nosotros se que desde el cielo nos cuidas y nos proteges; y la MVZ Ana Cerón Cuervo, gracias por su apoyo, por sus consejos y por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia como MVZ. A mis primas con mucho cariño. Las quiero mucho a todas.

A mis amigos (Sandra, Edgar, Ingrid, Reyna, Natalia, Peña, Javier, Mayra, Adasué y los del club CC) por todos los momentos que pasamos juntos, fueron muy divertidos, siempre los recordaré.

Al Dr. David I. Martínez Herrera, por ser una persona importante en mi formación profesional, por ser mi tutor, asesor de tesis y sobre todo por ser un gran amigo, gracias por sus consejos, por estar ahí siempre que lo necesité, por tenerme confianza y permitirme pasar con usted grandes momentos, gracias por todo "papá Chobi".

A la Sra. Milagros Ramírez Sánchez, porque siempre se preocupaba por nosotros, estaba al pendiente de todos, nos cuidaba como una segunda madre, nos regañaba cuando era necesario y lo principal es que nos preparaba de comer junto con la abuela (QEPD), gracias por todo "mamá Mila", las quiero mucho y las voy a extrañar.

Esta tesis se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Veracruzana en el Laboratorio de Microbiología ubicado en la Unidad de Diagnóstico "Augusto Mancisidor Ahuja" de la Posta Zootécnica Torreón del Molino de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia bajo la supervisión del Dr. David I. Martínez Herrera, y en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz ubicado en la Ciudad Industrial "Bruno Pagliai" en Veracruz, Ver. Bajo la supervisión de la QC. Aremy Cuéllar Sánchez.

El autor del presente trabajo fue beneficiado con una beca para estudiar en el programa de Maestría en Ciencia Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana. El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) aportó los recursos de manutención en el periodo comprendido de agosto del 2010 a julio del 2011.

No. de becario: 236024

CVU: 336245

## RECONOCIMIENTOS

**A la Universidad Veracruzana**, por haber sido el alma Mater de mi formación profesional.

**A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**, por haberme otorgado un espacio y lograr concluir mis estudios de Licenciatura y Maestría.

**Al Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz**, por abrirme sus puertas y apoyarme en la realización de este trabajo.

**Al Laboratorio de Microbiología de la unidad de diagnostico de la Posta Zootécnica Torreón del Molino de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana a cargo del Dr. David I. Martínez Herrera**, en el cual se realizó la parte del análisis bacteriológico de las muestras.

**Al Laboratorio de Nivel III del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz a cargo de la QC. Aremy Cuéllar Sánchez**, en el cual se realizó la identificación de especie de las cepas aisladas por bacteriología.

**Al Dr. David I. Martínez Herrera**, por confiar en mí y darme la oportunidad de ser su estudiante de posgrado, por todos los consejos, las experiencias, enseñanzas y sobre todo por no solo ser mi asesor si no un gran amigo.

**A la Dra. Dora Romero Salas**, por todo el tiempo que me brindó, por sus consejos y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

**A mi comité tutorial: Dra. Violeta T. Pardío Sedas, Dr. David I. Martínez Herrera, Dra. Dora Romero Salas y a la Dra. Lorena López de Buen**, gracias por todos los consejos y observaciones realizadas a este trabajo y a mi persona.

**A los miembros de mi jurado: Dra. Violeta T. Pardío Sedas, Dra. Lorena López de Buen, Dr. Ricardo Flores Castro y M. en C. Laura Quintero Servín**, por todas las sugerencias sobre este trabajo y hacer de este un trabajo de mejor calidad.



**A mis profesores de posgrado,** por todas sus enseñanzas, por sus críticas y sugerencias que recibí durante las presentaciones en los seminarios las cuales me sirvieron para mi formación profesional.

**A mis compañeros de posgrado,** por sus observaciones, comentarios y sugerencias en clases y en los seminarios y por todos los momentos que pasamos juntos.

**A la M. en C. Mayra Villanueva Valencia,** por toda su ayuda durante la realización de esta investigación, por sus consejos y enseñanzas.

**A mis compañeros de laboratorio: Sandra, Adasue, Javier, Peña, Graciela y Edgar,** por toda su ayuda durante la realización de esta investigación.

**A la M. en C. Laura Quintero Servín,** por todo el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

**A la M. en C. Aurora Parissi Crivelli,** por permitir realizar parte de mi trabajo en las instalaciones del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz y por todo el apoyo brindado.

**A la QC. Aremy Cuéllar Sánchez,** por toda la atención brindada en mi estancia en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz, por sus consejos, por transmitirme sus conocimientos.

## INDICE

	Página
INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Quesos en México.....	3
1.2 Elaboración de quesos.....	3
1.3 Queso fresco.....	4
1.4 Inocuidad alimentaria.....	5
1.5 Micobacterias en leche y quesos.....	6
1.6 Generalidades de las micobacterias.....	7
1.7 Patogenia de <i>Mycobacterium</i> .....	7
1.8 Tuberculosis bovina.....	8
1.9 Tuberculosis humana por <i>Mycobacterium bovis</i> .....	10
1.10 Factores de riesgo para las personas.....	12
1.11 Micobacterias atípicas.....	14
1.11.1 <i>Mycobacterium fortuitum</i> .....	15
1.12 Diagnóstico de la tuberculosis.....	15
1.12.1 Métodos de diagnóstico indirectos.....	16
1.12.1.1 Prueba de tuberculina.....	16
1.12.2 Métodos de diagnóstico directos.....	16
1.12.2.1 Diagnóstico histopatológico.....	16
1.12.2.2 Diagnóstico bacteriológico.....	17
1.12.2.2.1 Directo.....	16
1.12.2.2.2 Cultivo.....	18
1.12.2.2.2.1 Medios sólidos con huevo.....	19
1.12.2.2.2.2 Medios sólidos con agar.....	19
1.13 Identificación de especie de <i>Mycobacterium</i> .....	20
1.13.1 Identificación fenotípica.....	20
1.13.1.1 Microscopía.....	20
1.13.1.2 Velocidad de crecimiento.....	20
1.13.1.3 Producción de pigmento.....	21
1.13.1.4 Morfología colonial.....	21
1.13.2 Pruebas bioquímicas.....	21

1.14 Técnicas moleculares en el diagnóstico de micobacterias.....	23
1.14.1 Diagnóstico de <i>Mycobacterium bovis</i> mediante PCR.....	24
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS.....	27
General.....	27
Específicos.....	27
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
2.1 Localización.....	28
2.2 Diseño experimental y tamaño de muestra.....	28
2.3 Recolección de muestras.....	29
2.4 Variables.....	29
2.5 Cepas de referencia.....	29
2.6 Procesamiento de las muestras.....	29
2.6.1 Métodos bacteriológicos.....	29
2.6.2 Métodos moleculares.....	30
2.6.2.1 Extracción del ADN.....	31
2.6.2.2 Amplificación del ADN para el Complejo <i>Mycobacterium bovis</i> .....	32
2.6.2.3 Gel de agarosa.....	32
2.6.2.4 Amplificación del ADN para micobacterias atípicas.....	32
2.6.2.5 Digestión de las enzimas de restricción.....	33
2.7 Análisis estadístico.....	33
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
3.1 Aislamiento e identificación microbiológica.....	34
3.2 Identificación de especie por PCR.....	35
3.3 Determinación de factores de riesgo.....	39
CONCLUSIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXO 1.....	53

**LISTA DE CUADROS**

CUADRO 1. Identificación fenotípica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes.....	22
---	----

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1. Fragmento amplificado por PCR-RFLP hsp65.....	36
FIGURA 2. Digestión enzimática del fragmento amplificado por PCR-RFLP hsp65.....	38
FIGURA 3. Número de queserías en los mercados de la zona conurbada Veracruz–Boca del Río.....	39
FIGURA 4. Localidades de procedencia de los quesos que se expenden en los mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.....	41

## RESUMEN

Ornelas Cruz, Juan Víctor. MCA, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Septiembre 2011. **IDENTIFICACIÓN DE *Mycobacterium bovis* A PARTIR DE QUESOS FRESCOS EXPENDIDOS EN MERCADOS DE LA ZONA CONURBADA VERACRUZ-BOCA DEL RÍO Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS.** Asesores: Dr. David I. Martínez Herrera, Dra. Dora Romero Salas.

Los productos derivados de la leche pueden contribuir a una mayor propagación de las enfermedades transmitidas por alimentos. Una de estas enfermedades es la tuberculosis bovina, importante zoonosis que representa un problema de salud pública que puede adquirirse por el consumo de leche y sus derivados contaminados. Debido a lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo identificar *Mycobacterium bovis* a partir de quesos frescos expendidos en mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río y sus factores de riesgo asociados. Para ello, se colectaron 30 muestras en dos ocasiones, una en la temporada de estiaje y otra, en la de lluvias durante 2010 en los mercados registrados por la autoridad sanitaria y que corresponden a Malibrán, Hidalgo, Zaragoza, Unidad Veracruzana y Abastos Boticaria. Las muestras se procesaron por medio de técnicas bacteriológicas convencionales y moleculares (PCR). Se procesaron por bacteriología las 60 muestras de queso colectadas. Transcurridas ocho semanas de incubación, a las colonias sugestivas a *Mycobacterium* spp se les tiñó con Ziehl-Neelsen. Así de una de las muestras, se obtuvo una colonia con bacterias ácido-alcohol resistentes que se resemebró para realizarle pruebas bioquímicas y la PCR. De las 60 muestras colectadas en los mercados seleccionados, 34 correspondieron al Malibrán, 14 a Unidad Veracruzana, seis al Zaragoza, cuatro al Hidalgo y dos a Abastos Boticaria. El 72% de las queserías manifestó comprar los quesos y 28% producirlos; 8% se elaboraron con leche pasteurizada y 92% no. El 52% de los quesos de donde se colectaron las muestras tuvieron 1 día de elaborados, 25% dos y 23% de tres a cuatro; así como, 32% de éstos estuvieron expuestos al aire libre, 51% en vitrinas y 17% en refrigeración. El 22% de los quesos procedían del municipio de Ignacio de la Llave. No se pudo realizar la identificación de *M. bovis* mediante pruebas bioquímicas, pero por PCR se identificó *M. fortuitum* de una muestra (1.67%) que corresponde al periodo de estiaje, colectada en el mercado Abastos Boticaria y procedente del municipio de Alvarado. No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las variables y tampoco se identificaron factores de riesgo. Se concluyó que fue posible aislar *Mycobacterium* spp mediante diagnóstico bacteriológico convencional, que no se identificó *M. bovis* mediante pruebas bioquímicas y técnicas moleculares y que sólo se identificó *M. fortuitum* por PCR.

## ABSTRACT

Ornelas Cruz, Juan Víctor. MCA, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, Universidad Veracruzana, September 2011. ***Mycobacterium bovis* IDENTIFICATION FROM FRESH CHEESES EXPENDED IN MARKETS OF THE VERACRUZ-BOCA DEL RÍO METROPOLITAN AREA AND RISK FACTORS ASSOCIATED.** Dr. David I. Martínez Herrera, Dra. Dora Romero Salas.

The products derived from milk can contribute to a major spread diseases transmitted by food. One of these is bovine tuberculosis, an important zoonosis representing a public health hazard that can be transmitted by consumption of non pasteurized milk and contaminated derivatives. The aim of this study was to identify *Mycobacterium bovis* from fresh cheeses expended in markets at Veracruz – Boca del Río conurbation and the risk associate factors as well. Thus 30 samples were collected in two seasons, one in drought and other in rain seasons during 2010 at markets registered by the health authority corresponding to Malibrán, Hidalgo, Zaragoza, Unidad Veracruzana and Abastos Boticaria. The samples were processed by conventional bacteriology and molecular procedures (PCR). A total of 60 cheese samples were collected and processed by bacteriology; after eight incubation weeks *Mycobacterium* spp suggestive colonies were stained by Ziehl-Neelsen. From one of the collected samples, a suggestive colony was obtained corresponding to an acid – alcohol resitant bacteria and then processed by biochemical tests and PCR. From 60 samples collected at the selected markets, 34 corresponded to Malibrán, 14 to Unidad Veracruzana, six to Zaragoza, four to Hidalgo and two to Abastos Boticaria. 72% of the cheese stores demonstrated that they buy the cheeses and 28% to produce them; 8% was elaborated by pasteurized milk and 92 % not. 52% of cheeses collected had 1 day of elaborated, 25% two and 23% three to four; as well as, 32% of these was exposed outdoors, 51% in showcases and 17% in refrigeration. 22% of cheeses procceded from Ignacio de la Llave municipality. It was not possible to identify *M. bovis* by means of biochemical tests, however by means of PCR *M. fortuitum* was identified from one sample (1.67%) from the drought season, collected at Abastos Boticaria market from Alvarado municipality. There were not statistical differences ( $P>0.05$ ) between variables or risk factors associated. It is conclusive that it was possible to isolate *Mycobacterium* spp by means of bacteriology conventional procedure but it was not identified as *M. bovis* by means of biochemical or PCR; however *M. fortuitum* was identified by PCR.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad a nivel mundial van en aumento las enfermedades transmitidas por alimentos, conocidas como "ETA", las cuales representan un grave problema de salud pública (Pietro *et al.*, 2004). Debido a ello, se ha incrementado el interés por el consumo de alimentos de calidad, por lo que diferentes organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), trabajan para procurar la inocuidad de los alimentos, entendida como "la propiedad de los alimentos para no causar daño a la salud pública" (Sóstenes y Martínez, 2006).

Los alimentos de origen animal y sus derivados son los que con mayor frecuencia están involucrados en la transmisión de enfermedades, ya que su contaminación se origina desde los animales que se encuentran enfermos y pueden contaminar la carne, la leche ó los huevos (Vásquez, 2003). Los derivados de la leche son uno de los productos de mayor propagación de ETA, ya que son alimentos en su mayoría de producción artesanal que no cumplen con ninguna norma de calidad y son consumidos en forma común (FAO, 2009).

La OMS ha publicado una lista en la que se señalan los agentes patógenos que, transmitidos por la leche, pueden originar enfermedades en el hombre; uno de los más importantes es *Mycobacterium bovis* (Magariños, 2000). En México, cerca del 30% de la leche que se produce se vende cruda y una parte de ésta se destina a la producción de queso fresco expendido en mercados populares (Mateos, 2000).

Por otra parte, la tuberculosis bovina es una importante zoonosis, pues las personas pueden contraer la infección por *M. bovis*, el cual representa un problema de salud pública (OIE, 2008). Las principales vías de entrada de *M. bovis* son la digestiva y la respiratoria. Debido a ello, los principales factores de riesgo para las personas lo constituyen el contacto estrecho con animales infectados y el consumo de leche cruda o subproductos elaborados con la misma, contaminados (Acha y Szyfres, 2001).

Además, la tuberculosis humana es una de las enfermedades infecciosas más importantes a nivel mundial. Es la causa más frecuente de muerte en adultos por un agente infeccioso. Según la OMS una tercera parte de la población esta infectada por tuberculosis, de los cuales 20 millones es por *M. bovis* y cada año



aparecen 8 millones de casos nuevos (Montoro, 2004). Así, se estima que *M. bovis* es el responsable de aproximadamente un 3% de los casos de tuberculosis humana en el mundo (Mateos, 2000).

En el estado de Veracruz se carece de información relacionada con la posible contaminación de los quesos por este microorganismo, por lo que resulta importante saber si se puede identificar *M. bovis* a partir de quesos frescos que son expendidos en mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, así como sus factores de riesgos asociados.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Quesos en México**

En el país, se considera que la elaboración de este tipo de productos data de la época de la colonia, desde que los españoles introdujeron al ganado y con ello el desarrollo de la ganadería; no obstante, se carece de documentos escritos que avalen esta hipótesis, debido a que la principal forma de transmisión de este conocimiento es verbal y generacional por tradición. En la actualidad, para su elaboración se emplean procedimientos técnicos especializados y con alguna influencia extranjera; como sucede con el queso tipo Chihuahua, Oaxaca y el Asadero (PROFECO, 2000).

No se tiene un registro exacto de la diversidad de quesos que existen en el país, pero se consideran entre 20 y 35 diferentes variedades, que en su mayoría se elaboran a partir de leche sin pasteurizar. A nivel nacional, y en particular en las zonas del trópico húmedo y seco, donde se localizan los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz, debido a las tradiciones, predomina la elaboración de quesos con leche cruda o bronca y comparten características en el contenido de sal y la acidez de sus pastas (Juárez, 2008).

De acuerdo con Santos (2006) y Juárez (2008), los quesos mexicanos se clasifican en tres categorías: a) por su tipo de pasta, en hilada (Oaxaca, Asadero), rallable (Añejo, Cotija), untable (Doble crema) y tajable (Chihuahua, Manchego); b) por la consistencia de la pasta, en blanda (Doble crema), semidura (Manchego, Chihuahua) y dura (Añejo y Cotija) y c) por grado de maduración, en fresco (Panela, Ranchero, Crema), medianamente maduros (Manchego, Chihuahua) y fuertemente maduros (Añejo, Cotija).

### **1.2 Elaboración de quesos**

El proceso de elaboración de quesos consta de cuatro pasos esenciales: la coagulación de la leche, la deshidratación del cuajo, el salado y la maduración; para esta última etapa, se requiere de un lapso de tiempo que puede variar de días a meses, pero siempre bajo un control estricto del ambiente. Según las condiciones necesarias durante su elaboración este último proceso, dará al queso

características organolépticas particulares tales como olor, sabor, color y textura (Chamorro y Losada, 2002; Santos, 2006).

### **1.3 Queso fresco**

En la actualidad la FAO/OMS, define al queso como el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación del suero de la leche, nata o leche parcialmente desnatada (Vargas *et al.*, 2008).

Los quesos frescos contiene una alta proporción de humedad (60 a 80%), en comparación con otras variedades; presentan un aroma característico, sabor suave, brindan un aporte nutrimental por su contenido de calcio, vitamina A y proteínas; sin embargo, su vida de anaquel es corta (Santos, 2006).

En el país se han identificado un gran número de pequeñas empresas cuyos procesos de elaboración de quesos son artesanales; sin embargo, la mayor producción está dada por las grandes empresas de marcas reconocidas, quienes contribuyen con más del 60% del total de la producción anual en el país. Para el año 2009, se obtuvo una producción total nacional de 3,585 toneladas de quesos frescos (INEGI, 2010).

El proceso de elaboración del queso en México está sujeto a normatividad sanitaria, para evitar su manufactura a partir de leche sin pasteurizar; no obstante, durante su procesamiento no se cumple con las normas establecidas, entre las que se encuentra la NOM-121-SSA1-1994, que establece las especificaciones sanitarias y microbiológicas para la elaboración de quesos frescos, maduros y procesados con la finalidad de prevenir infecciones alimentarias. La norma de referencia es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional, así que todas aquellas personas físicas o morales que se dediquen al proceso o importación de este alimento, deberán observar lo referente a lo que establece en relación al número máximo de bacterias que se pueden determinar en el producto y las que no deben ser identificadas (SSA, 1994b; Vargas *et al.*, 2008).

A pesar de la normatividad sanitaria existente en el país para el control de la inocuidad durante la elaboración del queso, la práctica cotidiana de manufactura del mismo con leche cruda, se debe a la idea arraigada de que los quesos fabricados a partir de leche pasteurizada, cambian el sabor característico y la

textura del producto; para demostrarlo, en España se realizó un estudio en el cual se determinó que los cambios de sabor se dan por la presencia de bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Enterococcus*, presentes en quesos no pasteurizados (González *et al.*, 2004).

#### **1.4 Inocuidad alimentaria**

La inocuidad alimentaria es un proceso que asegura la calidad en la producción y elaboración de los productos alimentarios, pues garantiza la obtención de alimentos sanos, nutritivos y libres de peligros para el consumo de la población. La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que junto con las nutricionales, las organolépticas, y las comerciales componen la calidad de los alimentos (Vásquez, 2003; Sóstenes y Martínez, 2006; FAO, 2009).

El objetivo primordial del sector alimentario debe de ser proporcionar alimentos seguros y el de las autoridades de salud pública y de sanidad animal, velar por que esto sea así, pues la seguridad es una propiedad del alimento más que otras como lo son aspecto, sabor, precio o incluso las características nutritivas, no es negociable por el consumidor (Vásquez, 2003).

La política alimentaria debe basarse en las normas rigurosas de seguridad alimentaria que sirvan para proteger y fomentar la salud de los consumidores y tener presente que la producción y el consumo de alimentos, no solo tiene repercusiones económicas, si no también afecta el bienestar de la población y la salud pública. La preservación de alimentos inocuos implica la adopción de tecnología y métodos que permitan identificar y evaluar los potenciales peligros de contaminación de los alimentos en toda la cadena de producción, así como la posibilidad de medir el impacto que una enfermedad transmitida por un alimento contaminado puede causar a la salud pública dentro de las comunidades (Sóstenes y Martínez, 2006).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) promueve y pone a disposición de los usuarios, guías tecnológicas prácticas como las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Estas guías proporcionan los conocimientos técnicos básicos que se deben adoptar y aplicar en todas las fases de manufactura de alimentos, desde la adquisición de materias primas, hasta la producción,

distribución, venta y consumo del producto para tener un mejor control en la higiene y sanidad durante los diversos procesos aplicados a los alimentos. Además, permiten que se lleve a cabo la identificación de los puntos críticos necesarios para eliminar los riesgos a la salud y obtener alimentos de calidad e inocuos que garanticen su consumo (Vásquez, 2003; FAO 2009).

### **1.5 Micobacterias en leche y quesos.**

En el sur de Estados Unidos de América han encontrado que la mayor parte de los casos de tuberculosis por *M. bovis* ocurre en personas de origen hispano, sobre todo de procedencia mexicana y señalan el contacto con explotaciones animales y la ingestión de leche cruda y queso fresco como los factores causantes (Dankner *et al.*, 1993).

En Argentina se realizó un trabajo donde se analizaron 70 muestras de leche fluida comercial sometidas por la industria a distintos tratamientos térmicos. Sobre el total de las muestras analizadas, se logró el aislamiento de dos cepas de *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) (2,86%) confirmadas por PCR (Moreira *et al.*, 1999; Cirone, 2004).

Estudios realizados sobre la supervivencia de Map en productos lácteos indican que este patógeno es capaz de sobrevivir la pasteurización comercial. En 7 países europeos fueron analizadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) muestras de leche en polvo, de las cuales 49% resultaron positivas, a pesar de que Map sólo fue cultivado en una de las muestras (Hruska *et al.*, 2005).

En Grecia y la República Checa se estudió la presencia de Map en distintos tipos de quesos comerciales, se encontraron 31.7% y 3.6% de las muestras positivas por PCR y cultivo, respectivamente (Ikonomopoulos *et al.*, 2005).

En California, Estados Unidos se realizó un estudio donde se analizaron quesos frescos de origen mexicano, se logró aislar *Mycobacterium spp.* del 4.9% de 203 quesos analizados mediante bacteriología confirmadas por PCR (Harris *et al.*, 2007).

## 1.6 Generalidades de las micobacterias

Las micobacterias pertenecen al género *Mycobacterium* que es el único que pertenece a la familia *Mycobacteriaceae* dentro del orden de los *Actynomycetales*; característica que es debida a la composición de la pared celular que se encuentra formada por peptidoglucanos con ácido diaminopimélico, arabinosa y galactosa. Además, contienen una elevada proporción de lípidos o ceras (ácido micólico, fosfolípidos) que les confieren la patogenicidad, la capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles e interviene en la respuesta inmunitaria a la infección. Son bacilos cortos, con una curvatura ligera y delgados (0.2- 0.3 x 1.0-4.0 micras), aunque *M. bovis* es más corto (Biberstein y Chung, 1994; Farga, 2004; Quinn y Markey, 2005). Son aerobios, razón por la que su metabolismo y crecimiento es muy diferente según la cantidad de oxígeno del órgano en que anidan, carecen de esporas, flagelos, fimbrias y cápsulas. (Nicolet, 1986; Scanlan, 1991).

Según la clasificación de Runyon *et al.* (1974), *M. bovis* se encuentra dentro del grupo III que corresponde a las micobacterias no cromógenas y de crecimiento lento; necesita de una incubación de 80 a 90 días para producir colonias visibles; además, son resistentes a la desecación, los ácidos y álcalis, son sensibles a la luz solar directa, luz UV, temperatura superior a 70 °C y a los desinfectantes orgánicos como fenol y cresoles. En el género *Mycobacterium* destacan agentes de enfermedades zoonóticas como la tuberculosis por *M. bovis* y paratuberculosis por *M. avium* subespecie *paratuberculosis* en animales y, agentes específicos de humanos como el de la tuberculosis por *M. tuberculosis* y el de la lepra por *M. leprae*. El complejo tuberculosis comprende a *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae* y *M. canettii*, todas estas micobacterias son las mas patógenas para los humanos (Vadillo *et al.*, 2002).

## 1.7 Patogenia de *Mycobacterium*

Las micobacterias se comportan como patógenos facultativos. En la respuesta inmune intervienen dos componentes, uno dado por los factores de virulencia asociados a la pared que permiten la resistencia a la fagocitosis y otro factor, el inmunopatológico que consiste en la imposibilidad de eliminar a los patógenos del interior de los macrófagos, lo que determina la reacción de hipersensibilidad retardada. A consecuencia de ello, se produce la inflamación granulomatosa, la que puede difundirse a otros órganos (Scanlan, 1991; Jubb *et al.*, 1993).

El agente al ingresar, por vía respiratoria o digestiva, se replica en el punto de entrada y produce una respuesta inflamatoria conocida como lesión primaria, luego se forma el foco nodular en los ganglios linfáticos regionales. En el órgano donde el bacilo causa la primera reacción inflamatoria, el foco linfoide más el foco primario forman el complejo primario. Estas lesiones pueden progresar o permanecer latentes, en dependencia de la relación entre el agente infeccioso y el hospedero, que podría dar origen a una generalización precoz si disminuye la resistencia del hospedero, difundiéndose a otros órganos por vía linfohematógena (riñones, hígado, bazo y en sus ganglios linfáticos correspondientes); así, la generalización puede dar lugar a lo que se conoce como tuberculosis miliar aguda (Chuaqui *et al.*, 1996; Acha y Szyfres, 2001).

La principal fuente de infección de la tuberculosis la constituyen los enfermos con tuberculosis pulmonar abierta. Las cavernas pulmonares se establecen cuando los focos de neumonía caseosa desarrollan un gran tamaño, alrededor de este foco se produce una reacción inflamatoria y el infiltrado caseoso se reblandece, abriéndose a uno o varios bronquiólos que es lo que constituye la llamada caverna, lo que facilita la diseminación de la infección (Chuaqui *et al.*, 1996; Farga, 2004).

El principal mecanismo de defensa del hospedador se desarrolla con la inmunidad celular (Scanlan, 1991; Jubb *et al.*, 1993; Retamal, 2000), proceso en el que participan los macrófagos, linfocitos T cooperadores (CD4+) de tipo 1 (Th1), células asesinas naturales (K) y los linfocitos T citotóxicos (CD8+).

El curso de la tuberculosis por lo general es crónico y se limita al pulmón; en algunos animales puede permanecer inaparente por bastante tiempo e incluso pasar toda su vida útil sin sintomatología evidente, pero constituyen una amenaza para el resto del hato (Acha y Szyfres, 2001). Los signos clínicos no son específicamente distintivos de esta enfermedad y pueden incluir debilidad, anorexia, extenuación, disnea, linfadenomegalia y tos, en particular para los casos de tuberculosis avanzada (OIE, 2008).

## **1.8 Tuberculosis bovina**

La tuberculosis bovina es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por la formación de granulomas nodulares conocidos como tubérculos (OIE, 2008). Por

otra parte, la tuberculosis bovina provoca grandes pérdidas económicas por muerte de animales, decomisos, descenso en la productividad y valoración de la leche; además, limita el comercio internacional de productos pecuarios (Acha y Szyfres, 2001; Abalos y Retamal, 2004; Fritsche *et al.*, 2004).

La prevalencia en vacas lecheras es más alta que en las de carne, debido a su permanencia más prolongada y al hacinamiento por estabulación y ordeña. El sistema respiratorio es la principal ruta por la cual entra y se disemina la infección (Abalos y Retamal, 2004), sólo el 5% desarrolla lesiones en el útero y 1 a 2% mastitis tuberculosa que constituye, de igual manera, un riesgo para los terneros. *M. bovis* es excretado por las vías respiratorias en forma de esputo y aerosoles, y además por heces, leche, orina y semen (Vadillo *et al.*, 2002). El agente etiológico principal en los bovinos es *M. bovis*, pero pueden enfermar por *M. avium* o *M. tuberculosis* (Biberstein y Chung, 1994; Acha y Szyfres, 2001).

*M. bovis* tiene muchos hospederos, causa la enfermedad en la mayoría de los mamíferos entre los que se incluye el hombre y, se encuentra distribuido de forma amplia en la fauna silvestre, que representa su principal reservorio; además, constituye un factor difícil de controlar para poder erradicar la tuberculosis bovina (Cosivi *et al.*, 1998; Cornejo *et al.*, 1998; Abalos y Retamal, 2004).

En Texas y Nuevo México la presencia de tuberculosis en fauna silvestre cautiva y de vida libre, en especial los ciervos y bisontes, ha provocado la re-emergencia de la tuberculosis bovina, ya que puede retornar al ganado, debido a que comparten praderas y el ganado invade territorios silvestres (Abalos y Retamal, 2004).

En México se cuenta con la NOM-031-ZOO-1995 "Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina", en donde se establece que los animales productores de leche positivos a tuberculosis se deben de mantener en unidades de producción controlada, con la finalidad de aprovechar su producción láctea antes del sacrificio. La leche de estos animales deberá ser destinada exclusivamente para pasteurización (SAGARPA, 1995).

La Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina reconoce tres fases de campaña: la de control corresponde a demarcaciones geográficas o zonas (municipio, estado o región) con prevalencia mayor al 2% o distribución desconocida; la de erradicación, es para zonas con prevalencia menor al 2% y con distribución conocida, y la libre para zonas en las que no se haya identificado ningún caso de tuberculosis bovina en los últimos 5 años. Así, dentro del territorio



nacional, los estados tienen una situación actual que los ubica en zonas de control y erradicación y donde el estado de Veracruz se encuentra en la segunda. Por otra parte y adicional a la clasificación que otorga la NOM-031-ZOO-1995, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA), clasifica a los estados o regiones de México para la exportación de bovinos hacia EUA en acreditado modificado avanzado, acreditado modificado, acreditado precautorio y no acreditado, en dependencia de criterios como prevalencia, seguimiento epidemiológico a casos de tuberculosis bovina, inspección en rastros, aplicación de medidas cuarentenarias y movilización animal, entre otros. Dentro de esa clasificación la zona centro y norte del estado de Veracruz se encuentran la categoría de acreditado modificado, mientras que la zona sur de la entidad está en la de no acreditado (SAGARPA, 1995).

### **1.9 Tuberculosis humana por *Mycobacterium bovis***

Existen antecedentes históricos de la infección por *M. bovis* en el hombre, pues el primer aislamiento bacteriológico confirmado de *M. bovis* en éste se realizó en 1904 por Lignerres quien lo aisló de un caso de tuberculosis intestinal en niños. Griffith, entre los años 1901-1932, determina que en Inglaterra y Gales la mayor causa de tuberculosis en niños se debía al *M. bovis*, con 126 casos de linfadenitis cervical, 553 de tuberculosis ósea y articular y, 265 casos meníngeos. En Canadá se determinó en 1938 que 9% de los casos de tuberculosis extrapulmonares eran debidos a *M. bovis*. En 1940 en Buenos Aires Argentina se encontraron en 60 trabajadores de entre mataderos y frigoríficos que estaban enfermos de tuberculosis, que 4 (6,6%) de ellos se debía a *M. bovis* y se relacionaba con el consumo de lácteos contaminados. En Brasil en 1941 se aisló *M. bovis* del 13.2% de niños con meningitis tuberculosa (García y Szyfres, 1963).

En 1977 en el sur-este de Inglaterra, *M. bovis* era la causa de 1.2% (20 de 1632) de los casos de tuberculosis en humanos, esto disminuyó a 0.48% en 1992, pero en contraste con la enfermedad que, por lo general era extrapulmonar, vista en el pasado, la mitad presentaba la forma pulmonar; además, la mayoría de los pacientes había nacido antes del programa de erradicación de tuberculosis bovina en 1960, o podría ser producto de una reactivación endógena (Daborn y Grange, 1993; Grange, 2001).

Según la OMS para 1993 Brasil reportaba cada año 4,000 casos debidos a *M. bovis* (5%) de un total de 80,000 casos de tuberculosis humana (Fujimura *et al.*, 2003).

En Argentina, entre todos los casos pulmonares de tuberculosis, se presentan un 1.7% de casos por *M. bovis* (Palmero, 2004; Valerga *et al.*, 2005). En Australia, entre 1970 y 1994 se notificaron 236 casos de tuberculosis debida a *M. bovis* con un promedio anual del 1.4%, presentándose la forma pulmonar en el 71.6% de los pacientes y la extrapulmonar en 25.7% (Cousins y Dawson, 1999).

En América Latina, los casos por *M. bovis* corresponden en un 2% a casos pulmonares y 8% a extrapulmonares, pero son mas frecuentes en regiones lecheras (Cosivi *et al.*, 1998; Grange, 2001). Esto es debido a la falta de leyes de pasteurización y a que 24% del ganado bovino de Latinoamérica no es controlado contra la tuberculosis. Así, la población rural presenta un alto riesgo por el hábito de consumir leche cruda y subproductos lácteos (cremas, mantequillas, quesos) elaborados con leche sin pasteurizar o al menos hervir (Acha y Szyfres, 2001). En Argentina, se aisló la bacteria del 8% en 85 enfermos que procedían de áreas rurales, mientras que en la capital hubo un solo caso (1.8%) de *M. bovis* entre 55 enfermos (Gil y Samartino, 2000).

Según las características clínicas, radiológicas y patológicas, la tuberculosis debida a *M. bovis* es indistinguible de la causada por *M. tuberculosis* (Abalos y Retamal, 2004). En la antigüedad, la forma de presentación más común era la extrapulmonar, debida a la ingestión de leche o productos lácteos contaminados. Las presentaciones más comunes son la adenitis cervical, tuberculosis ósea y articular, genitourinaria y tuberculosis meníngea (Grange, 2001; Fujimura *et al.*, 2003). Dankner y Davis (2000) realizaron un estudio en niños residentes en la frontera de Estados Unidos y México entre 1980 y 1997 que determinó que entre un total de 180 casos positivos a tuberculosis, el 33.9% resultó positivo a *M. bovis* y el 66.1% restante a *M. tuberculosis*. Además, el 55.2% de los positivos a *M. bovis* presentaban tuberculosis extrapulmonar (Rojas *et al.*, 2006).

Los síntomas de la enfermedad no son específicos, pues dependen del lugar del cuerpo que se encuentre afectado. Cuando es pulmonar, pueden incluir tos por más de tres semanas, producción de esputo, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna, pérdida del apetito, dolor de pecho y ahogo. La reacción positiva en el examen para determinar tuberculosis, toma entre 2 a 10 semanas después del

contacto con la tuberculosis y no diferencia si es reciente o corresponde al pasado (Harries *et al.*, 1996).

En México, la información epidemiológica sobre el impacto de la infección por *M. bovis* en humanos es escasa, ya que el diagnóstico suele realizarse sólo por baciloscopía, pero sin llegar a definirse la especie de micobacteria involucrada, pues debe iniciarse el tratamiento lo antes posible (Vuorinen *et al.*, 1995).

Por lo anterior, se debe recurrir al diagnóstico bacteriológico con el uso del aislamiento e identificación por pruebas bioquímicas y técnicas moleculares para lograr el diagnóstico diferencial, ya que de no realizarse la tipificación bacteriana, puede haber errores en el tratamiento de la tuberculosis. La pirazinamida o isoniazida que es la droga de elección para el uso primario en casos de *M. tuberculosis*, no puede ser empleada en personas infectadas con *M. bovis* por ser resistente al fármaco (Guerrero *et al.*, 1997; Grange, 2001). Además, los patrones de resistencia presentan un aumento cada vez mayor, pues se han encontrado cepas de *M. bovis* resistentes a isoniacida y otras resistentes a múltiples fármacos, esto deja en evidencia la importancia de la transmisión y de realizar una evaluación de resistencia, antes de establecer el tratamiento (Montoro, 2004).

En México se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SSA2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. Tiene por objeto uniformar los criterios que permitan establecer los procedimientos y lineamientos para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud y es de observancia obligatoria para todo el personal de salud, público, social y privado en las unidades de atención médica del Sistema Nacional de Salud (SSA, 1993).

### **1.10 Factores de riesgo para las personas**

La intervención de los animales es fundamental en el contagio del hombre; sin embargo, la vía de infección en el hombre depende de los hábitos alimentarios y de la ocupación profesional. De este modo, si la prevalencia de la tuberculosis en el ganado bovino de la zona es elevada, la infección humana persiste (Toledo *et al.*, 1999).

La gran concentración urbana, la pobreza, el escaso acceso a planes de salud y la mala información y educación, así como la drogadicción, se consideran también factores de riesgo y han ayudado a mantener un reservorio de personas infectadas (Gil y Samartino, 2000).

Constituyen un alto riesgo entre la población rural, tener vacas para la alimentación familiar y la comercialización de leche ordeñada sin evaluación sanitaria. Los hábitos culturales que son difíciles de cambiar, contribuyen a difundir la enfermedad. Por ello, desde hace años se insiste en que la leche debe ser consumida al menos hervida; sin embargo, aún se cree que sin pasteurizar tiene mayor contenido nutricional (Cosivi *et al.*, 1998; Gil y Samartino 2000; Fujimura *et al.*, 2003; Abalos y Retamal, 2004).

Con respecto al grupo de riesgo ocupacional por el contacto con bovinos infectados o sus desechos, las personas con ocupaciones agropecuarias, debido al contacto con aerosoles de animales enfermos, desarrollan en su mayoría la forma pulmonar de la enfermedad. En África, 65% de la población desempeña actividades relacionadas con la ganadería, esta proporción alcanza al 70% de la población en Asia y en Latinoamérica, al 26%. Esto significa que es una proporción significativa la que podría estar en riesgo (Cosivi *et al.*, 1998). Dentro de ese grupo se consideran también a obreros de rastros, médicos veterinarios y trabajadores de frigoríficos (García y Szyfres, 1963; Rasolofo-Razanamparany *et al.*, 1999).

Las personas infectadas con el Virus de Inmunodeficiencia Adquirida (VIH) tienen una mayor susceptibilidad frente a *M. bovis*, y a un aumento en la transmisión de éste entre humanos (Cook *et al.*, 1996; Grange, 2001; Montoro, 2004). Los pacientes con VIH y tuberculosis en el mundo son más de 9.4 millones, en particular adultos-jóvenes, según datos de la OMS (Gil y Samartino, 2000). Entre personas sanas el 10% desarrolla tuberculosis, pero aumenta más de 30% en personas con VIH (Daborn y Grange, 1993).

Una de las causas de los crecientes rebrotes mundiales de tuberculosis, es la aparición de cepas de *M. bovis* resistentes a múltiples fármacos (MDR por sus siglas en inglés). Los casos de tuberculosis aumentan 3% anual, debido a las MDR. Así, 50 millones de personas están en la actualidad, infectadas con cepas MDR y cada año se registran 300,000 nuevos casos (Montoro, 2004) principalmente debido a repetidos tratamientos inadecuados (Palmero *et al.*, 2003). En 72 países se ha demostrado que las MDR son el mayor impedimento para el control de la

tuberculosis en el mundo (Guerrero *et al.*, 1997; Grange, 2001; Raviglione y Pio, 2002; Palmero *et al.*, 2003). De acuerdo con Palmero *et al.* (2003) y Montoro (2004), 79% de los casos con MDR son resistentes a tres de los cinco fármacos principales que se utilizan en la actualidad (los de primera línea son isoniacida, rifampicina, estreptomina, etambutol y pirazinamida). Un ejemplo de que la tipificación es necesaria se observó en Madagascar, ya que un paciente con tuberculosis que estaba infectado con una cepa de *M. bovis* MDR, durante más de 5 años se le aplicó tratamiento equivocado, porque se pensó que se trataba de *M. tuberculosis* (Ramarokoto *et al.*, 2003).

### **1.11 Micobacterias atípicas**

Las micobacterias atípicas también llamadas ambientales o micobacterias no tuberculosas, comprenden una amplia variedad de microorganismos (saprófitos, patógenos y oportunistas) que se distribuyen en la naturaleza. Dentro de este grupo están comprendidas todas las micobacterias con excepción de las del complejo *M. tuberculosis* y *M. leprae*. En la actualidad se conocen más de 96 especies atípicas, de las cuales casi la mitad se han aislado en procesos infecciosos humanos y, dentro de este grupo, destacan las del complejo *M. avium*, responsables de infecciones diseminadas en personas y animales (Castro *et al.*, 2007).

Las infecciones producidas por micobacterias atípicas han tenido un importante incremento en los últimos años debido a su asociación con pacientes que padecen Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) y los que reciben terapias inmunosupresoras, en especial aquéllos que han recibido trasplantes (Hale *et al.*, 2001; Palomino *et al.*, 2002). También están relacionadas con infecciones postquirúrgicas de procedimientos estéticos, aplicaciones de catéteres, enfermedades cutáneas diseminadas, pulmonares y del sistema nervioso central (Castro *et al.*, 2007).

Estas micobacterias pueden encontrarse en el agua de ríos, lagos, pantanos, piscinas, acuarios, grifos, desagües e incluso máquinas de hielo o en el agua de uso doméstico. También están presentes en el suelo, la vegetación, así como en algunos vertebrados de sangre fría como anfibios, reptiles y peces o de sangre caliente, como mamíferos (bovinos, porcinos y monos) y aves. Además, pueden

habitar en superficies corporales y secreciones sin causar enfermedad (García *et al.*, 2005).

Las especies de micobacterias atípicas que se aíslan con más frecuencia son *M. avium-intracellulare*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. gordonae* y *M. simiae* (Wong *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Yzquierdo *et al.*, 2007). Por ello se estima que entre 10 y 30% de las micobacterias que son aisladas en laboratorios clínicos, corresponden a micobacterias atípicas y el resto al complejo *M. tuberculosis* (Arráyala *et al.*, 2006).

#### **1.11.1 *Mycobacterium fortuitum***

*M. fortuitum* es una micobacteria ambiental, no cromógena y de rápido crecimiento. En un principio se le denominó *Mycobacterium ranae* al aislarse por primera vez en 1905 de ranas; después en 1938, se le dio el nombre actual porque se aisló de abscesos subcutáneos provocados por la inyección de vitaminas (Leão *et al.*, 2005). Es una especie que se ha aislado de agua potable, sistemas de distribución de agua y de una gran variedad de suelos en todo el mundo. En el hombre con frecuencia se le asocia con infecciones cutáneas, post operatorias en especial cardiacas, de heridas quirúrgicas y traumáticas, osteomielitis, celulitis y por la aplicación de catéteres intravasculares. Las infecciones pulmonares y diseminadas son menos frecuentes (Leão *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2005).

#### **1.12 Diagnóstico de la tuberculosis**

Los métodos diagnósticos se pueden clasificar como directos e indirectos. En los primeros, se identifica la presencia del agente en el hospedero y, en los segundos, la respuesta del hospedero al agente, ya sea de tipo celular o humoral (OIE, 2008).

### **1.12.1 Métodos de diagnóstico indirectos**

#### **1.12.1.1 Prueba de tuberculina**

El antígeno de tuberculina procede de un derivado proteico purificado (PPD) que se obtiene de la cepa AN5 de *M. bovis* (Adams, 2001; Zárraga y León, 2003). La prueba se fundamenta en la respuesta de hipersensibilidad tardía del animal a la inyección intradérmica de la tuberculina, seguida por la presencia de inflamación en el sitio de inoculación a las 72 horas después de su inoculación intradérmica (Díaz *et al.*, 2003). La prueba de tuberculina ha probado ser la herramienta principal para la identificación de la tuberculosis bovina en todo el mundo; por ello, para lograr el saneamiento, la identificación de animales reactivos, debe ir seguida por su sacrificio (Corner, 1994). En México la prueba de tuberculina es la oficial en las campañas de erradicación para identificación en el campo de animales infectados (SAGARPA, 1995).

Existen otras pruebas indirectas, como la de liberación de gamma interferón y la prueba de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA PPD por sus siglas en inglés), que miden la respuesta de tipo humoral porque identifican la presencia de anticuerpos resultantes del enfrentamiento con la micobacteria (OIE, 2008).

### **1.12.2 Métodos de diagnóstico directos**

Los métodos de diagnóstico directos se clasifican en diagnóstico histopatológico y bacteriológico.

#### **1.12.2.1 Diagnóstico histopatológico**

El objetivo de la prueba es realizar el diagnóstico diferencial de la tuberculosis bovina en lesiones granulomatosas presentes en nódulos linfáticos y otros órganos. Durante el estudio postmortem, se identifican con tinciones de fucsina o auramina, los organismos ácido alcohol resistentes presentes en las lesiones obtenidas de los animales que resultaron reactivos a las pruebas de tuberculina o de aquéllos que durante la matanza regular, mostraron lesiones compatibles con tuberculosis; así como también, de los cortes histológicos de los órganos seleccionados en ambos casos (Adams, 2001).

Las muestras de animales asegurados en la línea de inspección de carnes sospechosos y/o reactores a la prueba de tuberculina, provienen por lo general de nódulos linfáticos traqueobronquiales, mediastínicos, medial retrofaríngeo, mandibulares, parotídeos, hepáticos y mesentéricos; y en algunos casos, de pulmón, hígado, bazo y riñón que presentan lesiones sugestivas. En esta prueba se lleva a cabo el estudio histológico de las lesiones compatibles con tuberculosis y las pruebas confirmatorias mediante coloración de hematoxilina-eosina contrastada, Ziehl Neelsen y/o nueva fucsina, como lo marca la NOM-031-ZOO-1995 (SAGARPA, 1995).

### **1.12.2.2 Diagnóstico bacteriológico**

El diagnóstico bacteriológico se clasifica en diagnóstico directo y mediante cultivo.

#### **1.12.2.2.1 Directo**

Las micobacterias son microorganismos difíciles de teñir con los colorantes básicos habituales. Esto se debe al alto contenido de lípidos de su pared celular, en especial ácidos grasos de cadena larga (ácidos micólicos). Para lograr la penetración del colorante primario al interior de la micobacteria se debe recurrir al calor o a determinados detergentes según el método utilizado. Una vez dentro, el colorante no podrá ser extraído tras la exposición al alcohol-ácido o ácidos minerales. Esta propiedad se denomina ácido-alcohol resistencia (AAR) y es útil para la visualización de este grupo específico de bacterias (Fernández *et al.*, 2005). Se desconoce la naturaleza exacta del mecanismo de AAR, aunque se piensa que el fenol permite la penetración del colorante, que se ve facilitada por el efecto del calor. Además, las micobacterias son capaces de formar complejos estables con ciertos colorantes arilmetanos como la fucsina o la auramina O (Koneman *et al.*, 1999).

Los métodos más utilizados para determinar la AAR de las micobacterias son a) las tinciones basadas en la utilización de fucsina fenicada (carbolfucsina) como colorante primario y que corresponden a la clásica de Ziehl-Neelsen o variantes como la de Kinyoun que emplea cuerpos tensoactivos sin necesidad de tener que calentar el colorante, pero en ambas, los microorganismos se tiñen de rojo sobre



un fondo azul o verde, en dependencia del contracolorante utilizado y b) los métodos que utilizan como colorante primario determinados fluorocromos (auramina O, auramina-rodamina) donde los microorganismos que son AAR, bajo la luz ultravioleta, aparecen fluorescentes de color amarillo o naranja en dependencia del filtro empleado (Alonso *et al.*, 1996). La diferencia básica entre ambos métodos, radica en el aumento microscópico requerido y, por tanto, el número de campos a visualizar. De esta forma, los métodos con carbolfucsina precisan el examen con un ocular-objetivo de inmersión de gran aumento (X 1,000). En cambio, las técnicas fluorescentes requieren menos esfuerzo al poder observar la preparación con un objetivo-ocular de menor aumento (X 250) sin pérdida de sensibilidad. Ello permite una mayor rapidez de lectura y un menor cansancio del técnico, por tanto, es el método de cribaje recomendado en los laboratorios con un gran número de muestras. No obstante, si persiste la menor duda con las técnicas fluorescentes, se deberá confirmar mediante una tinción de Ziehl-Neelsen (Alonso *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 2005).

#### **1.12.2.2.2 Cultivo**

El aislamiento de micobacterias a partir del cultivo de muestras clínicas es fundamental para el diagnóstico específico de las infecciones por estos microorganismos. El cultivo ha demostrado ser más sensible ( $10^1$ - $10^2$  bacterias viables/ml) que el examen microscópico. Además, el aislamiento del agente causal permite la identificación de la especie (Scanlan, 1991; Fernández *et al.*, 2005).

Las micobacterias suelen ser bastante exigentes y requieren medios ricos y frescos. Existen medios selectivos con diversos antibióticos para prevenir el crecimiento de la flora bacteriana o fúngica acompañante. Aunque los medios no selectivos no contienen antibióticos, poseen algunas sustancias inhibidoras para el control de bacterias contaminantes, como son los colorantes de anilina (verde de malaquita o cristal violeta). Su concentración suele ser crucial para mantener el equilibrio entre la recuperación micobacteriana deseada y la posible contaminación a partir de las muestras no estériles. Si la concentración es muy elevada puede llegar a afectar en forma seria, el crecimiento micobacteriano (Koneman *et al.*, 1999; OIE, 2008).

#### **1.12.2.2.2.1 Medios sólidos con huevo**

Son medios ricos que contienen huevo (entero o sólo yema), fécula de papa, sales, glicerol y un agente inhibidor como es el verde de malaquita. Las ventajas fundamentales radican en la buena recuperación de gran parte de las especies micobacterianas y su buena capacidad tanto, inhibidora de la flora contaminante, como tamponante que permite neutralizar múltiples productos tóxicos presentes en las muestras clínicas, así como algunos restos de diversos productos descontaminantes (Vadillo *et al.*, 2002). Además, poseen una vida media prolongada si se conservan a 2 a 8 °C (6 meses) y las pruebas fenotípicas de identificación que se realizan a partir de subcultivos que provienen de estos medios, son bastante fidedignas. Por otro lado, son medios difíciles de preparar, pues necesitan ser coagulados entre los 85 y 95 °C, lo que conlleva algunas variaciones de un lote a otro y puede influir en la concentración final de los antimicrobianos en las pruebas de sensibilidad *in vitro*; también presentan a veces, algunos problemas para distinguir entre los restos del inóculo y del crecimiento micobacteriano; por último, si llegan a contaminarse se afecta todo el medio ya que se puede llegar a licuar (Fernández *et al.*, 2005).

El medio más utilizado es el Löwenstein-Jensen, aunque existen otros en virtud de su mayor (Petraghani) o menor capacidad inhibitoria de la flora acompañante (Coletsos o American Thoracic Society), que depende tan sólo de la concentración de verde de malaquita (Payeur *et al.*, 1993; OIE, 2008).

#### **1.12.2.2.2.2 Medios sólidos con agar**

Estos medios sintéticos, tipo 7H10 y 7H11 de Middlebrook, son transparentes y permiten una identificación rápida del crecimiento micobacteriano (10-12 días) que puede distinguirse de los residuos de la muestra en la siembra. Además se pueden utilizar para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. La inclusión de un 2% de glicerol permite un mejor crecimiento del complejo *M. avium-intracellulare*. El medio 7H11 contiene un 0.1% de hidrolizado de caseína que favorece la recuperación de las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la isoniacida (Fernández *et al.*, 2005). Los principales inconvenientes residen en un precio superior a los medios con huevo, una vida media corta (1 mes en refrigeración de 2 a 8 °C) y una mayor tasa de contaminaciones al contener una concentración menor de verde de malaquita. El almacenaje es delicado, ya que un exceso de

temperatura o exposición a la luz puede deteriorar el medio y estimular la producción de formaldehído que es tóxico para las micobacterias (Koneman *et al.*, 1999).

### **1.13 Identificación de especie de *Mycobacterium***

La identificación de las micobacterias se realiza mediante la identificación fenotípica y pruebas bioquímicas (Koneman *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2005).

#### **1.13.1 Identificación fenotípica**

La identificación fenotípica se realiza mediante microscopía, por la velocidad de crecimiento, la producción de pigmento y la morfología de las colonias.

##### **1.13.1.1 Microscopía**

Una característica común de todo el género *Mycobacterium* es su ácido-alcohol resistencia. Este hecho es importante para confirmar que el crecimiento observado en el cultivo es una micobacteria o identificar una posible contaminación. Aunque otros organismos pueden exhibir alguna ácido-alcohol resistencia, por lo general es parcial a diferencia de las micobacterias que son capaces de resistir una decoloración fuerte. Además, dentro del género existen diferencias microscópicas que pueden orientar de forma presuntiva la identificación de alguna especie (Alonso *et al.*, 1996).

##### **1.13.1.2 Velocidad de crecimiento**

Esta propiedad permite obtener una división de las micobacterias en dos grandes grupos, las de crecimiento lento y las de rápido, pues se fundamenta en los días de incubación que un cultivo necesita para la visualización macroscópica de colonias en el medio; sin embargo, el punto crítico es la dilución del inóculo que se utiliza para el cultivo, pero en forma general, las micobacterias que tardan más de 7 días en evidenciar desarrollo en los distintos medios empleados, se catalogan como lentas y las que lo hacen en menos, rápidas. La clasificación es importante,

puesto que los planteamientos diagnósticos van a cambiar en dependencia de que el aislamiento pertenezca a un grupo u otro (Koneman *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2005).

#### **1.13.1.3 Producción de pigmento**

La capacidad de producir pigmentos carotenoides en relación con la exposición a la luz, permite otra clasificación más; así, las que se conocen como fotocromógenas son micobacterias que producen pigmento en presencia de la luz y escotocromógenas si lo producen en forma independiente; además estarían las que no producen pigmentos denominadas no cromógenas. Este aspecto permitió clasificar las micobacterias en los ya clásicos grupos de Runyon, respectivamente (Koneman *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2005).

#### **1.13.1.4 Morfología de las colonias**

La aparición de colonias rugosas no pigmentadas de crecimiento lento y aspecto de migas de pan suele ser característica de *M. tuberculosis*, mientras que las colonias pequeñas, lisas y no pigmentadas son características del complejo *M. avium*. En cambio las colonias grandes, lisas, mucosas, de crecimiento lento pero fotocromógenas serían más típicas de *M. kansasii* (Koneman *et al.*, 1999). Una aproximación distinta es la que estudia las características microscópicas de las colonias en medios con agar, donde se pueden observar las estructuras características de las cuerdas o cordones (propias de *M. tuberculosis*) incluso antes de que puedan identificarse colonias visibles de forma macroscópica (Fernández *et al.*, 2005).

#### **1.13.2 Pruebas bioquímicas**

El número de estas pruebas es muy amplio y ha dado lugar problemas de interpretación. Por ello, fueron propuestos algunos requisitos mínimos para la definición de especies de micobacterias de crecimiento lento (CUADRO 1); entre éstos se encuentra un número limitado de pruebas que, junto con las genéticas y moleculares, permitirían la caracterización de las distintas especies de los distintos grupos. Las pruebas son producción de catalasa, hidrólisis del Tween 80, ureasa,

producción de niacina, reducción de nitratos, actividad de las enzimas fosfatasa ácida, arilsulfatasa, pirazinamidasa, esterasa, resistencia a la isoniácida, hidroxilamina, NaCl, y crecimiento a 42 y 45 °C (Payeur *et al.*, 1993; OIE, 2008); sin embargo, la descripción de nuevas especies cuyos perfiles fenotípicos son parecidos con otras ya conocidas, ha limitado en forma notable la utilidad de estos esquemas como único medio de identificación de los aislamientos. Otros aspectos negativos de estas técnicas son la necesidad de grandes cantidades de bacterias para su realización (cultivos muy crecidos) y la lentitud en la obtención de resultados, en especial los negativos. No obstante, la realización de pruebas bioquímicas no es un hecho obsoleto en el laboratorio (Zárraga y León, 2003). Algunos esquemas comunes se han basado en la biología molecular, como es el caso de las sondas comerciales o de amplificación genética que identifican algunas especies, pero sólo a nivel de grupo o complejo, como es el caso del complejo *M. tuberculosis* (Durr *et al.*, 2000). La aplicación de algunas pruebas bioquímicas que muestran una relativa sencillez permitiría, en este caso, conseguir la identificación de especie. Además, otras ventajas de las pruebas bioquímicas son sencillas de realizar, económicas y no necesitan de un gran equipamiento (Fernández *et al.*, 2005).

**CUADRO 1.** Identificación fenotípica de las micobacterias de crecimiento lento más frecuentes.

Especie	N	N	A	Tw	U	Na	C	I	HID	O	P
	I	I	s	80	R	Cl	A	N	RO	L	Z
	A	T			E		T	H		E	A
<i>M. tuberculosis</i>	+	+	-	V	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. bovis</i>	-	-	-	V	+	-	-	-	-	-	-
<i>M. africanum</i>	V	V	-	V	+	-	-	-	-	-	V
<i>M. microti</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	V	+	+

NIA: Niacina; NIT: Nitrato; AS: Arilsulfatasa (3 días); Tw80: Tween 80; URE: Urea; NaCl: NaCl 5%; CAT: Catalasa; INH: Isoniacida 1-10 µg/ml; HIDRO: Hidroxilamina; OLE: Oleato; PZA: Pirazinamidasa; +: Positivo; -: Negativo; V: Variable (Payeur *et al.*, 1993).

### 1.14 Técnicas moleculares en el diagnóstico de micobacterias

Los últimos avances tecnológicos han propiciado la elaboración de nuevas técnicas *in vitro*, como las de diagnóstico por anticuerpos, por la inmunidad mediada por células o por reconocimiento de ácidos nucleicos, todos permiten diagnosticar la enfermedad con más rapidez que un cultivo bacteriológico (Adams, 2001).

El uso de la PCR se ha incrementado como una herramienta común para identificar microorganismos patógenos en muestras biológicas (Fiallo *et al.*, 1992; Canal, 2004). Esta técnica, está basada en la amplificación de ADN blanco a niveles identificables, tiene notables aplicaciones en el diagnóstico de las infecciones por micobacterias.

La introducción de la PCR y la hibridación de los ácidos nucleicos, redujeron el tiempo de identificación de la micobacteria y su uso elevó el nivel de determinación en muestras clínicas. Los métodos tienen el potencial de ser más rápidos, más seguros y la forma más eficiente para identificar a *M. bovis* (Cornejo *et al.*, 1998), Además a través de PCR, se resolvió el problema de diagnósticos negativos por falta de cantidad suficiente de células bacterianas o virales.

En pacientes humanos, la PCR ha sido evaluada en todo el mundo, para la identificación del complejo *M. tuberculosis* en muestras clínicas (en especial esputos); en épocas recientes, también se le comienza a usar para el diagnóstico de la tuberculosis en animales. Por ello, un número considerable de paquetes de diagnóstico (kits), se encuentran disponibles en el comercio y varios métodos estandarizados en laboratorios de investigación en universidades y de gobiernos interesados, se han evaluado para el diagnóstico del complejo *M. tuberculosis* en tejidos frescos y fijados. Aunque el número de especies que pueden ser identificadas por estos kits es limitado, los oligonucleótidos para el complejo *M. tuberculosis* son usados en forma amplia, tanto en medicina humana como veterinaria (De Luna y Sparangano, 2008).

En la actualidad, la PCR se utiliza como una técnica de rutina para identificar *M. bovis* y distinguirlo de *M. avium* en tejidos embebidos en parafina, fijados en formalina o tejidos frescos. Aunque, para obtener óptimos resultados, es recomendable utilizar tanto PCR como los métodos de aislamiento tradicionales (Miller *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2002). Debido al tiempo que consume el realizar

los métodos de aislamiento tradicionales, su uso va en declive y son reemplazados por métodos basados en la identificación de ADN (Hosek *et al.*, 2006).

#### **1.14.1 Diagnóstico de *Mycobacterium bovis* mediante PCR**

Existen pocos estudios sobre la epidemiología molecular de la tuberculosis bovina, lo que difiere a la situación de la tuberculosis humana, donde, gracias al uso de la secuencia de inserción IS6110 para analizar el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP's), se empieza a comprender la epidemiología y la evolución molecular del agente patógeno, por lo que ahora se recomienda que se aborde el problema de forma integral, donde se combinen estudios de epidemiología y biología molecular. Esto permitiría identificar con claridad los tipos bacterianos y determinar sus respectivas afinidades y relaciones, lo que sin duda facilitaría la adopción de decisiones relativas al control de la enfermedad (Durr *et al.*, 2000).

La carencia de un procedimiento de diagnóstico rápido y eficaz de *M. bovis*, hace que los programas de erradicación y control de la tuberculosis bovina sean muy difíciles y complicados, entre otras circunstancias, por la lentitud con que funcionan las pruebas tradicionales y porque la eliminación de esta bacteria es intermitente y está poco relacionada con el grado de lesiones presentes, lo que implica implementar un procedimiento que además de ser efectivo, sea rápido (Zárraga y León, 2003).

Aunque existan técnicas de identificación específicas de *M. bovis*, el procedimiento requiere la amplificación previa de un fragmento común a todas las micobacterias y luego, la identificación específica con el uso de sondas radioactivas o enzimas de restricción. Como consecuencia de la alta reactividad antigénica cruzada y la estrecha relación genómica entre las micobacterias, la identificación de una secuencia de una especie específica no es una tarea fácil. Un método diagnóstico específico basado en la amplificación de un fragmento genómico de *M. bovis* mediante la PCR, permite la identificación del bacilo de forma directa de muestras biológicas tales como leche, haciéndola una buena prueba para el diagnóstico rápido, sensible y específico (Durr *et al.*, 2000).

En el Noreste de México se ha evaluado la prueba de PCR a partir de muestras de nódulos linfáticos de animales positivos a la prueba de tuberculina y, los

resultados se compararon con las pruebas oficiales de laboratorio, histopatología y aislamiento bacteriológico, en los que se indica que el 100% de las pruebas positivas a éstas, lo fueron también para PCR (Morales *et al.*, 2005).

El uso del kit comercial Multiplex *Mycobacterium*® PCR de Biosonda, que utiliza el diseño del oligonucleótido RvD1, se considera apropiado para el diagnóstico de tuberculosis bovina ya que, la sensibilidad y especificidad reportada ofrece resultados de gran eficacia (Zárraga y León, 2003).



## **HIPÓTESIS**

La identificación de *Mycobacterium bovis* y la determinación de factores de riesgo asociados, es posible a partir de quesos frescos que se expenden en mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Identificar *Mycobacterium bovis* a partir de quesos frescos expendidos en mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, así como sus factores de riesgo asociados.

### **Objetivos Específicos**

- 1) Aislar *Mycobacterium spp* a partir de quesos frescos expendidos en mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río mediante el uso de diagnóstico bacteriológico convencional.
- 2) Identificar *Mycobacterium bovis* a partir de quesos frescos expendidos en mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, mediante el uso de pruebas bioquímicas y técnicas moleculares.
- 3) Identificar los establecimientos que expenden quesos frescos en mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río con presencia de *Mycobacterium bovis*, así como los factores de riesgo asociados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Localización

Los quesos empleados en esta investigación se colectaron de queserías ubicadas en los mercados con registro de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río y que corresponden a los mercados de Malibrán, Hidalgo, Zaragoza, Unidad Veracruzana y Abastos Boticaria.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Diagnóstico ubicada en la Posta Zootécnica Torreón del Molino de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana en la Ciudad de Veracruz y en el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz.

### 2.2 Diseño experimental y tamaño de muestra

El tipo de estudio fue epidemiológico transversal y para determinar el tamaño de muestra, se empleó el programa Win Episcopy 2.0 bajo la modalidad detectar enfermedad (Thrusfield *et al.*, 2001). Se consideró la prevalencia humana de tuberculosis causada por *Mycobacterium bovis*, estimada en 3% y 95% de confianza. Así el tamaño de muestra correspondió a 30 quesos que se colectaron de igual cantidad de establecimientos. El número total de quesos analizados fue de 60, ya que se trabajaron 30 muestras de la temporada de estiaje y otras 30 en la de lluvias. La fórmula que emplea el programa de referencia para calcular el tamaño de muestra es la señalada por Thrusfield (2005).

$$n = [ t * SD/L ]^2$$

Donde:

SD es el valor de la desviación estándar

T es el valor de la t de Student

L es el error absoluto aceptado

## **2.3 Recolección de Muestras**

Se colectaron muestras de quesos frescos elaborados de modo artesanal. Se realizaron dos muestreos uno en época de estiaje y otro en época de lluvias del año 2010. Las muestras de queso colectadas fueron de no más de 5 días de elaboración; se obtuvieron 250 g los cuales se guardaron en bolsa con cierre hermético (Ziplok®), a las que se colocó una etiqueta para identificar el sitio de compra, la fecha y la hora (SSA, 1994a). Para su conservación se guardaron en neveras con bolsas de refrigerantes comerciales y se trasladaron al laboratorio de microbiología donde se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su procesamiento.

## **2.4 Variables**

Durante los muestreos se realizó una encuesta a las personas encargadas de las queserías de donde se colectaron las muestras de quesos (ANEXO 1). Se obtuvieron datos como el lugar de procedencia, tiempo de vida en vitrina, tipo de almacenamiento, si pasteurizan la leche con la cual se elaboran los quesos y si compran o producen los quesos que venden.

## **2.5 Cepas de referencia**

Para el desarrollo de las pruebas diagnósticas de bacteriología y de la PCR se emplearon cepas de referencia de *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium paratuberculosis* y *M. fortuitum* proporcionadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz.

## **2.6 Procesamiento de las muestras**

### **2.6.1 Métodos bacteriológicos**

Para el diagnóstico bacteriológico se emplearon las técnicas establecidas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica (USDA) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Payeur *et al.*, 1993; OIE, 2008). Dentro de un gabinete de bioseguridad biológica de clase II, se colocó una

muestra de queso de 1 pulgada cúbica en un vaso de precipitado con 100 ml de hipoclorito de sodio al 1% y se dejó reposar durante 10 a 30 minutos, después se colocó la muestra en un mortero, se le añadieron 10 ml de caldo nutritivo con rojo fenol en concentración del 0.04 % y, con el pistilo se maceró hasta obtener una consistencia fina. Se añadieron 7 ml de la suspensión de la muestra macerada a un tubo de ensayo con cierre hermético de 20 x 125 mm que contenía 5 ml de hidróxido de sodio al 0.5 N, una parte de la suspensión macerada se colocó en un tubo de ensayo con cierre hermético que no contenía hidróxido de sodio. Esta suspensión se congeló a -20 °C para ser utilizada posteriormente. Después de 10 minutos de haber colocado la solución macerada en el tubo con hidróxido de sodio se neutralizó al añadir con pipeta Pasteur gotas de ácido clorhídrico 6 N hasta que la suspensión se tornó amarilla (10-15 gotas), después se le modificó el pH a 7 al añadir gotas de hidróxido de sodio 1 N hasta que la suspensión se tornó rosa. A continuación se centrifugó a 1,000 X g durante 20 minutos. Se procedió a remover la película con un hisopo de algodón estéril y se decantó alrededor del 90 % del sobrenadante, el sedimento se inoculó con un hisopo de algodón en los tubos con medios de cultivo.

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron los establecidos en la NOM-031-ZOO-1995 producidos por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) y que corresponden a Lowestein-Jensen, Stonebrink, Herrold's con yema de huevo y micobactina, de los cuales se inocularon 1, 2, 1 tubos de cada medio, respectivamente. Se incubaron a 37 °C con revisiones semanales durante un periodo de 8 semanas para la visualización de la presencia de colonias de micobacterias, de las cuales se realizó un frotis por la técnica de Ziehl-Neelsen. Las colonias aisladas y con reacción positiva a la tinción de Ziehl-Neelsen se sembraron para obtener un mejor crecimiento y se identificaron por las pruebas bioquímicas de Niacina, Nitrato, Tween 80, Urea, Catalasa y crecimiento a 42 y 45 °C (Payeur *et al.*, 1993).

### **2.6.2 Métodos moleculares**

La PCR se utilizó para la identificación de especie y se realizó a partir de las cepas aisladas por bacteriología, ya que los métodos bacteriológicos son la prueba de oro para identificación de *M. bovis* y son los que marca la NOM-031-ZOO-1995. Las técnicas de PCR que se realizaron son las descritas por Devallois *et al.* (1997) y Leão *et al.* (2005) que utiliza el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Veracruz.

### **2.6.2.1 Extracción del ADN**

El ADN se extrajo de acuerdo con la técnica descrita por Fernández *et al.* (2005). Primero, a partir de un medio sólido se tomó una colonia y se colocó en 200 µl del buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM; pH= 8) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Si el cultivo estaba en un medio líquido se centrifugaba 1 ml del medio en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml a 12000-13000 rpm durante 5 min. Después se resuspendía el sedimento en 200 µl del buffer TE. Se incubó a 85°C durante 30 min. Después se añadió 200 µl de cloroformo. Se centrifugó a 12000-13000 rpm durante 10-15 min. Se tomó de 100-150 µl del sobrenadante, se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml con tapón de rosca y se almacenó en congelación a -20 °C durante toda la noche.

### **2.6.2.2 Amplificación del ADN para el complejo *Mycobacterium tuberculosis*.**

Para la amplificación del ADN se utilizó la técnica descrita por Leão *et al.* (2005) y Fernández *et al.* (2005). El objetivo era amplificar un segmento de 123pb del fragmento de inserción IS6110, presente en todas micobacterias pertenecientes al complejo *M. tuberculosis*.

Se utilizaron los iniciadores o primers IS1 (5' CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG 3') y IS2 (5' CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG 3'). La mezcla de reacción contenía 0.5 µmol/µl de cada iniciador, 5 µl de la solución tampón de la reacción (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 1.5 µl de dNTP (10 mM), 2.5 U de *Taq* polimerasa, 5 µl de la muestra de ADN y H<sub>2</sub>O destilada estéril para un volumen final de 50 µl.

Se llevó al termociclador durante un periodo de 4 horas y 48 minutos con el siguiente programa, para la desnaturalización se realizó un ciclo durante 5 minutos a 95 °C, para la amplificación se realizaron 40 ciclos durante 2 minutos a 94 °C, 2 minutos a 60 °C y 2 minutos a 72 °C. Para la extensión final, se realizó un ciclo durante 7 minutos a 72°C.

### 2.6.2.3 Gel de agarosa

Los productos de amplificación se visualizaron en geles de agarosa al 2%, se utilizaron 100 ml TBE 1x (tris HCl 445mM, ácido bórico 445 mM y EDTA 10mM; pH 8.2), el cual se homogenizó y se calentó con 2 repeticiones de 20 y 40 segundos. Después se dejó enfriar y se vació en la cámara de electroforesis para que se enfriara y se solidificara. El depósito de la cámara se llenó de TBE 1x. Cada muestra se incorporó en un pozo de la cámara. Se colocó 10 µl de la muestra de ADN con 2µl de buffer de carga compuesto por azul de bromofenol 0.25% (p/v) y glicerol 30% (v/v), así como los 2 controles y el marcador. Se dejó durante 1 hora y media en la cámara para que corrieran las muestras. Después se sacó el gel, se enjuagó en Bromuro de Etidio y se observó en el transiluminador (Leão *et al.*, 2005).

### 2.6.2.4 Amplificación del ADN para micobacterias atípicas

Para la amplificación del ADN se utilizó la técnica de PCR-RFLP descrita por Telenti *et al.* (1993) y Devallois *et al.* (1997). El objetivo fue amplificar un segmento de 441pb del gen *hsp65*, presente en todas la especies del género *Mycobacterium*. Este producto de amplificación es esencial para la digestión enzimática, sin el cual no existen productos de digestión.

Se utilizaron los iniciadores o primers Tb11 (5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3') y Tb12 (5' CTTGTCGAACCGCATACCCT 3'). La mezcla de reacción contenía 25 pmol/µl de cada iniciador, 5 µl de la solución tampón de la reacción (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), 1.5 µl de dNTP (10 mM), 1.5 U de *Taq* polimerasa, 5 µl de la muestra de ADN y H<sub>2</sub>O destilada estéril para un volumen final de 50 µl.

Se llevó al termociclador durante un periodo de 2 horas y 28 minutos con el siguiente programa, para la desnaturalización se realizó un ciclo durante 5 minutos a 95 °C, para la amplificación se realizaron 45 ciclos durante 1 minutos a 94 °C, 1 minutos a 65 °C y 1 minutos a 72 °C. Para la extensión final, se realizó un ciclo durante 7 minutos a 72°C.

### **2.6.2.5 Digestión de las enzimas de restricción**

Antes de realizar la digestión con las enzimas de restricción se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis para observar que las muestras amplificaran un fragmento de 441 pb. Después se realizó la digestión con las enzimas de restricción BstE II y HAE III.

Se realizaron dos restricciones por cada amplificado. Para ello se mezclaron las enzimas por separado con 11.5 µl de agua destilada estéril, 2.5 µl del tampón de restricción 10X y 1 µl de la enzima. Para la suspensión de enzimas se utilizó tubos eppendorff de 1ml con la finalidad de obtener una menor superficie para aumentar la concentración de intercambio de calor en el proceso de incubación. La suspensión de enzimas contiene un volumen de 15µl para cada enzima y se le agregó 15 µl del producto de amplificación del PCR (144 pb). El volumen total de la reacción enzimática es de 25 µl para cada enzima, dicho volumen fue sometido a incubación. Para BstE II a una temperatura de 60°C y para HAE III a 37°C. El proceso de digestión se llevó a cabo durante 3 horas (Leão *et al.*, 2005).

Después de la digestión se realizó el análisis de los fragmentos de restricción mediante una electroforesis en gel de agarosa al 3 %. Posteriormente, se procedió a la identificación de especie de la cepa analizada, comparando los patrones de RPC-RFLP con la base de datos, de acceso libre, PRASITE del Instituto Pasteur de Paris, Francia (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

### **2.7 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se almacenaron en una hoja de cálculo Excel, los resultados se analizaron para significancia mediante el análisis de datos categóricos  $\chi^2$  y la asociación por Odds Ratio (OR) (Thrusfield, 2005).



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Aislamiento e identificación microbiológica

De las muestras de queso colectadas se logró aislar una cepa de *Mycobacterium* spp. 1/60 (1.67%; IC<sub>95%</sub>: 0.09-10.14), colectada en la época de estiaje del mercado Abastos Boticaria y procedente del municipio de Alvarado. Este es el primer estudio realizado en el estado de Veracruz para demostrar la presencia de micobacterias en quesos frescos e indica que la prevalencia obtenida es baja (1.67%) y que coincide con los estudios realizados en Estados Unidos por Harris *et al.* (2007) en quesos frescos de origen mexicano, donde obtuvieron una prevalencia de 4.9% y por Ikonomopoulos *et al.* (2005), que analizaron distintos tipos de quesos comerciales, en Grecia y la República Checa donde se obtuvo una prevalencia de 3.6%; en ambos estudios, el aislamiento fue mediante cultivo bacteriológico.

Existen reportes sobre el aislamiento mediante el cultivo bacteriológico de *Mycobacterium* spp. a partir de productos lácteos, en particular de muestras de leche; Hruska *et al.* (2005), analizaron muestras de leche en polvo en 7 países europeos, de las cuales aislaron *Mycobacterium* spp. de una de ellas; en Argentina, Cirone (2004), analizó muestras de leche fluida comercial y logró el aislamiento en dos muestras, datos que son semejantes a los encontrados en este estudio.

Como el crecimiento de colonias en los medios de cultivo utilizados fue insuficiente, no fue posible la identificación de especie con pruebas bioquímicas. Lo anterior pudo deberse entre otras causas, a lo mencionado por Koneman *et al.* (1999) y la OIE (2008), en el sentido de que la concentración de la flora bacteriana o fúngica contaminante suele ser crucial para mantener el equilibrio entre la recuperación de micobacterias deseada y la posible contaminación a partir de muestras no estériles.

Además dada la naturaleza de los quesos, su manipulación y exhibición en las queserías e inclusive durante el proceso de elaboración, los productos tienden a contaminarse con múltiples bacterias; dado que las muestras procesadas

presentaron crecimiento de flora contaminante, situación que limitó el desarrollo adecuado de las propias micobacterias que son de crecimiento lento. Es sabido que muchas bacterias contaminantes pueden utilizar los sustratos para su metabolismo y, por tanto, impedir el desarrollo de las micobacterias; además, también producen bactericinas que son antibióticos y que tienen efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo de otras poblaciones bacterianas (Carter y Chengappa, 1994; Carter y Wise, 2004).

Payeur *et al.* (1993) mencionan que el número de pruebas bioquímicas requeridas es muy amplio y ha dado lugar a problemas de interpretación, aunado a esto la descripción de nuevas especies cuyos perfiles fenotípicos son parecidos con otras ya conocidas, ha limitado en forma notable la utilidad de las pruebas bioquímicas como único medio de identificación de los aislamientos. Otros aspectos negativos de estas técnicas son la necesidad de grandes cantidades de bacterias viables y la lentitud en la obtención de resultados (OIE, 2008), razones que imposibilitaron la realización de las pruebas bioquímicas en esta investigación; sin embargo, y a pesar de estos inconvenientes, los métodos bacteriológicos se consideran la prueba de oro para el diagnóstico de la tuberculosis (Payeur *et al.*, 1993). Por otra parte, los resultados de esta investigación apoyan lo mencionado por Zárraga y León (2003), en cuanto a que la identificación de especie se debe realizar mediante pruebas bioquímicas y técnicas moleculares.

### **3.2 Identificación de especie por PCR**

No se identificó ningún fragmento amplificado de la muestra procesada que corresponde a 123 pb que identifican el gen IS6110 que se empleó para determinar la presencia de ADN del complejo *M. tuberculosis* obtenido a partir de la cepa de *Mycobacterium* spp. aislada por bacteriología.

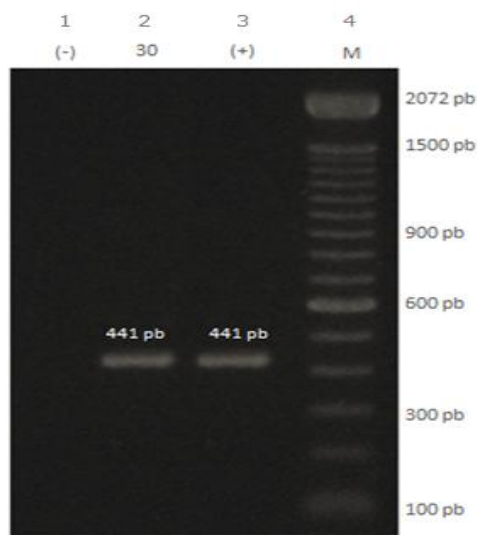
El resultado de esta investigación difiere de lo reportado por Harris *et al.* (2007), que analizaron quesos frescos de origen mexicano en Estados Unidos e identificaron *M. bovis* de una muestra mediante PCR, lo cual no ocurrió en esta investigación.

Durr *et al.* (2000) mencionan que la secuencia de inserción IS6110 es específica del complejo tuberculosis, lo cual se confirma en este estudio ya que sólo

amplificaron los controles positivos y no en la cepa de la muestra de queso ni en el control negativo que no pertenecen al complejo *M. tuberculosis*.

La PCR se realizó a partir de la cepa aislada mediante bacteriología ya que Fernández *et al.* (2005) mencionan que se puede extraer el ADN directo de muestras clínicas; sin embargo, es muy difícil por la cantidad de contaminación de las muestras, por lo que la cantidad y calidad del ADN no es muy buena. Estas técnicas han probado funcionar mejor a partir de cultivo puros; por lo cual, el diagnóstico de tuberculosis mediante PCR complementa al diagnóstico bacteriológico, pero aún no lo sustituye (Durr *et al.*, 2000; Zárraga y León, 2003).

La cepa analizada no perteneció al complejo *M. tuberculosis*. Por lo cual, se procedió a realizar la identificación de micobacterias atípicas. Se identificó así, un fragmento amplificado de la muestra procesada que corresponde a 441 pb (FIGURA 1) que identifican el gen *hsp65*, que se empleó para determinar la presencia de ADN de micobacterias atípicas obtenido a partir de la cepa de *Mycobacterium* spp. aislada por bacteriología.



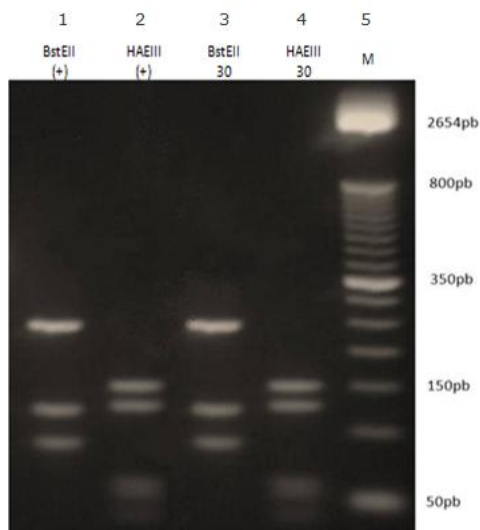
**FIGURA 1.** Fragmento amplificado por PCR-RFLP *hsp65* (Carril 1, control negativo ADN de *M. tuberculosis*. Carril 2, cepa de la muestra 30. Carril 3, control positivo ADN de *M. avium*. Carril 4, marcador molecular de 100 – 1500 pb).

Existen estudios sobre la identificación de micobacterias atípicas con PCR; Ikonopoulou *et al.* (2005) en Grecia y República Checa, analizaron distintos tipos de quesos comerciales, de los cuales aislaron *M. avium* subespecie *paratuberculosis* (Map) en el 31.7% de las muestras. Hruska *et al.* (2005), analizaron muestras de leche en polvo en 7 países europeos, de las cuales aislaron Map en el 49% de las muestras, la cual es una prevalencia alta para micobacterias atípicas, en comparación de la obtenida en este estudio (1.67%). En Argentina, Cirone (2004), analizó muestras de leche fluida comercial, de las cuales aisló Map que es una micobacteria atípica, en 2.8% de las muestras, datos que son semejantes a los encontrados en este estudio.

Cornejo *et al.* (1998) mencionan que con la PCR, se redujo el tiempo de identificación de especie de la micobacteria y su uso elevó el número de muestras positivas; además con la PCR se resolvió el problema de diagnósticos negativos por crecimiento insuficientes para realizar las pruebas bioquímicas. Lo anterior coincide con los resultados de este estudio, ya que no fue posible la identificación por pruebas bioquímicas, mientras que por PCR se logró identificar *M. fortuitum*, que es también una micobacteria atípica.

Lo anterior corrobora también lo mencionado por varios investigadores (Springer *et al.*, 1996; Mondragón *et al.*, 2000; McNabb *et al.*, 2004), que la PCR es más efectiva que las pruebas bioquímicas para la identificación de micobacterias, debido a que los métodos convencionales se apoyan en características fenotípicas, un parámetro susceptible de variar en determinadas especies, lo que pudiera conducir a un diagnóstico erróneo de las mismas.

La digestión se realizó con las enzimas de restricción BstEII y HAEIII para la identificación de especie. Los fragmentos amplificados de la muestra procesada se compararon con la base de datos PRASITE, que corresponde para BstEII 235/120/85 pb y para HAEIII 145/120/60/55 pb, respectivamente (FIGURA 2) que identifican el gen *hsp65*, que se empleó para determinar la presencia de ADN de *M. fortuitum* obtenido a partir de la cepa de *Mycobacterium* spp. aislada por bacteriología.



**FIGURA 2.** Digestión enzimática del fragmento amplificado por PCR-RFLP hsp65 (Carril 1, digestión enzimática con BstEII control positivo ADN de *M. fortuitum*. Carril 2, digestión enzimática con HAEIII control positivo ADN de *M. fortuitum*. Carril 3, digestión enzimática con BstEII ADN de la muestra 30. Carril 4, digestión enzimática con HAEIII ADN de la muestra 30. Carril 5, marcador molecular de 50-800 pb).

En esta investigación se identificó *M. fortuitum* de 1/60 (1.67%; IC<sub>95%</sub>: 0.09-10.14) de las muestras, que coincide con los estudios realizados en Estados Unidos por Harris *et al.* (2007), en quesos frescos de origen mexicano, donde identificaron del 3.4% de las muestras *M. fortuitum* mediante PCR.

*M. fortuitum* pertenece a las micobacterias atípicas o ambientales, ha sido aislado de agua potable y del suelo (Leão *et al.*, 2005), por lo cual se asume que la contaminación del queso se dio en algún punto de la cadena de producción o durante su venta en los mercados.

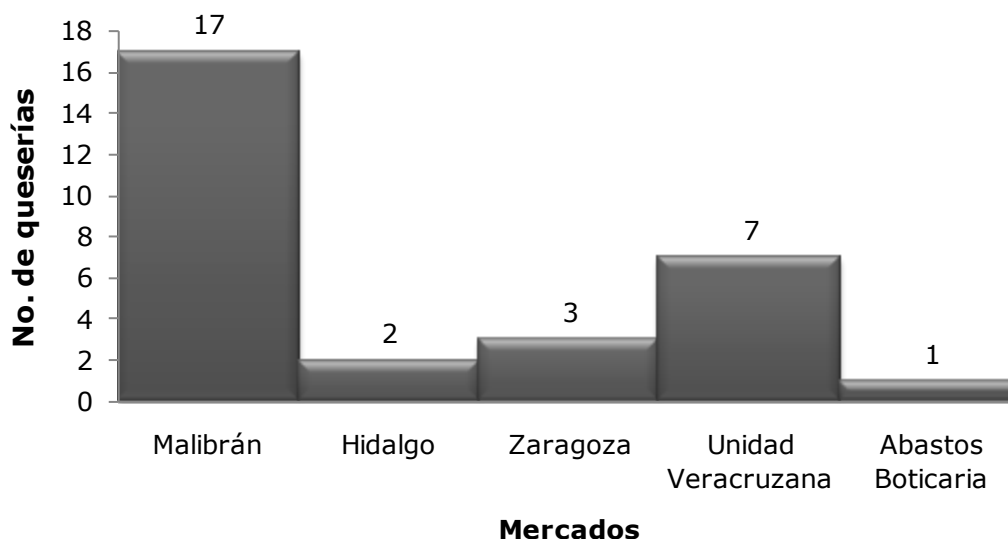
Por otra parte *M. fortuitum* es una de las micobacterias atípicas que con más frecuencia se aíslan en humanos (Wong *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Yzquierdo *et al.*, 2007) y está asociada a infecciones cutáneas y rara vez en enfermedades pulmonares. Es un agente etiológico en infecciones post operatorias, en especial las de corazón (Leão *et al.*, 2005).

### 3.3 Determinación de factores de riesgo

De los mercados que cuentan con registro en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, Malibrán es el más grande y el que cuenta con mayor número de queserías, por lo que es del que se obtuvieron el mayor número de muestras, como se aprecia en la FIGURA 3.

La cepa aislada de *M. fortuitum* se obtuvo de la única quesería que se encuentra en el mercado Abastos Boticaria, por lo que no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) para mercado de procedencia.

En la presente investigación a partir de 1/30 muestras correspondientes a la época de estiaje se aisló sólo una cepa de *M. fortuitum* (3.33%;  $IC_{95\%}$ : 0.17-19.05), por lo que no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre épocas. Este resultado difiere con lo mencionado por Berrang *et al.* (2002) que señalan la existencia de bacterias que presentan estacionalidad; es decir, que la posibilidad de aislamiento se concentra por temporadas; sin embargo, la comparación debe ser tomada con cautela porque solo se logró un aislamiento.

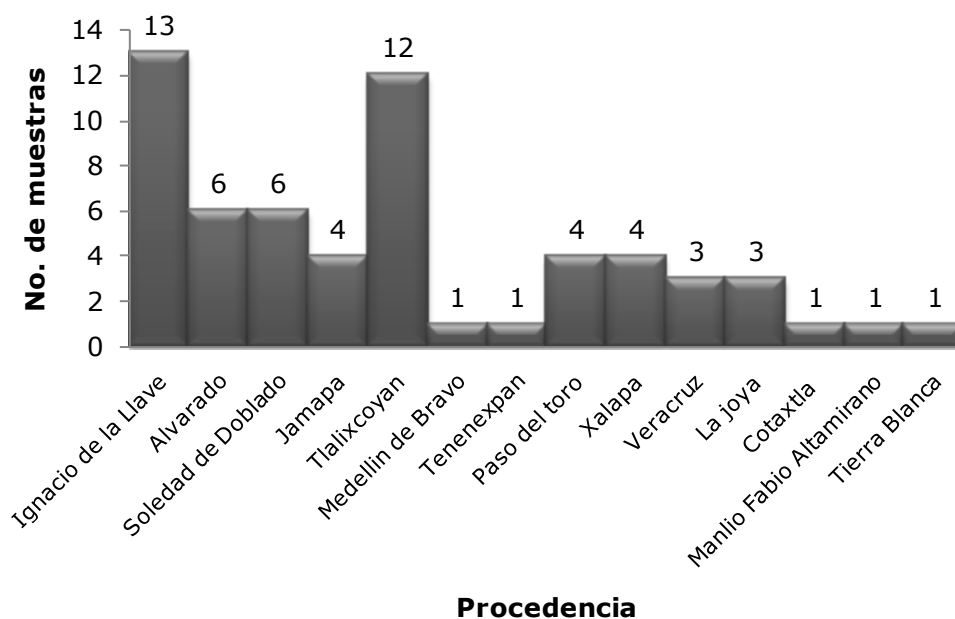


**FIGURA 3.** Número de queserías en los mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.

Los estudios enfocados a la identificación de bacterias patógenas en alimentos, en su mayoría, se realizan en mercados y con vendedores ambulantes, lo anterior se debe a que los datos obtenidos permiten conocer la situación real de la calidad sanitaria de los alimentos y el riesgo que el consumo de éstos implica para la salud pública (Barroso *et al.*, 2007; González *et al.*, 2007).

Los quesos que se expenden en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río proceden de diversas localidades, se identificaron 14 zonas diferentes de procedencia de los quesos que se distribuyen en la conurbación (FIGURA 4).

Así, fue posible observar que del municipio de Ignacio de la Llave, también conocido como región de la Mixtequilla, es de donde procedieron 13/60 (21.6%; IC<sub>95%</sub> 12.4-34.5) de los quesos colectados. Es importante identificar las zonas o municipios de donde proceden los productos que podrían estar contaminados con microorganismos patógenos y establecer en forma adecuada zonas de riesgo para la salud pública por consumo de estos productos (Berrang *et al.*, 2002). La tuberculosis es una patología que tiene como una de las principales vías de infección de productos lácteos contaminados, por lo que es necesario conocer las zonas donde se presenta la enfermedad y de donde proceden los alimentos que allí se consumen, ya que esto permite el análisis de la dinámica de la población vinculada con la transmisión y diseminación de la enfermedad (Leynaud y Reati 2009).



**FIGURA 4.** Localidades de procedencia de los quesos que se expenden en los mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.

La cepa aislada de *M. fortuitum* procede del municipio de Alvarado 1/6 (16.67%; IC<sub>95%</sub>: 0.8-63.52), por lo que tampoco se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) para lugar de procedencia.

Con relación al tipo de almacenamiento de los quesos que se expenden en las queserías de los mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, se obtuvo que 10/60 (16.6%; IC<sub>95%</sub> 8.7-28.9) se almacenan en refrigeración, 31/60 (51.6%; IC<sub>95%</sub> 38.5-64.6) en vitrina y 19/60 (31.6%; IC<sub>95%</sub> 20.6-45.1) se encuentran al aire libre. Estudios realizados por Schobitz *et al.* (2001), Franco *et al.* (2001) y Baquero *et al.* (2006), a partir de muestras obtenidas en los puntos de venta, resaltan que las malas condiciones higiénicas durante su comercialización y que corresponde con el mal manejo que se observó en esta investigación al momento de adquirir los quesos, como la presentación del producto para su venta, almacenamiento y, en algunos casos, la ausencia de refrigeración, particularmente porque se trata de quesos no pasteurizados y de un alimento altamente perecedero.

En cuanto a si las queserías de los mercados seleccionados compran o producen los quesos que venden, se obtuvo que 43/60 (71.6%; IC<sub>95%</sub> 58.3-82.1) de las



queserías manifestaron comprar los quesos y 17/60 (28.3%; IC<sub>95%</sub> 17.8-41.6) mencionaron que ellos mismos los producían. Algunas bacterias como *E. coli*, *Salmonella* y *Mycobacterium* pueden ser contaminantes directos de la leche o de algún punto de la cadena de producción. Al respecto, Cristóbal y Maurtua (2003) identificaron bacterias aerobias mesófilas elevadas en el producto terminado y que son consecuencia de la contaminación en algún punto de la cadena. Noriega *et al.* (2008) y Rossi *et al.* (2008) concluyen que la contaminación de los alimentos puede darse durante su elaboración o por el empleo de materias primas contaminadas.

Con respecto al tiempo de elaboración de los quesos que se expenden en los mercados seleccionados, se obtuvo que 31/60 (51.6%; IC<sub>95%</sub> 38.5-64.6) de los quesos que se colectaron tuvieron un día de elaborados, 15/60 (25%; IC<sub>95%</sub> 15.1-38.1) dos y 14/60 (23.3%; IC<sub>95%</sub> 13.7-36.3) de tres a cuatro días. Esto es importante ya que Rodríguez (2002) menciona que los estudios bacteriológicos en alimentos perecederos, se deben realizar en los primeros días de elaboración porque a mayor tiempo de elaboración, la contaminación aumenta y las propiedades de los alimento se alteran.

En cuanto a la pasteurización de la leche con la cual se elaboran los quesos que se expenden en los mercados seleccionados, se obtuvo que 5/60 (8.3%; IC<sub>95%</sub> 3.1-19.1) de las queserías aseguraron que sí era pasteurizada, 55/60 (91.7%; IC<sub>95%</sub> 60.1-98.5) reconocieron que no se pasteurizaba. Situación fundamental, porque uno de los principales factores de riesgo para las personas de contraer tuberculosis es el consumo de leche cruda, productos y subproductos contaminados (Acha y Szyfres, 2001).

## CONCLUSIONES

Se logró aislar *Mycobacterium* spp. por bacteriología convencional de una de las muestras colectadas de los quesos frescos expendidos en los mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.

No fue posible Identificar *M. bovis* mediante pruebas bioquímicas y técnicas moleculares. Solo se identificó *M. fortuitum* por PCR de una muestra colectada del mercado Abastos Boticaria procedente del municipio de Alvarado.

No se identificaron factores de riesgo asociados.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Abalos P. y Retamal P. 2004. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente?. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **23**(2):583-594.
- Acha P. y Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, (3a. ed). OPS. Washington, USA. Pp. 266-283.
- Adams L.G. 2001. In vivo and in vitro diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **20**:304-324.
- Alonso M.J., Corcuera M.T., Roldán M., Picazo A. y Gómez F., 1996. Modificación de la Técnica de Ziehl-Neelsen para la detección de micobacterias con la utilización del microondas. *Rev. Esp. Patol.* **29**(1):33-35.
- Arráyala P., Velasco M. y Fernández J. 2006. Identificación Rápida de micobacterias mediante análisis de patrones de restricción. *Rev. Méd. Chile.* **132**(7):1-9.
- Baquero A.D.M., Bernal A.M.G. y Campusano S. 2006. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos expendidos en la plaza del mercado de Cáqueza, Cundinamarca. *Nova. Publ. Cient.* **4**(6):11-14.
- Barroso P.G., Lucerna M.A.M., Cortes M.M., Toranzo M.L., Escabias F.J.M. y Molina F. C. 2007. Brote de brucelosis interprovincial por ingesta de quesos fresco sin higienizar. *Medicina de Familia (And).* **7**(2):27-32.
- Berrang M.E., Meinersmann J.R., Northcutt K.J. and Smith P.D. 2002. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry further processing facility and from fully cooked product. *J. Food Prot.* **65**:1574-1579.
- Biberstein E. y Chung E. 1994. Tratado de microbiología veterinaria. Editorial Acribia, Zaragoza, España. Pp. 119-124.
- Canal A.M. 2004. Perspectivas presentes y futuras de la Tuberculosis bovina en Argentina. Pp. 89-90. En XIX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires, Argentina.
- Carter G.R. y Chengappa M.M. 1994. Bacteriología y micología veterinaria. Aspectos esenciales. 2da edición. Ed. Manual Moderno. México D.F. Pp. 147-153.
- Carter G.R. y Wise D.J. 2004. Essentials of Veterinay Bacteriology and Micology. Iowa State Press, 6a. Edición, EUA. Pp. 107-113.

- Castro C., Puerto G., García L., Orjuela D., Llerena C., Garzón M. y Ribón W. 2007. Molecular Identification of non-tuberculous mycobacteria. *Biomédica*. **27**(3):439-446.
- Chamorro M.C. y Losada M.M. 2002. El análisis sensorial de los quesos. 1ª Ed. Mundi-Prensa Ediciones. Madrid, España. Pp. 26.
- Chuaqui B., Chuaqui R., Duarte I., González S., Etchart M. y Rosenberg H. 1996. Lecciones de anatomía patológica. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. Pp. 157-161.
- Cirone K. 2004. Caracterización y viabilidad de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* en leche, quesos y agua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina.
- Corner L.A. 1994. Post Mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet. Microbiol.* **40**:53-63.
- Cornejo B. j., Sahagún-Ruiz A., Suárez-Güemes F., Thornton C. G., Ficht T. y Adams G. L. 1998. Comparison of C18-Carboxypropylbetaine and Glass Bead ADN Extraction Methods for detection of *Mycobacterium bovis* in Bovine Milk Samples and Analysis of Samples by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(8):3099-3101.
- Cook A.J., Tuchili L.M., Buve A., Foster S.D., Godfrey-Faussett P., Pandey G.S. and McAdam J. 1996. Human and bovine Tuberculosis in the Monze district of Zambia - a cross-sectional study. *Br. vet. J.* **152**(37):37-46.
- Cosivi O., Grange J. M., Daborn C.J., Raviglione C.M., Fujikura T., Cousins D., Robinson R.A., Huchzermeyer H.F., De Kantor I. and Meslin F.X. 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* **4**(1):59-70.
- Cousins D.V. y Dawson D.J. 1999. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the Australian population: cases recorded during 1970-1994. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **3**(8):715-721.
- Cristóbal R.L.D. y Maurtua T.D.J. 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Pan. Am. J. Public. Health.* **14**(3):158-164.
- Daborn C.J. y Grange J.M. 1993. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br. Vet. J.* **149**:405-417.
- Dankner W., Waecker N.J. y Essey M.A. 1993. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicepidemiologic study of 73 patients and historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)*. **72**(1):11-37.
- Dankner W. y Davis Ch. 2000. *Mycobacterium bovis* as a significant cause of tuberculosis in children residing along the United States - México border in the baja California region. *Pediatrics*. **105**(6):1-5.

De Luna J. and Sparangano O.A., 2008. Molecular Diagnostic to Identify Mycobacterial Species in Veterinary Science. *Thai. J. Vet. Med.* **37**:19-24.

Devallois A., Seg Goh K. and Rastogi N. 1997. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *J. Clin. Microbiol.* **35**(29):69-73.

Díaz F., Banda V., Jaramillo L., Arriaga C., González D. y Estrada-Chávez C. 2003. Identificación de bovinos portadores de *Mycobacterium bovis* aplicando técnicas inmunológicas y moleculares. *Vet. Mex.* **34**(1):13-26.

Durr P.A., Clifton-Hadley R.S. y Hewinson R.G. 2000. Epidemiología Molecular de la Tuberculosis II. Aplicaciones de la tipificación genética. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **19**:689-701.

FAO, 2009. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. (En línea) [www.fao.org/docrep/011/i0480s/i0480s00.htm](http://www.fao.org/docrep/011/i0480s/i0480s00.htm).

Farga V. 2004. La conquista de la tuberculosis. *Rev. Chil. Enf. Respir.* **20**(2):101-108.

Fernández V.F.A, Esteban M.J., González M.J. y Palacios G.J.J. 2005. Procedimientos en Microbiología Clínica. (En línea) <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>.

Fiallo P., Williams D., Chan G. and Gillis T. 1992. Effects of Fixation on Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol.* **30**:3095-3098.

Franco L.U., Vargas X.X.P., Mendoza I.A., Bayona M.R. y Plaza A. 2001. Determinación de *Escherichia coli* O157 a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales empleando dos sistemas de aislamiento. Pub. Universitas Scientiarum. Bogotá. [En línea] [http://www.javeriana.edu.com/universitas\\_scientiarum/universitas\\_docs/VOL6N1/ART3.htm](http://www.javeriana.edu.com/universitas_scientiarum/universitas_docs/VOL6N1/ART3.htm).

Fritsche A., Engel R., Buhl D. and Zellweger J.P. 2004. *Mycobacterium bovis* tuberculosis: from animal to man and back. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **8**(7):903-904.

Fujimura C., Anno I., Andrade S., Roxo E., Morlock G. and Cooksey R. 2003. Isolation and identification of Mycobacteria from Livestock Specimens and milk obtained in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* **98**(3):319-323.

García C. y Szyfres B. 1963. Tuberculosis Animal en las Américas y su Transmisión al Hombre. FAO. Roma, Italia. Pp. 266-280.

García J., Palacios J. y Sánchez A. 2005. Respiratory Infections Caused by Environmental Mycobacteria. *Arch. Bronconeumol.* **41**:206-219.

Gil A. y Samartino L. 2000. Zoonosis en los Sistemas de Producción Animal de las Áreas Urbanas y Periurbanas de América Latina. Livestock Policy Discussion Paper No. 2. FAO. [En línea] [http://www.rlc.fao.org/es/ganaderia/pdf/PP\\_Nr2\\_Final.pdf](http://www.rlc.fao.org/es/ganaderia/pdf/PP_Nr2_Final.pdf).

González M.D., Garza F.H. y Sánchez-Yáñez J.M. 2007. Contaminación de productos lácteos por *Brucella* spp y otras bacterias en el municipio Higuera, Nuevo León, México. [En línea] <http://www.monografias.com/trabajos33/brucelosis/>.

González C.A.F., Torres L.I.M.J. y Vallejo C.B. 2004. Tecnificación del proceso artesanal para la obtención de queso fresco mexicano. Trabajo finalista del Premio Nacional en Ciencia y Tecnología en Alimentos. [En línea] [http://www.pncta.com.mx/pages/pncta\\_investigaciones\\_04g.asp?page=04e3](http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_04g.asp?page=04e3).

Grange J.M. 2001. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. *Tuberculosis*. **81**(1/2):71-77.

Guerrero A., Cobo J., Fortín J., Navas E., Quereda C., Asensio A., Cañón J., Blázquez J. and Gomez-Mampaso E. 1997. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet*. **350**:1738-1742.

Hale Y.M., Pfyffer G.E. y Salfinger M. 2001. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clin. Infect. Dis.* **33**:834-846.

Harries A., Maher D., Raviglione M., Chaulet P., Nunn P., Van Praag E. and Crofton J. 1996. TB/HIV a clinical manual. World Health Organization. Italy. Pp. 19-31.

Harris N.B., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T. y Farrell D. 2007. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. *Appl Environ Microbiol.* **73**(3):1025-1028.

Hosek J., Svastova P., Moravkova M., Pavlik I. and Bartos, M. 2006. Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material: a review. *Vet. Med.* **51**(5):180-192.

Hruska K., Bartos M., Kralik P. y Pavlik I. 2005. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in powdered infant milk. Proceedings of the 8th International Colloquium on *paratuberculosis*. Copenhagen, Denmark. Pp. 67.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2010. Encuesta Industrial Mensual. [En línea] <http://dgcnesyp.Inegi.org.mx/cgi-win/bdieintsi.exe/SER173532>.

Ikonomopoulos J., Pavlik I., Bartos M., Svastova P., Ayele W. y Roubal P. 2005. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in retail cheeses from Greece and Czech Republic. *Appl Environ Microbiol.* **71**(12):8934-8936.

Juárez M.T. 2008. Quesos Mexicanos toda una tradición. Reportajes. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [En línea] <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/reportajes/quesos/quesos.htm>.

Jubb K., Kennedy P. and Palmer N. 1993. Pathology of domestic animals. 4 nd ed., tomo 2. Academic Press. California, USA. Pp. 583-595.

Koneman W.E., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. y Winn W.C. 1999. Diagnostico Microbiológico. 5 nd ed., Editorial Medica Panamericana, Argentina. Pp. 867-915.

Leão S.C., Bernardelli A., Cataldi A., Zumarraga M., Robledo J. y Realpe T. 2005. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. *J. Microbiol. Methods*. **61**:193-199.

Leynaud G.C. y Reati G.J. 2009. Identificación de las zonas de riesgo ofídico en Córdoba, Argentina mediante el programa SIGEPI. *Rav. Panam. Salud Pública*. **26**(1):64-69.

Magariños H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. [En línea] [http://www.science.oas.org/OEA\\_GTZ/LIBROS/LA\\_LECHE/leche\\_all.pdf](http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/leche_all.pdf).

Mateos P.A. 2000. La tuberculosis bovina como zoonosis. IICA México. [En línea] <http://www.conasamexico.org/mesa9LA%20TUBERCULOSIS%20BOVINA%20COMO.pdf>.

McNabb A., Eisler D., Adie K., Amos M., Rodríguez M. y Stephens G. 2004. Assessment of partial sequencing of the 65 kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3000-3011.

Miller J.J., Ryan J., Saari D. and Suarez D. 1997. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and Elk by PCR amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organism. *J. Vet. Diagn. Invest.* **9**:244-249.

Miller J.M., Jenny A.L. and Payeur J.B. 2002. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants. *Vet Microb.* **23**:1-9.

Mondragón M., Vázquez C.A., Barrón C., Acosta P., Jost K.C. and Balandrano S. 2000. Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Pública México*, **42**:484-9.

Montoro E. 2004. La resistencia a múltiples fármacos: una amenaza para el control de la tuberculosis. *Rev. Panam. Salud Pública*. **16**(1):68-73.

Morales A., Martínez I., Carlos A., Álvarez G., Álvarez M. y Maldonado J. 2005. Comparación de histopatología, cultivo y PCR en el diagnóstico de tuberculosis bovina. *Revista Científica FCV-LUZ*. **15**:103-108.

Moreira A., Paolicchi F., Morcella C., Zumárraga M., Cataldi A. and Bigi F. 1999. Distribution of IS900 restriction length polymorphism types among animal *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates from Argentina and Europe. *J. Vet Microbiol.* **70**:251-259.

Nicolet J. 1986. Compendio de bacteriología médica veterinaria. Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp. 184-190.

Noriega L.M.R., Ibáñez S.V., González P.A., Yamamoto M.C., Astudillo J.D., González M.V., Riberos R.K., Lira F.C., Marcotti A.S., Pérez J.G., Thompson L.M., Daza M.F.P., Espinosa M.I., Pinochet C.V., Vial P.A.C. 2008. *Listeria monocytogenes*: informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Rev. Chil. Infect.* **25**(5):342-349.

OIE, 2008. Organización Mundial de Sanidad Animal. Tuberculosis Bovina. Manual de las Pruebas de Diagnostico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. [En línea] <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>.

Palmero D., Ritacco V., Ambroggi M., Natiello M., Barrera L., Capone L., Dambrosi A., Di Lonardo M., Isola M., Poggi S., Vescovo M. and Abbate E. 2003. Multidrug-resistant Tuberculosis in HIV-negative patients, Buenos Aires, Argentina. *Emerg. Inf. Dis.* **9**(8):965-969.

Palmero D. 2004. Temas de Zoonosis II. Pp. 214-219. En: *Micobacteriosis transmitidas al hombre: Clínica*, (Ed. Caccione R., Durlach R. y Larghi O.), Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires, Argentina.

Palomino J.C., Martin A. and Portales F. 2002. New methods for the diagnosis and drug resistance detection in mycobacteria. *Recent. Res. Devel. Microbiol.* **2**:297-318.

Payeur J.B., Jarnagin J.L., Marquardt J.G., Schaper L.A. and Martin B.M. 1993. Manual of laboratory methods in veterinary mycobacteriology for isolation and identification of mycobacteria. National Veterinary Services Laboratories, Veterinary Services, Animal Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture. Ames, Iowa, USA. Pp. 14-23.

Pietro D.S., Haritchabalet K., Cantoni G., Iglesias L., Mancini S., Temperoni A., Labanchi J. L., García M. T., Cofre M., Rosales S., Herrero E., Bigatti R., Orellana O. y Larrieu E. 2004. Vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos en la provincia de Rio Negro, Argentina, 1993-2001. *Medicina Buenos Aires.* **64**:120-124.

PRASITE. Identification of mycobacteria. Base de datos del Instituto Pasteur de Paris, Francia. [En línea] <http://app.chuv.ch/prasite/index.html>.

PROFECO. 2000. Revista del consumidor. Calidad de queso. Abril. [En línea] [http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_00/quesos.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_00/quesos.pdf).

Quinn P.J. y Markey B.K. 2005. Elementos de Microbiología Veterinaria. Acribia S.A. Zaragoza, España. Pp. 279-285.



Ramarokoto H., Andrianasolo D., Rasolonalona T., Ramaroson F., Razafitsiarovana I., Vincent V., Ratsimba L. and Rasolofo- Razanamparany V. 2003. Un cas de tuberculose pulmonaire a *Mycobacterium bovis* multiresistant a Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur de Madagascar*. **69**:(1/2)37-40.

Rasolofo-Razanamparany V., Menard D., Rasolonalona T., Ramarokoto H., Rakotomanana F., Aurégan G., Vincent V. and Chanteau S. 1999. Prevalence of *Mycobacterium bovis* in human pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in Madagascar. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* **3**(7):632-634.

Raviglione M. y Pio A. 2002. Evolution of WHO policies for tuberculosis control, 1948-2001. *Lancet*. **359**:775-780.

Retamal P. 2000. Tuberculosis bovina: una breve actualización. Monografías. *Med. Vet.* **20**(2):78-84.

Rodríguez G.A. 2002. Principales características y diagnostico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pub. Mex.* **44**(5):464-475.

Rojas A., Lacruz H., Salinas P., De Rancel E. y Hernández M. 2006. Adenitis tuberculosa inguinal. Reporte de un caso. *Rev. Fac. Med. Universidad de los Andes*. **15**:37-40.

Rossi M.L., Paiva A., Tornese M., Chianelli S. y Troncoso A. 2008. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Rev. Chil. Infect.* **25**(5):328-335.

Runyon E.H., Wayne L.G. and Kubica G.P. 1974. Family II. Mycobacteriaceae Chester 1897. Pp. 681-701. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8nd ed, (Ed. Buchanan R.M. and Gibbons N.E.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.

SAGARPA 1995. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*). [En línea] [www.sagarpa.gob.mx/v1/ganaderia/NOM/031zoo.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/v1/ganaderia/NOM/031zoo.pdf).

Santos A.M. 2006. Elaboración a pequeña escala de quesos mexicanos con leche pasteurizada. Primer simposio de leche. Chihuahua, Chihuahua. Octubre. [En línea]<http://201.131.19.30/Estudios/lacteos/Elaboracion%20a%20Peque%C3%BAa%20Escala%20de%20Quesos%20Mexicanos%20con%20Leche%20Pasteurizada.pdf>.

Schobitz R., Marín M., Horzella M. y Carrasco E. 2001. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro Sur*. **29**(2):114-119.

SSA 1993. Secretaria de Salubridad y Asistencia. NOM-006-SSA2-1993, Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud. Secretaria de Salud México. Normas Oficiales Mexicanas [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/>.

SSA 1994a. Secretaria de Salubridad y Asistencia. NOM-110-SSA1-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Bienes y Servicios Secretaria de Salud México. Normas Oficiales Mexicanas [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/>.

SSA 1994b. Secretaria de Salubridad y Asistencia. NOM-121-SSA1-1994. Quesos: frescos, maduros y procesados. Especificaciones sanitarias. Bienes y servicios. Secretaria de Salud México. Normas Oficiales Mexicanas [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/>.

Scanlan M. 1991. Introducción a la Bacteriología Veterinaria. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 235-243.

Schulz S., Cabras A.D., Kremer M., Weirich G., Miethke T. and Bosmuller H.C. 2005. Species identification of mycobacteria in paraffinembedded tissues: frequent detection of nontuberculous mycobacteria. *Mod. Pathol.* **18**:274-282.

Sóstenes E.V.F. y Martínez G.J.L. 2006. Seguridad e inocuidad alimentaria para México. *Rev.Digi.U@T.1*(1). [En línea] <http://www.turevista.uat.edu.mx/INOCUIDAD.htm>.

Springer B., Stockman L., Teschner K., Roberts G.D. and Böttger E.C. 1996. Two laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: Molecular versus phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* **34**:296-303.

Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Bottger E. and Bodmer T. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* **31**:175-178.

Thrusfield M., Ortega C., de Blas I., Noordhuizen J.P. y Frankena K. 2001. Win Episcopo 2.0: Improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* **148**:567-572.

Thrusfield M. 2005. *Veterinary Epidemiology*. 3rd Edition. Blackwell Science, Oxford, England. Pp. 600.

Toledo O.P., Milian S.F., Santillán F.M.A. y Ramírez C.I.C. 1999. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Vet. Méx.* **30**(3):227-229.

Vadillo S, Píriz S. y Mateos E. 2002. *Manual de Microbiología Veterinaria*. McGraw – Hill Interamericana de España. Madrid, España. Pp. 312-327.

Valerga M., Viola C., Thwaites A., Bases O., Ambroggi M., Poggi S. y Marino R. 2005. Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en una mujer con SIDA. *Rev. Argent. Microbiol.* **37**:96-98.

Vargas A.C., Cervantes F.E. y Pérez S.L.S. 2008. Los quesos mexicanos genuinos de Chiautla, Puebla, México. IV congreso internacional de la red SIAL. [En línea] <http://www.infoagro.net/shared/docs/a5/Los%20quesos%20mexicanos%20genuinos%20de%20Chiautla%20-%20M%C3%A9xico%20-.pdf>.

Vásquez P.G. 2003. La contaminación de los alimentos, un problema por resolver. *Revista Salud UIS*. **35**:48-57.

Vuorinen P.A., Uuento M.R. and Hallstron O. 1995. Direct detection of M.tuberculosis complex in respiratory specimens by Gene-Probe Amplified M.tuberculosis Direct Test and Roche Amplicor M.tuberculosis.Test. *J. Clin. Microbiol.* **33**(7):1856-1859.

Wong D., Yip P., Tse D., Tung V., Cheung D. y Kam K. 2003. Routine use of a simple low-cost genotypic assay for the identification of mycobacteria in a high throughput laboratory. *Diag. Microbiol. Infec. Dis.* **47**:421-426.

Yzquierdo S.S.L, Mederos C.L., Díaz G.A., Echemendia F. M. y Montoro C.E. 2007. Aplicación de RPC-PLFR en el diagnóstico de micobacterias no tuberculosas. *Rev. Chil. Infect.* **24**(5):391-396.

Zárraga A. y León G. 2003. Amplificación de la Secuencia Genómica, PCR. Santiago de Chile. [En línea] [www.bioplanet.net](http://www.bioplanet.net).

**ANEXO 1**

## CUESTIONARIO

1. Fecha: \_\_\_\_\_
2. Hora: \_\_\_\_\_
3. Número de muestra: \_\_\_\_\_
4. Sitio de compra:  
    Mercado: \_\_\_\_\_      Tienda: \_\_\_\_\_
5. Produce ó compra los quesos: \_\_\_\_\_
6. Lugar de procedencia: \_\_\_\_\_
7. Tiempo de vida en vitrina (días):  
    1 \_\_\_\_\_      2 \_\_\_\_\_      3 \_\_\_\_\_      4 \_\_\_\_\_      5 \_\_\_\_\_
8. Tipo de almacenamiento:  
    Refrigeración: \_\_\_\_\_      En vitrina: \_\_\_\_\_      Al aire libre: \_\_\_\_\_
9. Sabe usted si pasteurizan la leche para elaborar los quesos:  
    Si \_\_\_\_\_      No \_\_\_\_\_
10. Observaciones:  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_