

Tratamiento preanalítico para el aislamiento de *Mycobacterium bovis* en productos lácteos

Revisión Sistemática 2005-2015

Giovani Pacheco-Negrete¹, Luis Alcántara-Jurado¹, Eugenia Pérez-Morales¹, Lilia Hurtado-Ayala¹, Rafael Laniado-Laborín^{2,3} y Carmen Jauregui-Romo¹

Facultad Ciencias Químicas e Ingeniería¹, Facultad de Medicina y Psicología², Hospital General Tijuana³
Universidad Autónoma de Baja California^{1,2}, ISESALUD³

Tijuana B.C., México

[pacheconegretec, luis.alcantara, eugenia, lilyhurtado, rlaniado, cjauregui]@uabc.edu.mx

Abstract—The aim of this systematic review was to conduct an analysis of studies on the process of isolation of *Mycobacterium bovis* in unpasteurized dairy products, through research articles published in MEDLINE/Pub-Med, SciELO and EBSCO database, from 2005 to 2015, to evaluate and select the methodological criteria in the isolation of the infectious agent. Seven articles were included and three methodologies were analyzed for the decontamination of the samples, Kubica, Petroff and Corper & Uyei method. There were isolated tuberculous and non-tuberculous mycobacteria. *M. bovis* was commonly isolated mycobacteria. For isolation of mycobacteria NALC-NaOH 2% was the best samples decontaminant. For confirmation of these findings it is recommended the use of molecular techniques.

Keyword—*Mycobacterium bovis*, dairy products, milk, cheese.

Resumen— El objetivo de esta revisión sistemática fue realizar un análisis de estudios sobre el proceso de aislamiento de *Mycobacterium bovis* en productos lácteos no pasteurizados, mediante la investigación de artículos publicados en la base de datos MEDLINE/Pub-Med, SciELO y EBSCO, de 2005 a 2015, para evaluar y seleccionar los criterios metodológicos en el aislamiento del agente infeccioso. Se incluyeron siete artículos y se analizaron las metodologías para la descontaminación de las muestras, el método de Kubica, Petroff y Corper y Uyei. Se aislaron tanto micobacterias tuberculosas como no tuberculosas. La micobacteria comúnmente aislada fue *M. bovis*. El NALC-NaOH 2% fue el mejor descontaminante de muestras para el aislamiento de micobacterias. Es recomendable el uso de pruebas moleculares para la confirmación de estos hallazgos.

Palabras claves—*Mycobacterium bovis*, productos lácteos, leche, quesos.

I. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es un problema de salud a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que, en el 2012, 8.6 millones de personas fueron afectadas por la tuberculosis y 1.3 millones murieron por esta causa [1]. La tuberculosis solo puede ser causada por las micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), siendo *M. tuberculosis* la más frecuente [2].

Por otro lado *M. bovis* produce una tuberculosis zoonótica que afecta principalmente al ganado bovino, pero se ha demostrado la infección en el ser humano. Se sabe que personas con *M. bovis* se infectan por consumir leche o queso fresco no pasteurizado de ganado infectado, y de persona a persona por vía aérea [2, 3].

M. bovis tiene una amplia gama de animales hospederos tanto domésticos como salvajes, lo que favorece su prevalencia en diferentes países. Existen investigaciones donde muestran que *M. bovis* se ha encontrado en regiones de Europa, Asia, África y América Latina [4,5,6,7]. En países desarrollados se estima que el 1% del total de casos reportados por tuberculosis son afectados por *M. bovis*, se cree que existe una incidencia superior al 10% en la región de América Latina y el Caribe [8].

La tuberculosis zoonótica por *M. bovis* se considera un problema a nivel mundial y es causante de grandes pérdidas económicas por el impacto a la salud humana y en ganadería. Para prevenir y reducir su prevalencia, se han tomado varias medidas, como la creación de organizaciones que se dedican a vigilar el ganado, por ejemplo: La Organización Mundial de la Sanidad Animal, por sus siglas en inglés OIE, SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) y SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) estos dos últimos en el caso de México, que vigilan de cerca a los productores ganaderos mexicanos. Estas organizaciones vigilan que se emplee la pasteurización a fin de eliminar al microorganismo, así como el buen estado de salud del animal para su consumo como lo señala SENASICA y la OIE en su portal en línea [9]. Se ha documentado la eliminación de *M. bovis* con pasteurización a 62°C por 30 minutos o a 71.7°C por 15 minutos [7,10,11]. Países desarrollados como Estados Unidos y el Reino Unido han bajado el índice de infecciones por implementar la pasteurización [12].

En México no se tienen muchos datos sobre la incidencia de *M. bovis*, por lo que es necesario implementar técnicas de diagnóstico en los centros de salud, salvo en estudios especializados donde se pueda analizar una determinada población que permita calcular la incidencia del lugar donde se realice el estudio, como en el caso de Querétaro, que el 1.96% del total de casos de tuberculosis son atribuidos a *M. bovis* [2].

En Baja California se ha confirmado la aparición de *M. bovis* [8], pero se desconoce el foco de infección. Tijuana es una ciudad fronteriza y es una de las ciudades más visitadas en todo el mundo, donde existe una gran migración del sur al norte del país [13].

El objetivo de esta revisión sistemática fue realizar un análisis de estudios sobre el proceso de aislamiento de *Mycobacterium bovis* en productos lácteos no pasteurizados, mediante la investigación de artículos publicados en la base de datos MEDLINE/Pub-Med, SciELO y EBSCO, de 2005 a 2015, para evaluar y seleccionar los criterios metodológicos en el aislamiento e identificación del agente infeccioso.

II. METODOLOGÍA

Se revisaron todos los artículos originales encontrados en inglés y español publicados en las bases de datos de MEDLINE/PubMed, SciELO y EBSCO de 2005 a 2015, de estudios sobre *Mycobacterium bovis* en productos lácteos no pasteurizados. Para esta revisión se consideró como criterio de inclusión: aislamiento de *Mycobacterium bovis* de leche y/o productos lácteos no pasteurizados. Se realizó la búsqueda con las palabras clave: “*Mycobacterium bovis*”, “dairy products”, “milk”, “cheese”. En la búsqueda electrónica se encontraron en la base de datos de MEDLINE/Pub-Med, SciELO y EBSCO 132 artículos sobre *Mycobacterium bovis* dairy products, 217 sobre *Mycobacterium bovis* milk y 15,017 sobre *Mycobacterium bovis* cheese. Al aplicar los criterios de inclusión, la fecha de inclusión y descartar los artículos repetidos, se seleccionaron 2,557 artículos potenciales, de estos se analizaron título y/o el resumen de cada uno y se eliminaron 2,550 que no cumplieron con los criterios de la revisión, por lo que resultaron 7 estudios para el análisis y evaluación en esta revisión (Fig. 1).

Los artículos fueron evaluados por dos investigadores independientes (GPN, LAJ). En caso de divergencia fue evaluado por tres investigadores más (EPM, LHA, RLL) y se logró un consenso.

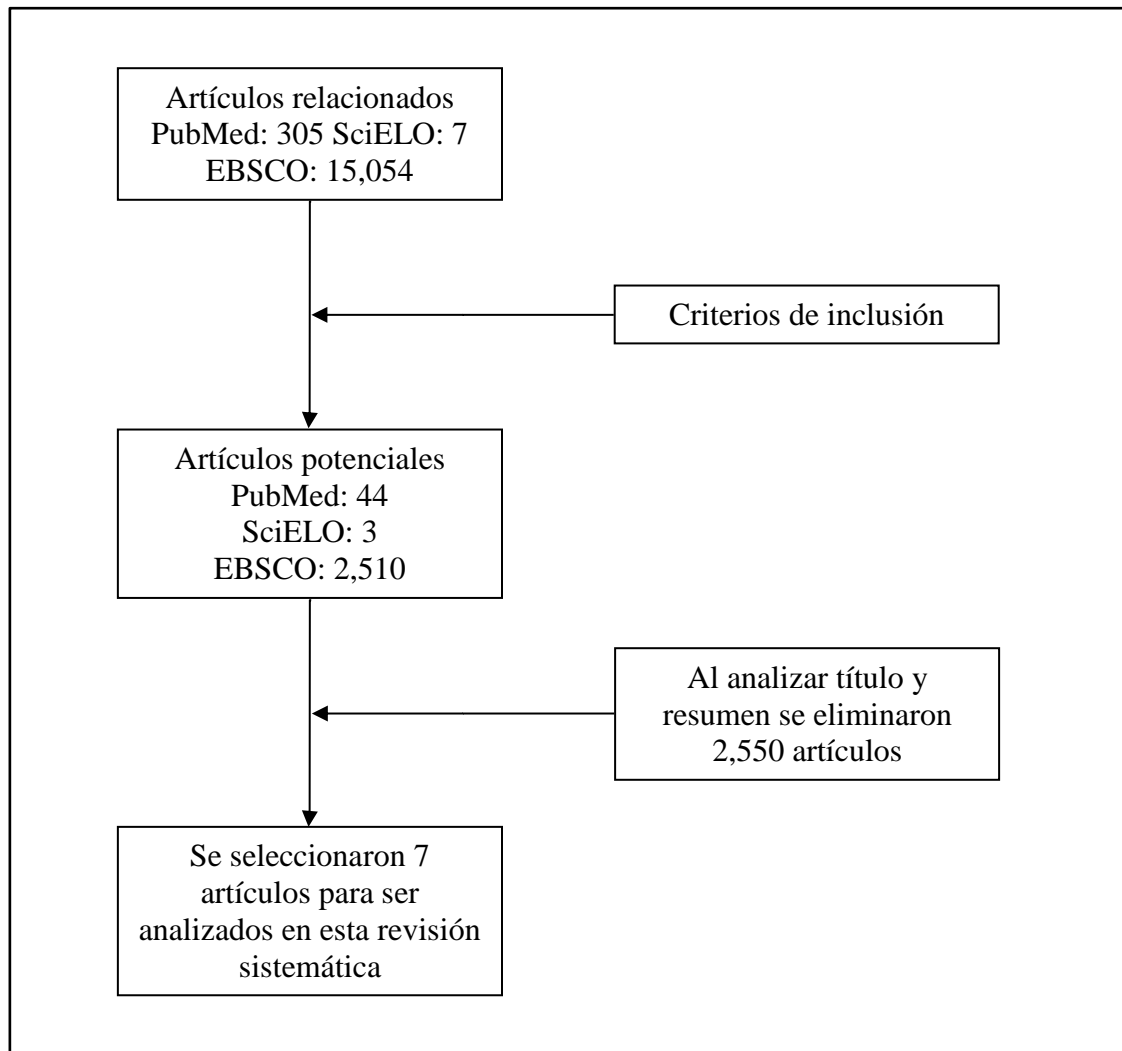


Fig. 1. Diagrama de flujo de la búsqueda electrónica y selección de artículos.

III. RESULTADOS

En esta revisión sistemática se analizaron siete estudios sobre el proceso de aislamiento de *Mycobacterium bovis* en productos lácteos no pasteurizados, los cuales se realizaron en diferentes países, Estados Unidos-México [14], Ethiopia [15], India [16], Túnez [17] y Brasil [18, 19 y 20]. En la Tabla 1 se muestra el tipo de producto lácteo analizado, el número de muestras, descripción relevante de la metodología y los hallazgos que obtuvieron. Se analizaron las diferentes metodologías para la descontaminación de las muestras, tales como el método de Kubica [14], original de Petroff [15-18], modificado de Petroff [19] y *Corper y Uyei* [20].

Solo un estudio analizó muestras de queso [14], los demás autores emplearon muestras de leche [15-20].

Tabla I. Descripción de estudios sobre micobacterias en productos lácteos.

| Referencia | Producto lácteo | Número de muestras | Descripción | Hallazgos |
|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|--|--|
| | | | | Número de muestras y el agente aislado e identificado |
| Harris et al. (2007) California | Queso fresco | 203 | Se homogenizaron 5 g. de queso con 45 ml de citrato de sodio al 2% por 2 min. Se descontaminaron 10 ml de muestra con 10ml de N-acetil-L-cisteína-NaOH al 2% con citrato trisódico al 0.05 M. Se inoculó 0.5 ml del sobrenadante en BACTEC 12B y BBL MGIT 960 . | 7 <i>M. fortuitum</i> , 1 <i>M. bovis</i> , 1 <i>M. moriokaense</i> , 1 <i>Mycobacterium sp.</i> |
| Fetene et al. (2008) Ethiopia. | Leche no pasteurizada | 72 | Se centrifugan 30 ml de leche, se descontaminan con NaOH al 4%, se neutraliza con HCl. Se centrifuga por 15 min a 4°C, el sedimento se analiza mediante tinción Ziehl-Neelsen y se aísla en Lowenstein Jensen, uno con piruvato de sodio al 1% y el otro con glicerol. | 2 <i>M. tuberculosis</i> , 5 <i>M. bovis</i> , 3 Micobacterias atípicas no identificadas. |
| Srivastava et al. (2008) India. | Leche no pasteurizada | 154 | Se descontaminaron 2 ml de leche con 2 ml de NaOH al 4% y se lavó con agua para sustituir la neutralización (Petroff's modificado). Se aisló en medio Lowenstein Jensen con y sin piruvato y se incubó a 37°C por 8 semanas. | 6 <i>M. bovis</i> , 4 <i>M. tuberculosis</i> . |
| Kahla et al. (2011) Tunisia. | Leche no pasteurizada | 306 | Se descontaminó 10 ml de leche con NaOH al 4% y neutralizó con HCl. Se centrifugó a 3,000 x g a 30 min y el sedimento fue inoculado en medio de Lowenstein Jensen y Coletsos. | 5 <i>M. bovis</i> , 1 <i>M. flavescens</i> , 5 Micobacterias no tuberculosas, 28 cultivos se |
| Zarden et al. (2012) Brasil. | Leche | 8 | Las muestras de 5 ml se descontaminaron con 3 diferentes métodos: NaOH al 4%, H ₂ SO ₄ al 12% y cloruro de cetil piridinio al 1.5%. Se centrifugaron, el sedimento fue inoculado en Lowenstein Jensen con piruvato al 0.5%. | 1 <i>M. bovis</i> . |
| Franco et al. (2013) Brasil. | Leche | 300 | De cada muestra se tomó una alícuota de 8ml se concentró a 10,000 rotaciones por minuto por 20 min, se decantó y se descontaminó el sedimento con NaOH al 4% y ácido sulfúrico al 4%. El sedimento se inoculó en medio Lowenstein Jensen y Stonebrink. Se incubó a 37°C por 90 días y se examinó semanalmente. | 6 <i>M. gordonae</i> , 3 <i>M. haemophilum</i> , 2 <i>M. immunogenum</i> , <i>novocastrense</i>) 1 <i>M. (bovis, flavescens, fortuitum, intracellulare, lentiflavum, mucogenicum, parafortuitum,</i> |
| Sgarioni et al. (2014) Brasil. | Leche pasteurizada y no pasteurizada | 52 | Se descontaminó 5 ml de muestra con ácido oxálico al 5% y se centrifugó a 3,000 x g por 10 min, por último se inoculó en Lowenstein Jensen y Stonebrink. | 5 <i>M. nonchromogenicum</i> , 4 <i>M. peregrinum</i> , 3 <i>M. (flavescens, smegmatis)</i> , 1 <i>M. (kansasii, neoaurum, scrofulaceum, chelonae)</i> . |

Enseguida se muestra una breve descripción de los resultados de cada estudio.

Beth Harris et al. (2007), llevaron a cabo un estudio en el que se analizaron 203 muestras de queso fresco decomisados en la frontera Tijuana-San Diego, entre los meses de marzo y agosto. Para el tratamiento preanalítico se tomaron 5 g de queso, se aplicó el método de Kubica para su descontaminación y se inoculó con 0.5 ml del sobrenadante en BACTEC 12B (se le adiciono 0.2 ml de BACTEC PANTA PLUS, 6.3 mg/ml de eritromicina) y en BBL MGIT 960 (se le adiciono 0.8 ml de BBL MGIT PANTA y 7.0 mg/ml de eritromicina). Las micobacterias aisladas se identificaron mediante el biotipo con pruebas bioquímicas estándar, posteriormente se confirmó mediante pruebas moleculares basadas en PCR, pruebas bioquímicas de niacina y nitrato y un kit para la identificación del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. Los resultados mostraron que siete fueron de *M. fortuitum*, una de *M. bovis*, una de *M. moriokaense* y una fue de *Mycobacterium* sp. (Similar a *M. moriokaense*). Seis muestras se contaminaron. Además, se determinó sensibilidad a antibióticos, todos fueron resistentes a Pirazinamida. Se genotipificó con la técnica de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica o en sus siglas en inglés RFLP para realizar rastreo epidemiológico, mostrando a Baja California, Sonora y Durango como los estados de donde provenían los microorganismos [14].

Fetene et al. (2008), realizaron un estudio caso-control en Etiopia en un periodo de seis meses, se estudiaron 210 ganaderos y 1,220 vacas, se formaron dos grupos para determinar el grado de la infección por tuberculosis, uno fue el ganado que pertenece a pacientes con tuberculosis y el otro fueron los pacientes con tuberculosis; como criterio de inclusión para el ganado bovino se realizó la prueba cutánea de la tuberculina, con resultado positivo en 72 animales. Se tomaron 30 ml de muestra de leche, se almacenaron las muestras a -20°C hasta su procesamiento. El tratamiento de descontaminación fue el método original de Petroff, se analizó una parte del sedimento con tinción de Ziehl-Neelsen para observarlo al microscopio y se inoculó en dos medios Lowenstein Jensen, uno con piruvato de sodio al 1% y el otro con glicerol. Para su identificación, se analizó su morfología colonial, patrones de crecimiento y pruebas bioquímicas con reducción de nitrato. Del total de muestras, en cuatro se aisló *M. tuberculosis* y en diez *M. bovis*. Tomaron como control a los que dieron la prueba de tuberculina negativo y como casos a los que dieron positivo. La prevalencia de tuberculosis fue significativamente mayor $p < 0.001$ en el ganado de los pacientes con tuberculosis que en el ganado de dueños sin tuberculosis. Y la infección por tuberculosis fue tres veces mayor en el ganado de los propietarios positivos [15].

Srivastava et al. (2008), realizaron un estudio en el norte de la India para aislar *M. bovis* y *M. tuberculosis* de ganado infectado, de un total de 768 muestras, 162 fueron de sangre de ganado, 160 de ganglios, 154 muestras de leche, 98 muestras de exudado faríngeo del ganado, 97 muestras de biopsia de recto y 97 muestras de excremento. La muestra se homogenizó, se resuspendió, centrifugó y se descontaminó de acuerdo al método estandarizado de Petroff. El tratamiento preanalítico de las muestras fue el siguiente, para la biopsia rectal se utilizaron 50 mg y se suspendieron en 1 ml de agua inyectable, para la muestra de excremento se tomaron 100 mg y se resuspendieron en 1 ml de solución salina, el aplicador para el exudado faríngeo se humedeció sumergiéndolo en 1 ml de solución salina estéril, para la muestra de leche se tomaron 2 ml, para los ganglios y la sangre heparinizada con EDTA se emplearon

0.5 ml de muestra. Se utilizaron 50 µl de muestra tratada para inocular los medios de cultivo Lowenstein Jensen con piruvato y sin piruvato, los tubos inoculados se incubaron a 37°C por 8 semanas. Para los cultivos positivos se le realizó tinción de Ziehl-Neelsen y pruebas bioquímicas con producción de niacina, reducción de nitratos, actividad de la catalasa al 68°C, hidrólisis de tween, arilsulfatasa e hidracida del ácido tiofenol-2-carboxílico (TCH). Se logró aislar en 40 muestras a *M. bovis* (19 en ganglios, nueve en sangre, seis en leche, dos en exudado faríngeo, tres en biopsia rectal y uno en

muestra de excremento) y en 14 muestras a *M. tuberculosis* (cinco en ganglios, cuatro en muestras de sangre, otras cuatro en leche y una en exudado faríngeo). Se identificó a *M. tuberculosis* con actividad positiva para niacina, reducción de nitrato, TCH y actividad negativa para catalasa a 68°C y arilsulfatasa. A *M. bovis* una actividad negativa para niacina, reducción de nitrato, catalasa a 68°C, hidrólisis de tween, arilsulfatasa y TCH [16].

Kahla et al. (2011), realizaron el aislamiento y la caracterización molecular de *M. bovis* en muestras de leche de 102 vacas en Túnez al norte de África, se muestreo en 3 ocasiones dando un total de 306 muestras, de octubre de 2005 a enero de 2006. Se tomaron 10 ml de muestra de leche no pasteurizada y el tratamiento preanalítico fue utilizando el método original de Petroff. El sedimento se inoculó en el medio de cultivo Lowenstein Jensen y Coletsos. Se incubó a 37°C por ocho semanas. A los aislamientos positivos se les realizó tinción Ziehl-Neelsen, se analizó la morfología colonial, la tasa de crecimiento e identificación molecular por PCR con Secuencias Repetidas en Tándem de Número Variable o en sus siglas en inglés VNTR y spoliotiping. Se logró el aislamiento de *M. bovis* en cinco cultivos, en una muestra se aisló *M. flavescens*, se aislaron en cinco muestras micobacterias no tuberculosas que no se logró identificar y 28 cultivos se contaminaron [17].

Zarden et al. (2012), realizaron una investigación en Brasil a 77 vacas consideradas libres de tuberculosis en los últimos cinco años, donde se les inyectó 0.1 ml de derivado proteico purificado o en sus siglas en inglés PPD (1 mg de proteína por ml de *M. bovis* cepa AN5) en el área cervical de cada vaca y 0.1 ml de PPD aviar (0.5 mg de proteína por ml de *M. avium*) a 20 cm de distancia cada una aproximadamente. Se analizaron las muestras de leche de ocho vacas con PPD negativo. Cada muestra se mezcló con Tween 80 al 0.1%, se tomaron alícuotas de 5 ml de cada muestra y se descontaminó utilizando tres métodos diferentes: con NaOH al 4% (Método de Petroff), con H₂SO₄ al 12% y cloruro de cetilpiridinio al 1.5%. El sedimento fue inoculado en el medio de cultivo Lowenstein Jensen con piruvato al 0.5%. Solo en un cultivo se aisló *M. bovis* y se identificó por la método de multiplex-PCR que emplea dos sets de primers simultáneamente: RvD1Rv2031c (500pb) específico para *M. bovis* y IS6110 (245pb) presentes en todas las especies del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*. De 77 vacas analizadas 17 fueron positivas, en siete muestras no se obtuvieron resultados. En cinco de las ocho muestras de leche de vacas con PPD negativos se aisló e identificó a *M. bovis* (cuatro por PCR y uno por biotipo) [18].

Franco et al. (2013), analizaron la presencia de micobacterias en muestras de leche bovina almacenadas en tanques, se recolectaron 300 muestras de leche no pasteurizada, de las cuales 100 fueron de tanques individuales, 100 de tanques colectivos y 100 de puntos de venta informal en la misma región de Brasil. De cada muestra se tomó una alícuota de 8 ml. La muestra se concentró a 10,000 rotaciones por minuto por 20 min. Se descontaminó con el método modificado de Petroff. A los aislamientos sospechosos se les hacía un frotis para teñirlo con la tinción Ziehl-Neelsen. Se aislaron micobacterias en 24 muestras de las cuales se les hizo diagnóstico molecular con la técnica de PCR-Análisis de Patrones de Restricción Enzimática (PRA). Como resultado seis se confirmaron como *M. gordonae*, tres se identificaron como *M. haemophilum*, dos fueron *M. immunogenum*, dos *M. novocastrense*, uno se identificó como *M. bovis*, uno más como *M. duvalii*, uno fue identificado como *M. flavescens*, uno como *M. fortuitum*, en una muestra se aisló *M. intracellulare*, en otra muestra se identificó *M. lentiflavum*, una muestra contenía *M. mucogenicum*, un bacilo fue identificado como *M. parafortuitum*, se aisló una especie de *M. smegmatis*, uno más de *M. terrae* y uno se identificó como *M. vaccae* [19].

Sgarioni et al. (2014), evaluaron la presencia de *M. bovis* y micobacterias no tuberculosas (MNT) en leche pasteurizada y no pasteurizada en Paraná, Brasil. Se analizaron 52 muestras de leche, 20 muestras

de leche pasteurizadas (mediante un muestreo al azar) y 32 muestras de leche no pasteurizadas (de establos) entre abril a mayo de 2011 en la región de Maringá, estado de Paraná, Brasil. Las muestras se procesaron el mismo día que se muestrearon. El tratamiento preanalítico de las muestras fue con el método de *Corper y Uyei*. Se tomó 200 µl del sedimento y se inoculó en los medios de cultivo Lowenstein Jensen y Stonebrink se incubaron a 35°C en una atmósfera de CO₂ con una concentración del 5 al 10% y a 30°C en una atmósfera aerobia por tres meses en ambas condiciones ambientales de crecimiento. A las colonias sospechosas se les realizó tinción de Ziehl-Neelsen, para observar los bacilos alcohol ácido resistente. Se lograron aislar e identificar cinco cepas de *M. nonchromogenicum*, cuatro especímenes se identificaron como *M. peregrinum*, tres fueron *M. flavescens*, en tres muestras se identificó a *M. smegmatis*, una cepa aislada fue identificada como *M. kansasii*, una como *M. neoaurum*, una más como *M. scrofulaceum* y en una muestra se aisló e identificó a *M. chelonae*. Las micobacterias fueron identificadas considerando sus características morfológicas, análisis de ácidos micólicos. Y confirmadas por el método PCR-Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (PCR-PRA) [20].

IV. DISCUSIÓN

En cuanto a hallazgos se refiere, Harris et al. [14] lograron aislar 10 cepas de micobacterias, Sgarioni et al. [20] aislaron 19, Feten et al. [15] y Srivastava et al. [16] aislaron 10, Khala et al. [17] 11 micobacterias, Zarden et al. [18] aislaron una micobacteria y Franco et al. [19] aislaron 24 cepas.

La identificación de micobacterias estuvo sujeta a cada autor de esta revisión, utilizando la tradicional tinción de Ziehl-Neelsen, pruebas bioquímicas y morfología colonial hasta técnicas moleculares como: kits comerciales con sondas para el complejo *M. tuberculosis*, PCR utilizando el gen 16sRNA, técnicas como VNTR y spoligotiping, PCR-multiplex y PCR-PRA.

Harris et al. [14] utilizaron para la identificación de las micobacterias, pruebas bioquímicas, un kit comercial con sondas para el complejo *M. tuberculosis* y PCR usando el gen 16sRNA. Para Feten et al. [15] las pruebas que utilizaron para clasificar taxonómicamente el total de sus aislamientos fue insuficiente debido a que sus resultados muestran un 30% de cepas de micobacterias no identificadas. Srivastava et al. [16], para la identificación de sus cepas se basaron en pruebas de biotipo tales como, la actividad para niacina, reducción de nitratos, hidracida del ácido tiofenol-2-carboxílico (TCH), actividad de la catalasa a los 68°C y arilsulfatasa. Kahla et al. [17] utilizaron para la identificación de sus cepas la morfología colonial, tasa de crecimiento e identificación molecular por PCR con metodología VNTR y spoligotiping. Zarden et al. [18] identificaron una micobacteria con ayuda de la técnica PCR-multiplex. Franco et al. [19] emplearon para la identificación de micobacterias la técnica de diagnóstico molecular por PCR-PRA (Análisis de Restricción Enzimática), y por último a Sgarioni et al. [20] consideraron para la identificación de sus cepas las características morfológicas, análisis de ácidos micólicos y diagnóstico molecular por PCR-PRA.

Harris et al. [14], utilizaron como tratamiento preanalítico durante la descontaminación de muestras el método de Kubica, basado en el uso de N-acetil L-cisteína con hidróxido de sodio al 2% (NALC-NaOH 2%), en comparación con otros autores como Fetene et al. [15], Srivastava et al. [16], Kahla et al. [17], que lavaron el sedimento con agua destilada en lugar de neutralizar como lo marca el método original de Petroff, Zarden et al. [18], utilizaron tres métodos de descontaminación (Petroff, Löwenstein-Sumiyoshi y Smithwick), por último Franco et al. [19], utilizaron el método de Petroff, un tratamiento preanalítico considerado como agresivo debido al uso de NaOH al 4% directo a la muestra.

Sgarioni et al. [20], a diferencia de todos, utilizan la técnica de *Corper* y *Uyei* que sustituye al agente descontaminante hidróxido de sodio por ácido oxálico.

Otros autores al igual que Sgarioni et al. [20] han empleado como descontaminante al ácido oxálico al 5% [21] y otros han utilizado cloruro de cetilpiridinio, por sus siglas en inglés (HPC) al 1 % [22], al 0.75% [23, 31] o al 0.5% [24].

La elección del descontaminante dependerá del microorganismo a aislar, así como también del tipo de muestra a analizar. Para recuperar a *M. bovis* se emplea comúnmente al ácido oxálico al 5% y al NaOH al 2 o al 4%. Otro compuesto recomendado es al cloruro de cetilpiridinio, que tiene baja toxicidad para *M. bovis* y *M. avium*. El NALC-NaOH se ha empleado para recuperar a *M. tuberculosis* de muestras clínicas y *M. bovis* de muestras de queso [25].

El método de Petroff modificado es el más utilizado para la descontaminación de muestras con NaOH, antes de ser inoculadas en los medios selectivos para micobacterias. Un artículo muestra que el método modificado de Petroff tiene un menor número de muestras contaminadas y mayor número de aislamientos comparado con el método original de Petroff [28]. Así como también el método de Kubica tiene menor cantidad de muestras contaminadas y un mayor número de aislamientos comparado con los métodos de Petroff [29, 26].

Otra metodología que se menciona es la de *Corper* y *Uyei*, que utilizan al ácido oxálico al 5% como descontaminante, es más efectivo para descontaminar muestras contaminadas con *Pseudomonas* y recuperación del complejo *Mycobacterium avium* [27] y el método de Smithwick no es tan efectivo como el método de Kubica, pero resulta una alternativa ya que es más económico [30].

V. CONCLUSIONES

De los siete estudios, cuatro de ellos analizan más de 100 muestras obteniendo entre diez y 24 aislamientos. En cambio los que analizaron menos de 100 muestras obtuvieron entre uno y 19 aislamientos. Aparentemente quiere decir que a mayor número de muestras analizadas, incrementa la probabilidad de aislar más micobacterias, pero, al calcular las porciones de acuerdo al tamaño de la muestra se observa que no depende del número de estas, sino de otros factores que influyen en la contaminación por micobacterias, tales como, las condiciones de higiene, o de la misma toma de muestra.

Los autores que obtuvieron la identificación del 100% de sus aislamientos fueron: Srivastava et al., empleando pruebas bioquímicas, Zarden et al., utilizando PCR-multiplex, Franco et al., y Sgarioni et al., realizaron diagnóstico molecular por PCR-PARA.

Para los medios de cultivo la mayoría utilizó medios sólidos Lowenstein Jensen enriquecidos con piruvato con excepción de Harris et al., que emplea medios líquidos para sus muestras de queso añadiéndole eritromicina como inhibidor de otros microorganismos contaminantes de la muestra.

No se puede comparar la eficacia de los descontaminantes o de los medios de cultivo ya que no todos los autores reportaron el número de muestras contaminadas. Sin embargo, Harris et al., reportan muestras contaminadas utilizando el método de Kubica con una eficacia del 97% y Kahal et al., utilizaron el método de Petroff con 91% de eficacia.

REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud. Día Mundial de la Tuberculosis 2015. <http://www.who.int/tb/es/> Acceso el 1 de noviembre de 2015.
- [2] Pérez L, Milián F, Arraiga C, Romero C, Escartin M. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en zona endémica de Querétaro, México, Salud Pública de México. 2008; 50(4):286-288 y 290.
- [3] LoBue P, LeClair J, Moser K. Contact investigation for cases of pulmonary Mycobacterium bovis. Int. J. Tuberculosis Lung Dis. 2004; 8(7):868–872.
- [4] Malama S, Bjordal T, Bwaya J, Munyeme M, Mbulo G, Muwonge A, Djonne B, Godfroid J. Characterization of Mycobacterium bovis from Humans and Cattle in Namwala District, Zambia. Veterinary Medicine International. 2014; Art ID 187842[1].
- [5] Müller B, Salome D, Alonso S, Hattendorf J, Laisse CJM., Parsons SDC., Helden PD, Zinsstag J. Zoonotic Mycobacterium bovis-induced Tuberculosis in Humans. CDC. 2013; 19(6):899-904.
- [6] López LM., Díaz F, Vallecillo AJ., Esquivel H, Gutiérrez JA. Tuberculosis humana y bovina en Latinoamérica: De estudios sobre virulencia hacia herramientas para su control. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2006; 48(2):173-175.
- [7] World Organisation for Animals Health. Terrestrial Animal Health Code. Bovine Tuberculosis. http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_bovine_tuberculosis.htm Acceso el 1 de noviembre del 2015.
- [8] [8] Laniado R, Muñoz R, García RA., Vargas AC., Villa C, Ocegüera L. Molecular Characterization of Mycobacterium bovis Islotes from Patients with Tuberculosis in Baja California, México. Infeccion, Genetics and Evolution. 2014; 27:1-4.
- [9] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. <http://www.gob.mx/sagarpa> Acceso el 1 de noviembre del 2015.
- [10] Harrington R & Karlson A. Destruction of Various Kinds of Mycobacteria in Milk by Pasteurization. Applied Microbiology. 1965; 13(3):1-2.
- [11] Norma Oficial Mexicana. NOM-035-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Quesos de Suero. Especificaciones Sanitarias. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/035ssa13.html> Acceso del noviembre del 2015.
- [12] Evans JT., Grace E, Banerjee A, Smith R, Dale J, Innes J, Hunt D, Tweddell A, Wood A, Anderson C, Hewinson RG., Smith NH., Hawkey PM., Sonnenberg, P. Cluster of human tuberculosis caused by Mycobacterium bovis: evidence for person-to-person transmission in the UK. The Lancet. 2007; 369:1270.
- [13] Secretaría de Salud. Perfil Epidemiológico de la Tuberculosis en México. SINAVE. 2012; 17 y 41. <http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/senasica/Paginas/default.aspx> Acceso el 12 de Noviembre del 2015.
- [14] [14] Harris NB., Payeur J., Bravo D., Osorio R., Stuber T., Farrell D., Paulson D., Treviso S., Mikolon A., Rodriguez-Laniz A., Cernek-Hoskins Shannon., Rast R., Ginsberg M. and Kinde H. Recovery of Mycobacterium bovis from Fresh Cheese Originating in Mexico. Environmental Microbiology. 2007; 73(3): 1025-1028.
- [15] Fetene T., N. Kebede and G. Alem. Tuberculosis Infection in Animal and Human Populations in Three Districts of Western Gojam, Ethiopia. Zoonoses public health. 2011; 58:47-53.
- [16] Srivastava K., DS. Chauhan, P. Gupta, HB. Singh, VD. Sharma, VS. Yadav, Sreekumaran, ss. Thakral, JS. Dharamdheeran, P. Nigam, HK. Prasad and VM. Katoch. Isolation of Mycobacterium bovis & M. tuberculosis from Cattle of Some Farms in North India - Possible relevance in human health. Indian j Med Res. 2006; 128:26-31.

- [17] Kahla Ben I., ML. Boschiroli, F. Souissi, N. Cherif, M. Benzartin, J. Boukadida, S. Hammami. Isolation and Molecular Characterisation of Mycobacterium bovis from Raw Milk in Tunisia. *African Health Sciences*. 2011; 11(1):2-5.
- [18] Zarden CFO., CD. Marassi, EEES. Figueiredo, W. Lilendaum. Mycobacterium bovis Detection from Milk of Negative Skin Test Cows. *Veterinary Record*. 2013; 172:1-3.
- [19] Franco MMJ., AC. Paes, MG. Ribeiro, JCF. Pantoja, ACB. Santos, M. Mayata, CQF. Leite, RG. Motta and FJP. Listoni. Occurrence of Mycobacteria in Bovine Milk Samples from Both Individual and Collective Bulk Tanks at Farms and Informal Markets in the Southeast Region of Sao Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*. 2013; 9:1-8.
- [20] Sgarioni SA., RDC. Hirata, MH. Hirata, CQF. Leite, KA. Prince, SRA. Leite, DV. Filho, VLD. Siqueira, KRC. Ferracioli, RF. Cardoso. Occurrence of Mycobacterium bovis and Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM) in Raw and Pasteurized Milk in the Northwestern Region of Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014; 45(2):707-711.
- [21] Fujimura CQL., IS. Anno, SRA. Leite, E. Roxo, GP. Morlock, RC. Cooksey. Isolation and Identification of Mycobacteria from Livestock Specimens and Milk Obtained in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2003; 98(3):319-323.
- [22] Michel AL., C. Geoghegan, T. Hlokwe, K. Raseleka, WM. Getz, T. Marcotty. Longevity of Mycobacterium bovis in Raw and Traditional Souring Milk as Function of Storage Temperature and Dose. *Ploسة one*. 2015:1-12.
- [23] Gao A., J. Odumeru, M. Raymond, L. Mutharia. Development of Improved Method for Isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from Bulk Tank Milk: Effect of Age of Milk, Centrifugation, and decontamination. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2005; 69:81-87.
- [24] BhanuRekha V., L. Gunaseelan, G. Pawar, R. Nassiri and S. Bharathy. Molecular Detaction of Mycobacterium tuberculosis from Bovine Milk Samples. *J. Adv. Vet. Anim. Res*. 2015; 2(1):80-83.
- [25] Rowe MT. and J. Donaghy. Mycobacterium bovis: The Importance of Milk and Dairy Products as a Cause of Human Tuberculosis in the UK. A Review of Taxonomy and Culture Methods, with Particular Reference to Artisanal Cheeses. *International Journal of Dairy Technology*. 2008; 61(4):317-326.
- [26] Sharma M., RN. Misra, NR. Gandham, SV. Jadhav, K. Angadi, V. Wilson. Comparison of Modified Petroff's and N-Acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide Methods for Sputum Decontamination in Tertiary Care Hospital in India. *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University*. 2012; 5(2):97-100.
- [27] Fernández FAV., JE. Moreno, JG. Martín, JJP. Gutiérrez. Procedimientos en Microbiología Clínica, Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2003; SEIMC.ISBN:84-609-7032-9.
<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
- [28] Tripathi K., PC. Tripathi, S. Nema, AK. Shrivastava, K. Dwiwedi, AK. Dhanvijay. Modified Petroff's Method: an Excellent Simplified Decontamination Technique in Comparison with Petroff's Method. *International Journal of Recent Trends in Science And Technology*. 2014; 10 (3):461-464.
- [29] Chatterjee M., S. Bhattacharya, K. Karak, SG. Dastidar. Effects of Different Methods of Decontamination for Successful Cultivation of Mycobacterium tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2013; 138 (4):541-548.
- [30] Smithwick RW., CB. Stratigos, HL. David. Use of Cetylpyridinium Chloride and Sodium Chloride for the Decontamination of Sputum Specimens that are Transported to the Laboratory for the Isolation of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1975; 1(5):411-413.
- [31] OIE (2009). Chapter 2.4.7. Bovine Tuberculosis. OIE Terrestrial Manual 2009. http://www.oie.int/fileadmin/home/eng/health_standards/tahm/2.04.07_bovine_tb.pdf Acceso el 7 de diciembre del 2015.