



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Distribución geográfica de la tuberculosis humana y bovina e
identificación de especies en el Estado de México”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. Adrian Zaragoza Bastida

Comité Tutorial

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Académico

Dra. Lilia Patricia Bustamante Montes

Tutor Interno

Dr. Jaime Nicolás Jaramillo Paniagua

Tutor Externo

Toluca, Estado de México

2013



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Distribución geográfica de la tuberculosis humana y bovina e
identificación de especies en el Estado de México”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C. Adrian Zaragoza Bastida

Comité Tutorial

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Académico

Dra. Lilia Patricia Bustamante Montes

Tutor Interno

Dr. Jaime Nicolás Jaramillo Paniagua

Tutor Externo



Toluca, Estado de México

2013

A mi hermosa familia Nallely, A. Emilio e Ian Fabian

y

A mis padres Camilo y María Teresa

AGRADECIMIENTOS.

A dios por haberme permitido llegar hasta este nivel académico y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi familia que directa o indirectamente siempre estuvieron al pendiente y mostraron su apoyo en todo este proceso académico.

A la Dra. Ninfa Ramírez Durán por aceptarme como su alumno, por su orientación, por su constante apoyo y dedicación durante todo este proceso.

A los integrantes del comité tutorial: Dra. Lilia Patricia Bustamante Montes y Dr. Jaime Nicolás Jaramillo Paniagua por sus invaluable observaciones durante todo este proceso.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Medica y Ambiental FM-UAEMex.

INSTITUCIONES.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el recurso económico para mi manutención durante el programa de Doctorado.

Al Instituto de Salud del Estado de México (ISEM) por proporcionarnos los datos de los casos de tuberculosis.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por su apoyo para lo obtención de muestras de esputo.

Al Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPM) por proporcionarnos los datos de los hatos positivos a tuberculosis bovina y su apoyo para la captación de muestras de bovinos.

ÍNDICE GENERAL

	No. página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. ANTECEDENTES	3
1.1. Tuberculosis	3
1.1.1. Agente etiológico de la tuberculosis	3
1.1.2. Diferencias entre <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i>	4
1.1.3. Patogenia de la tuberculosis humana causada por <i>M. tuberculosis</i>	5
1.1.4. Patogenia de la tuberculosis humana causada por <i>M. bovis</i>	6
1.1.5. Cuadro clínico en humanos	6
1.1.6. Patogenia de la tuberculosis bovina causada por <i>M. bovis</i>	7
1.1.7. Cuadro clínico en bovinos	8
1.2. Técnicas de diagnóstico para micobacterias.	8
1.2.1. Técnicas tintoriales para el diagnóstico de la tuberculosis	8
1.2.2. Cultivo microbiológico de las micobacterias	9
1.2.3. Técnicas de biología molecular para el diagnóstico de las micobacterias	10

1.2.3.1. Genotipificación de micobacterias con endonucleasas de restricción	11
1.2.3.2. Tipificación de micobacterias con oligonucleótidos espaciadores	11
1.2.3.3. Equipos comerciales para la amplificación genética de las micobacterias	11
1.2.3.4. Marcador filogenético presente en el gen rRNA 23S	12
1.2.3.5. Identificación genética de especies bacterianas utilizando el gen rRNA 16S	12
1.3. Epidemiología de la tuberculosis	15
1.3.1. Epidemiología de la tuberculosis humana a nivel mundial	15
1.3.2. Epidemiología de la tuberculosis humana en México	15
1.3.3. Epidemiología de la tuberculosis humana en el Estado de México	16
1.3.4. Epidemiología de la tuberculosis bovina	16
1.4. Sistemas de Información Geográfica (SIG)	18
1.4.1. Aplicación de los SIG en salud	18
1.4.2. Usos de los SIG en salud pública	19
1.4.3. Estadístico espacial SCAN	20
1.4.4. SIG aplicados en estudios de tuberculosis humana	21
1.4.5. SIG aplicados en estudios de tuberculosis bovina	21
1.4.6. Modelos de predicción con SIG	22

2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
3.	HIPÓTESIS	24
4.	OBJETIVOS	24
5.	JUSTIFICACIÓN	25
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.1.	Diseño de estudio	26
6.1.1.	Tipo de estudio	27
6.1.2.	Tamaño de muestra	27
6.2.	Criterios de inclusión y eliminación	28
6.3.	Procedimientos	29
6.3.1.	Tuberculosis humana. Etapa 1	29
6.3.1.1.	Análisis espacial	29
6.3.1.1.1.	Obtención de datos de la población	29
6.3.1.1.2.	Obtención de casos de tuberculosis humana	30
6.3.1.1.3.	Datos de localización geográfica	30
6.3.1.1.4.	Análisis estadístico y geográfico	30
6.3.1.2.	Análisis espacial y temporal	31
6.3.2.	Tuberculosis humana. Etapa 2	31
6.3.2.1.	Captación de muestras de esputo	31
6.3.2.2.	Procesamiento de la muestra en el laboratorio	32
6.3.2.2.1.	Tinción de Ziehl-Neelsen	33

6.3.2.2.2. Descontaminación de la muestra de esputo	33
6.3.2.2.3. Segunda tinción de Ziehl-Neelsen	34
6.3.2.2.4. Cultivo y aislamiento	34
6.3.2.2.5. Tinción de Ziehl-Neelsen a las cepas aisladas	35
6.3.2.2.6. Identificación genética de micobacterias	
aisladas de esputo	35
6.3.2.2.6.1. Extracción de material genético	35
6.3.2.2.6.2. Amplificación del marcador	
filogenético	37
6.3.2.2.6.3. Amplificación del gen rRNA 16S	38
6.3.2.2.6.4. Identificación de especies	38
6.3.2.2.6.5. Análisis filogenético	38
6.3.3. Tuberculosis bovina. Etapa 1	39
6.3.3.1. Análisis espacial y temporal	39
6.3.3.1.1. Obtención de casos tuberculosis bovina	39
6.3.3.1.2. Localización geográfica	39
6.3.3.1.3. Análisis estadístico y geográfico	39
6.3.3.2. Modelo de predicción	40
6.3.3.2.1. Obtención de casos de tuberculosis bovina	40
6.3.3.2.2. Obtención de variables ambientales	40
6.3.3.2.3. Obtención de variables demográficas	40

6.3.3.2.4. Análisis estadístico	40
6.3.4. Tuberculosis bovina. Etapa 2	41
6.3.4.1 Obtención de muestras de leche y exudado nasal de bovinos	41
6.3.4.2. Procesamiento de las muestras de leche y exudado nasal en el laboratorio	42
6.3.4.2.1. Tinción Ziehl-Neelsen	42
6.3.4.2.2. Inoculación de medios de cultivo	42
6.3.4.2.3. Clasificación de las cepas aisladas	43
6.3.4.2.4. Identificación genética de las bacterias aisladas de bovinos	43
6.3.4.2.4.1. Extracción de material genético	44
6.3.4.2.4.2. Amplificación del marcador filogenético	44
6.3.4.2.4.3. Amplificación del Gen rRNA 16S	45
6.3.4.2.4.4. Identificación de especies	45
6.3.4.2.4.5. Análisis filogenético	45
6.4. Variables de estudio	46
6.5. Implicaciones bioéticas	46
7. RESULTADOS	47
7.1. Título corto del artículo publicado	47

7.1.1.	Página frontal del manuscrito	47
7.1.2.	Carta de aceptación	48
7.1.3.	Abstract	49
7.1.4.	Introduction	49
7.1.5.	Materials and methods	51
7.1.6.	Results	58
7.1.7.	Discussion	58
7.1.8.	Conclusions	59
7.1.9.	Acknowledgements	59
7.1.10.	References	59
7.2.	Titulo corto del artículo enviado	62
7.2.1.	Página frontal del manuscrito	62
7.2.2.	Carta de envío	63
7.2.3.	Abstract	64
7.2.4.	Introduction	65
7.2.5.	Methodology	67
7.2.6.	Results	69
7.2.7.	Discussion	73
7.2.8.	Conclusions	75
7.2.9.	Acknowledgments	75
7.2.10.	References	75

7.3.	Resultados adicionales	79
7.3.1.	Tuberculosis humana. Etapa 1	79
7.3.1.1.	Análisis espacial	80
7.3.1.2.	Análisis espacial y temporal	81
7.3.2.	Tuberculosis humana. Etapa 2	84
7.3.2.1.	Captación de muestras de esputo	84
7.3.2.2.	Procesamientos en el laboratorio	87
7.3.2.2.1.	Tinción de Ziehl-Neelsen.	87
7.3.2.2.2.	Aislamiento de cepas de <i>Mycobacterium</i> sp.	87
7.3.2.2.3.	Identificación genética de <i>Mycobacterium</i> sp. aisladas de esputo	88
7.3.2.3.	Análisis filogenético	92
7.3.3.	Tuberculosis bovina. Etapa 1	94
7.3.3.1.	Análisis espacial y temporal	95
7.3.3.2.	Modelo de predicción	96
7.3.4.	Tuberculosis bovina. Etapa 2	98
7.3.4.1.	Captación de muestras de leche y exudado nasal de bovinos	98
7.3.4.2.	Procesamientos en el laboratorio	98
7.3.4.2.	Tinción de Ziehl- Neelsen	98

7.3.4.3. Aislamiento de cepas a partir de muestras de leche y exudado nasal	99
7.3.4.4. Identificación genética de cepas de <i>Mycobacterium</i> sp.	101
7.3.4.5. Análisis filogenético	103
8. DISCUSIÓN GENERAL	105
9. CONCLUSIONES GENERALES	111
9.1. Conclusiones	111
9.2. Limitaciones	112
9.3. Recomendaciones	113
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
11. ANEXOS	123
11.1. Anexo 1. Consentimiento informado	123
11.2. Anexo 2. Hoja de captura	124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página.
1	Clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial utilizando ventanas de búsqueda $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.	82
2	Clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial y temporal utilizando ventanas de búsqueda $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.	83
3	Ubicación de las Clínicas del IMSS de donde se colectaron las muestras de pacientes.	85
4	Características demográficas de los pacientes con baciloscopía positiva.	85
5	Características sociodemográficas de los pacientes con baciloscopía positiva.	86
6	Síntomas clínicos de los pacientes con baciloscopía positiva.	86
7	Enfermedades de los pacientes con baciloscopía positiva.	87
8	Resultados de las baciloscopias y aislamientos a partir de las muestras de esputo.	89
9	Comparación de las secuencias de las cepas aisladas con las cepas depositadas en Gen Bank, utilizando BLAST y Eztaxon.	91
10	Comparación de las características de los pacientes con aislamiento de BAAR y sin aislamiento de BAAR.	93
11.	Clústers de tuberculosis bovina identificados por permutación espacial y temporal con ventanas de búsqueda de $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.	95
12.	Número de muestras captadas de los hatos muestreados en el Sur del Estado de México.	99
13	Número de cajas y tubos con crecimiento bacteriano de las muestras de bovinos	99
14	Agrupación de las cepas aisladas de muestras de bovinos de acuerdo a características macroscópicas y microscópicas.	100
15	Comparación de las secuencias de las cepas aisladas de bovinos con las cepas depositadas en Gen Bank, utilizando BLAST y Eztaxon.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página.
1	Ubicación del Estado de México y la distribución geográfica de los casos de tuberculosis durante los años 2010-2006.	79
2	Frecuencia de casos de Tuberculosis en el Estado de México, durante los años 2010-2006.	80
3	Ubicación geográfica de los clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial con ventanas de búsqueda de $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.	82
4.	Ubicación geográfica de los clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial y temporal con ventanas de búsqueda de $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.	84
5	Amplificación del marcador filogenético en cepas aisladas de muestras de esputo.	88
6	Amplificación del gen rRNA 16S a las cepas aisladas de las muestras de esputo.	91
7	Árbol filogenético construido con secuencias del gen rRNA 16S de las cepas aisladas y cepas de colección.	92
8	Distribución geográfica de los hatos de tuberculosis bovina del Estado de México, durante el periodo 2005-2010.	94
9	Ubicación de los clústers de tuberculosis bovina detectados por permutación espacial y temporal.	96
10	Variabes demográficas y ambientales del Estado de México, utilizadas en el modelo de predicción de la tuberculosis bovina.	97
11.	Mapa de predicción de la tuberculosis bovina en el Estado de México utilizando el modelo de distancia de Mahalanobis.	98
12	Amplificación del marcador filogenético en las cepas aisladas de bovinos.	102
13	Amplificación del gen rRNA 16S de las cepas aisladas de bovinos.	102
14	Árbol filogenético construido con secuencias del gen rRNA 16S de las cepas aisladas y cepas de colección.	104

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad crónica e infecciosa que persiste en la población humana y bovina. Los Sistemas de Información Geográfica han sido utilizados en los últimos años para identificar la distribución espacial y temporal de la tuberculosis humana y bovina. Actualmente las herramientas de biología molecular son muy útiles para identificar las principales especies del género *Mycobacterium* involucradas en infecciones.

En 1992 Roller y col. identificaron un marcador filogenético presente en el gen rRNA 23S de las bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina y citosina como las micobacterias, sin embargo para la identificación de bacterias el gen rRNA 16S es el más utilizado, debido a que está presente universalmente en las células procariotas.

El objetivo de la presente tesis fue identificar la distribución geográfica de la tuberculosis humana y bovina, así como la especie del género *Mycobacterium* predominante en las zonas de muestreo del Estado de México. Se utilizaron las bases de datos del Registro Nacional de Casos de Tuberculosis humana y de los hatos positivos a tuberculosis bovina reportados por el Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México, esta información fue analizada con el estadístico SCAN para determinar su distribución geográfica.

Los resultados del estadístico SCAN se tomaron como referencia para seleccionar las zonas de muestreo. Se recolectaron muestras de esputo en humanos y muestras de leche y exudado nasal en bovinos. Las muestras se inocularon en diferentes medios de cultivo selectivos para micobacterias; a las cepas aisladas se les amplificó el marcador filogenético antes descrito, las cepas que lo presentaron fueron identificadas por secuenciación y comparación del gen rRNA 16S.

Los resultados del estadístico SCAN indican que tanto la tuberculosis humana como la tuberculosis bovina no se distribuyen aleatoriamente en el Estado de México. Se aislaron 10 cepas de pacientes, de las cuales nueve presentaron una semejanza del 100% con los integrantes del complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae*). Una cepa tuvo semejanza del 99.9% con *Mycobacterium conceptionense*. De las muestras de bovinos, seis de las 13 cepas aisladas tuvieron una semejanza del 99% con *Mycobacterium neoaurum*, cuatro con el 99% con *M. parafortuitum*, dos con el 99% con *M. morikaense* y las restante un 99% con *M. confluentis*.

SUMMARY

Tuberculosis is a chronic and infectious disease that persists in human and bovine populations. Geographic Information Systems have been used in recent years to identify the spatial and temporal distribution of human and bovine tuberculosis. Currently, molecular biology tools are useful to identify major *Mycobacterium* species involved in infections.

In 1992 Roller et al. identified a marker phylogenetic present in the 23S rRNA gene from Gram positive bacteria with high content of guanine and cytosine as mycobacteria, however for identification of bacterial 16S rRNA gene is the most widely used, because it is universally present in the prokaryotic cells.

The aim of this thesis was identify the current geographical distribution of human and bovine tuberculosis, and the predominant species of the genus *Mycobacterium* sampling in areas of the State of Mexico. We used the databases of Registro Nacional de Casos de Tuberculosis humana and bovine tuberculosis positive herds reported by the Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México, this information was analyzed using the statistical SCAN to determine their geographical distribution.

Samples were taken with reference to the statistical results of SCAN, sputum samples were collected in human and samples of milk and nasal exudate in bovines. The samples were inoculated on different selective media for mycobacteria, the bacteria isolated were amplified phylogenetic marker present in the 23S rRNA gene and the strains that amplified this marker were amplified and sequenced the 16S rRNA gene to identify the species of the strains.

SCAN statistical results indicate that both human and bovine tuberculosis are not randomly distributed distribution being concentrated in certain municipalities in the State of Mexico. In samples of human were isolated 10 strains, nine strains showed 100% similarity with members of the tuberculosis complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae*). One strain 99,928 % similarity with *Mycobacterium conceptionense*. In cattle samples were, six of 13 isolated strains had 99% similarity with *Mycobacterium neoaurum*, four have a 99% similarity with *M. parafortuitum*, two have a 99% similarity with *M. morikaense* and the remaining 99% with *M. confluentis*.

1. ANTECEDENTES.

1.1. Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa que afecta principalmente a los pulmones, la TB se trasmite por micro gotas generadas en el aparato respiratorio de pacientes con enfermedad pulmonar activa. La evolución de la TB es crónica y la formación de granulomas es la lesión patológica característica de esta enfermedad (1, 2).

1.1.1. Agente etiológico de la tuberculosis.

La TB es causada por micobacterias pertenecientes al complejo tuberculosis, el cual está integrado por *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. caprae* (3). Sin embargo el agente etiológico de la tuberculosis humana es el *M. tuberculosis* y el patógeno propio de los bovinos es el *M. bovis* el cual ha sido probablemente el agente zoonótico mas importante en la historia de la humanidad, ya que a pesar de algunas diferencias bioquímicas, estas dos especies comparten una homología nucleotídica del 99.95% entre sus genomas (4-6).

Las micobacterias se han clasificado en tres grupos, el primero de ellos y de mayor importancia en salud pública es el complejo tuberculosis mencionado anteriormente, el segundo grupo está constituido por micobacterias que causan la lepra, *Mycobacterium leprae* en humanos y *M. lepraenorum* bacteria que afecta principalmente a los roedores pero no es considerada zoonótica (7, 8). Por último se encuentra el grupo de las micobacterias atípicas denominadas así debido a que no tienen la capacidad de formar la lesión típica que producen las micobacterias que integran el complejo tuberculosis, este grupo está integrado por más de 50 especies y en la actualidad está tomando importancia en salud pública ya que están aumentando los casos de infecciones con estas micobacterias principalmente en pacientes con alteraciones en su sistema inmunológico (9, 10).

El género *Mycobacterium* está formado por bacilos ligeramente curvos o rectos de 0.2-0.6 µm por 1.0-10 µm, aerobios e inmóviles (11). Las micobacterias se caracterizan por tener un crecimiento lento a muy lento, las colonias son visibles después de 2 días o hasta 8 semanas de incubación, su temperatura óptima de crecimiento es a 37°C (12). Una característica importante de este género es su resistencia a la decoloración con ácidos por lo que son considerados bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), observándose los bacilos en color fucsia en la tinción Ziehl Neelsen, las micobacterias no se tiñen perfectamente con el método de Gram sin embargo están consideradas Gram positivas (13, 14).

Las micobacterias poseen aproximadamente un 60% de lípidos en su pared celular, lo que les confiere resistencia contra antibióticos y desinfectantes comunes, la pared está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos, arabinogalactano y peptidoglucano (14). Otra característica importante del género *Mycobacterium* es que en su genoma posee un alto contenido de guanina y citosina de 65 a 70% (15).

1.1.2. Diferencias entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

Estas dos especies están muy relacionadas, las diferencias son mínimas entre ellas, se basan en la velocidad de crecimiento en el medio de cultivo y en algunas propiedades bioquímicas. *M. tuberculosis* tiene un crecimiento lento eugónico, no forma pigmentos en ninguna circunstancia, no crece a temperatura ambiente, las colonias aparecen a partir de la tercera semana de incubación; este bacilo es aerobio, niacina positivo, reducción de nitratos positivo y su tolerancia a la sal es negativa (16). *M. bovis* crece más lento que *M. tuberculosis*, su morfología colonial es disgónica y no cromógena, sin embargo las colonias viejas tienden a ser amarillas; su crecimiento es muy pobre en medios que contengan glicerol, en medios a base de huevo crecen colonias pequeñas, redondas, blancas con bordes irregulares y una superficie granular después de 21 días, este bacilo es microaerófilo, niacina negativo, reducción de nitratos negativo (16) y presenta resistencia natural a la pirazinamida fármaco antituberculoso de primera línea (15, 17).

1.1.3. Patogenia de la tuberculosis humana causada por *M. tuberculosis*.

La TB pulmonar es la manifestación clínica más frecuente y se asocia a la inhalación de los bacilos tuberculosos provenientes de individuos infectados, quienes comúnmente los liberan al ambiente a través del estornudo y accesos tusígenos (1).

El periodo de incubación, puede variar desde el momento de la infección hasta 90 días, cuando el *M. tuberculosis* se establece en los pulmones de una persona aparentemente sana, se reproduce lentamente sin no hay impedimentos por el organismo (18). Las primeras células de defensa contra esta micobacteria son los polimorfo nucleares (PMNs), sin embargo estas células no tienen la capacidad de neutralizar o eliminar a esta micobacteria por lo que es necesario que se inicie la respuesta inmune secundaria o adquirida la cual comienza cuando las células presentadoras de antígenos presentan a estas bacterias en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), a partir de este momento se inicia la respuesta inmune celular que culmina con la formación de células de memoria específicas contra estas micobacterias.

Una vez identificados los bacilos, son rodeados por cuatro capas celulares, células epitelioides, células gigantes, linfocitos sensibilizados y fibroblastos, para impedir que continúen su multiplicación. A esta respuesta del huésped se le conoce como infección primaria o lesión granulomatosa y representa la principal herramienta del organismo para controlar a estas micobacterias (19). Cuando los mecanismos de defensa del individuo se encuentran en condiciones adecuadas, limitan al mínimo el desarrollo de los bacilos tuberculosos, sin embargo los bacilos permanecen latentes a la espera de que se experimente alguna depresión inmunológica que les permita reanudar su crecimiento y provocar la enfermedad. En la mayoría de los casos esta enfermedad es controlada por inmunidad celular y solo un 10 % desarrollará la enfermedad activa a lo largo de su vida (18).

1.1.4. Patogenia de la tuberculosis humana causada por *M. bovis*.

La infección primaria en los humanos puede llegar por inhalación o por ingestión, cuando la vía de transmisión es por inhalación de aerosoles a partir de ganado enfermo, se asume que la infección primaria ocurrirá en el pulmón, con mayor probabilidad de reactivación en el tracto respiratorio y ocasional diseminación a órganos distantes. La infección primaria da lugar a un síndrome pseudo gripal, tos seca y la progresión de la enfermedad puede dar lugar a tos productiva, fatiga y dolor torácico (17).

Cuando la vía de transmisión es ingestión de leche contaminada no pasteurizada, son más frecuentes la linfadenopatía cervical (escrófula), las lesiones intestinales o las cutáneas. Entre cinco y ocho semanas después de la ingesta de *M. bovis*, se inicia con un incremento en la temperatura corporal, odinofagia y linfadenopatía cervical. Se han descrito gastralgia y aumento de tamaño de los ganglios mesentéricos con o sin eritema nodoso. La reactivación tendrá lugar en un órgano abdominal, como la forma clásica de ileítis terminal o bien en un órgano distante por diseminación hematógena (20).

1.1.5. Cuadro clínico en humanos.

La tuberculosis generalmente es una enfermedad crónica, el cuadro clínico de la TB pulmonar puede variar, sin embargo los síntomas más regulares suelen ser: fiebre, pérdida de fuerza física, pérdida de peso progresiva, disnea y hemoptisis, esta última debido a que en la tuberculosis pulmonar los bacilos destruyen gradualmente el tejido pulmonar, las bacterias hacen agujeros irregulares donde se acumulan secreciones o flema. Los vasos sanguíneos son destruidos y la sangre se filtra hasta las cavidades pulmonares, debido esto los pacientes con tuberculosis a menudo expectoran sangre en las flemas (21).

El cuadro clínico puede avanzar hasta una tuberculosis miliar, la sintomatología respiratoria aumenta, con una disnea rápida, superficial, angustiosa, con aleteo nasal y leve cianosis en los labios, pabellón auricular y manos, debida a las dificultades hemáticas producidas por los granulomas en los pulmones. En el aparato digestivo los signos que llaman la atención son:

anorexia, lengua saburral, estreñimiento y tendencia al vomito. En el sistema nervioso se producen manifestaciones de meningitis, rigidez de la nuca, hiperestesia, temblores, parálisis de los pares craneales III y IV, midriasis y estrabismo (21).

1.1.6. Patogenia de la tuberculosis bovina causada por *M. bovis*.

La tuberculosis bovina (TBb) se propaga en los bovinos en dos etapas: a) complejo primario y b) diseminación post primaria. La principal vía de entrada del microorganismo es por vía aérea, seguida por la oral, una vez que infecta al huésped, la micobacteria genera una pequeña lesión granulomatosa en el sitio de ingreso y en el linfonódulo regional, lo que en conjunto se conoce como complejo primario de la infección el cual es usualmente localizado en el pulmón cuando la vía de entrada es aerógena (2, 22).

En un bovino inmunocompetente se genera una respuesta inmune protectora que elimina o encapsula al patógeno, siendo éste el curso habitual de la infección. La vulnerabilidad a la bacteria depende de una combinación de factores microbianos, ambientales y del propio huésped. Cualquier desequilibrio en los mecanismos inmunológicos implica la incapacidad de contener a las micobacterias, las cuales pueden iniciar su reproducción, formar granulomas y desarrollan masas parecidas a tumores llamados tubérculos; en casos avanzados pueden llegar a ser de gran tamaño y la porción central tiende a necrosis, finalmente la porción central es reducida a material caseoso y sufre una mineralización (5).

Los bacilos son transportados de los focos primarios vía linfática o sanguínea a otros órganos y tejidos donde se establecen y forman tubérculos, cuando el torrente sanguíneo es invadido por numerosos bacilos provenientes de una lesión local, pueden desarrollar tubérculos en diferentes órganos. La forma aguda de una infección generalizada es conocida como tuberculosis miliar. Una vez generalizada la tuberculosis al resto del organismo, se produce la enfermedad y se disemina al ambiente para continuar su ciclo en otros individuos susceptibles (20).

1.1.7. Cuadro clínico en bovinos.

En los bovinos la tuberculosis es asintomática en la mayoría de los casos, algunos bovinos con lesiones tuberculosas miliares extremas son clínicamente normales, los principales signos que se han reportado son: emaciación progresiva, debilidad, inapetencia, tos, disnea, taquicardia, diarrea intermitente y constipación. Debido a que es una enfermedad de curso crónico y debilitante los animales, se vuelven improductivos generando un impacto económico en el hato. A nivel pulmonar se caracteriza por tos crónica debida a una bronconeumonía, esta tos casi nunca es fuerte o paroxística y suele presentarse en forma de uno o dos golpes, retenido y húmedo. Se estimula fácilmente por presión sobre la faringe o por ejercicio. En casos avanzados, cuando gran parte del pulmón ha sido destruido es evidente la disnea con aumento de la frecuencia y de la profundidad de las respiraciones (23).

1.2. Técnicas de diagnóstico para micobacterias.

Las técnicas que en la actualidad se tienen para el diagnóstico de las micobacterias son muy diversas y las podemos englobar de la siguiente forma: a) observación de las micobacterias por medio de tinciones realizadas en extensiones de muestras clínicas, b) aislamiento de las micobacterias en medios de cultivo sólido y líquido, c) diagnóstico de las micobacterias mediante diferentes técnicas de amplificación genética de ácidos nucleicos.

1.2.1. Técnicas tintoriales para el diagnóstico de la tuberculosis.

El método Ziehl-Neelsen es el más utilizado y recomendado por la Organización Mundial para la Salud (OMS) y la Unión Internacional de Lucha contra la Tuberculosis (13). Este método aprovecha la característica de resistencia al ácido y al alcohol, típico de las micobacterias, siendo una herramienta sencilla, rápida y económica (24). Por ello, se recomienda su uso extensivo en lugares con pocos recursos o alejados de laboratorios regionales. Esta técnica permite identificar sujetos que expectoran por arriba de 5 000 células bacterianas/mL, que en general equivale a 50% de sujetos con tuberculosis pulmonar activa, esto presupone que se obtengan cuando menos tres muestras para el análisis de cada individuo sintomático. Debido a

la baja sensibilidad que tiene esta técnica y el trabajo en laboratorio que requieren, por lo que se han utilizado diferentes técnicas que aumentan la sensibilidad del método o que facilitan la identificación de bacilos como las tinciones fluorocrómicas (auramina-rodamina) y sustancias mucolíticas, las cuales mejoran la visualización de los bacilos en el microscopio.

1.2.2. Cultivo microbiológico de las micobacterias.

Una de las principales dificultades en el estudio de micobacterias en general y en el caso particular las tuberculosas, están relacionadas con las técnicas de cultivo. Esta dificultad es inherente a la biología misma de las micobacterias ya que el tiempo de replicación genómica es prolongado entre 22 y 24 horas, aunado a esto los requerimientos nutricionales son muy específicos entre especies de micobacterias (12).

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento de micobacterias se dividen principalmente en los que utilizan el huevo como base proteica y los medios sintéticos, entre los medios que utilizan el huevo destaca el Lowenstein-Jensen, este medio es adecuado para la recuperación de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum* y *M. intracellulare*, con muy buenos resultados, sin embargo debido a que contiene glicerol en su composición química inhibe o dificulta el crecimiento de *M. bovis*, por lo que en promedio se requiere de tres a ocho semanas para detectar crecimiento de esta especie (25).

Para la recuperación de *M. bovis* se utilizan medios como el Stonebrink el cual sustituye al glicerol por piruvato de sodio como fuente de energía. Otras micobacterias recuperadas con este medio a base de huevo son *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* (25).

Por otra parte el Middlebrook es un medio sintético el cual se utiliza para la purificación de colonias aisladas en los medios a base de huevo y es utilizado para el aislamiento de cepas de muestras clínicas en algunos laboratorios (26).

A partir de los 1970 se han utilizado medios líquidos enriquecidos con fuentes de carbono radioactivo (Bactec TB), los cuales disminuyen el tiempo en la recuperación de micobacterias,

sin embargo estos sistemas presenta algunas dificultades importantes como el costo del equipo y reactivos, el uso de radioactividad y el manejo de desechos. Por ello, se han probado alternativas en busca de resultados comparables, como el Tubo Indicador de Crecimiento Micobacteriano. La gran mayoría de los métodos en medios de cultivo líquido se basan en el cultivo líquido Middlebrook 7H9 complementados con nutrientes, en su mayoría catalasa, ácido oleico, albumina y dextrosa, así como agentes antimicrobianos (27).

1.2.3. Técnicas de biología molecular para el diagnóstico de las micobacterias.

La aplicación de técnicas de biología molecular ha transformado el conocimiento de las infecciones por micobacterias, permite identificar la mayor parte de las micobacterias atípicas y las que forman parte del complejo tuberculosis mediante el uso de sondas de ADN (28).

La genotipificación de las micobacterias se basa en el principio de la estabilidad genética por su reproducción asexual, donde una bacteria da origen a clones, de este modo se deduce que cepas de micobacterias con idéntico genotipo tienen el mismo origen y que cepas con genotipo diferente provienen de diferentes lugares. La importancia de la tuberculosis como una enfermedad re-emergente ha favorecido el desarrollo de numerosas técnicas de genotipificación para *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Algunas de estas técnicas utilizan todo el genoma para su análisis, otras necesitan gran cantidad de ADN de buena calidad ($\geq 1 \mu\text{g}$), lo que representa un problema por el lento crecimiento de las micobacterias. Por otro lado, existen técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), para el análisis de loci polimórficos que tienen mayor poder de discriminación, requieren una cantidad mínima de ADN ($< 1\text{ng}$) y permiten amplificar muestras con microorganismos poco viables o imposibles de recuperar, como es el caso de las micobacterias (15).

1.2.3.1. Genotipificación de micobacterias con endonucleasas de restricción.

Esta técnica es comúnmente conocida como fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) y ha sido ampliamente utilizada para relacionar brotes de tuberculosis en focos de

infecciones específicas o para estudiar su transmisión entre especies. Las sondas utilizadas han sido dirigidas a secuencias de inserción (IS), una de las más utilizadas para *M. tuberculosis* es la IS6110. RFLP- IS6110 es el método más utilizado debido a que analiza al elemento IS6110 integrado en diversos loci del genoma de las especies del complejo *M. tuberculosis*, este marcador es considerado estándar de oro para la evaluación de nuevos métodos de identificación y tipificación de cepas de *M. tuberculosis*. Algunas cepas de *M. tuberculosis* llegan a presentar hasta 25 copias (15, 24).

1.2.3.2. Tipificación de micobacterias con oligonucleótidos espaciadores.

Este método se basa en la identificación de los espaciadores presentes entre las repeticiones directas en la región DR del cromosoma. Las DR se componen de una secuencia repetida de 36 pares de bases (pb) conservada y de una secuencia espaciadora variable de 35 a 41 pb. A la fecha se han reportado 94 diferentes espaciadores entre los DR: el cromosoma de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv tiene 48 DR y el de *M. bovis* BCG 41. Para la genotipificación se utilizan de manera rutinaria 43 espaciadores, 37 de H37Rv y 6 de BCG. El polimorfismo generado por Spoligotyping tiene una reproducibilidad alta, dentro de y entre los laboratorios, actualmente este método se está utilizando para realizar estudios filogenéticos para identificar los integrantes del complejo tuberculosis a partir de las muestras clínicas (15).

1.2.3.3. Equipos comerciales para la amplificación genética de las micobacterias.

Los productos disponibles los podemos clasificar en aquellos que amplifican ADN y los que amplifican ARN. Entre los productos que amplifican ADN se encuentra el Amplicor® que comercializa la casa comercial Roche Diagnostic Molecular System. Amplicor® *Mycobacterium tuberculosis* Test es un equipo manual para detectar lo directamente de la muestra o de cultivo. La sensibilidad ofrecida por estos productos ha sido del 66-82% y una especificidad del 99-100% en muestras respiratorias, en comparación con los resultados obtenidos por cultivo. La sensibilidad ha oscilado entre el 50 y 60 % en las muestras Ziehl-Neelsen negativas (28, 29).

La casa comercial Gen-Probe tiene el producto que detecta *M. tuberculosis* por amplificación de ARN, como es el Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test (AMTDT). La amplificación de dianas de ARN tiene la ventaja de que, el ARN es más lábil que el ADN y por lo tanto el peligro de contaminaciones con amplicón es menor. AMTDT es una técnica manual, sencilla, que no requiere de instrumentación impórtate, fácil de aplicar en los laboratorios clínicos y que frece resultados rápidos y con una alta sensibilidad de 66-82% y una especificidad del 99% (28, 29).

1.2.3.4. Marcador filogenético presente en el gen rRNA 23S.

En 1992, Roller y col. determinaron la presencia de una inserción específica característica de las bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina y citosina (HGC), considerado como un marcador filogenético de aproximadamente 100 pb que se encuentra insertado en el gen rRNA 23S, este inserto se encuentra presente en 64 especies de bacterias Gram positivas entre las que se encuentra *Mycobacterium gordonae* (30).

Ramírez y col. 2006 utilizaron este marcador filogenético como un criterio de pureza en la preparación de ADN de actinomicetos obteniendo excelentes resultados al comparar con muestras contaminadas y muestras puras, concluyendo que se puede utilizar como un indicador de contaminación de la muestra con eubacterias (31).

1.2.3.5 Identificación genética de especies bacterianas utilizando el gen rRNA 16S.

Los ácidos nucleicos y las proteínas, cambian con el tiempo y pueden ser considerados cronómetros moleculares o documentos de la historia evolutiva, por ello se ha utilizado durante décadas para establecer las relaciones filogenéticas entre los seres vivos, creando un marco apropiado para su clasificación e identificación (32). El 16S rRNA es la macromolécula más utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana; de hecho la clasificación bacteriana incluida en los textos “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” and “*The Prokaryotes*”, basan su estructuración del mundo procariota en las relaciones filogenéticas establecidas con esta macromolécula (33).

El 16S rRNA es un polirribonucleótido de aproximadamente 1 500 pb codificado por el gen rrs (operón ribosómico), también denominado 16S 35 ADN ribosomal (rADN), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el 16S rRNA se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla (32).

El análisis de la secuencia de los 16S rRNA de distintos grupos filogenéticos revela un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma (34). Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte) de los miembros de un determinado grupo filogenético, y raramente están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos (32).

El método molecular de identificación bacteriana mediante secuenciación del 16S rRNA incluye tres etapas: a) amplificación del gen a partir de la muestra apropiada, b) determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón y c) análisis de la secuencia (34).

Amplificación.

La amplificación del gen rRNA 16S se realiza en un termociclador, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Como sustrato se utiliza ADN de un cultivo puro, para la extracción del ADN bacteriano existen protocolos estandarizados. La amplificación también puede conseguirse directamente de una colonia aislada o a partir de una muestra clínica, simplificando significativamente la identificación, al evitar el laborioso proceso de extracción del ADN (35).

Para la amplificación del gen rRNA 16S, las regiones conservadas facilitan el diseño de oligonucleótidos iniciadores (20 nucleótidos, aproximadamente). Cuando se pretende amplificar el gen prácticamente completo, se utilizan iniciadores diseñados en base a secuencias conservadas próximas a los extremos 5' y 3' del gen, que originan amplicón es de 1,500 pb, aproximadamente. Se ha demostrado que una identificación precisa no siempre requiere la amplificación completa del rRNA 16S. En estas circunstancias se utilizan

oligonucleótidos que permitan la amplificación de fragmentos más pequeños, preferentemente de 500 pb correspondientes al extremo 5' del gen. En cualquier caso, antes de pasar a la siguiente etapa es conveniente comprobar el producto mediante electroforesis en gel de agarosa, para asegurar la presencia de un único fragmento o amplicón del tamaño adecuado (32).

Secuenciación.

En esta etapa se llevan a cabo las reacciones de secuenciación y el análisis de los productos por electroforesis. Actualmente, se emplea la secuenciación cíclica, en una reacción similar a la de amplificación, que utiliza un único iniciador por reacción y terminadores marcados con fluorocromos adecuados, que interrumpirán la síntesis de manera aleatoria, y facilitarán la detección posterior de los fragmentos interrumpidos. La disponibilidad de secuenciadores automáticos facilita la etapa de detección. El número de bases generadas por un secuenciador automático es de 500 a 900, dependiendo del capilar utilizado en la electroforesis. Por ello, para la secuenciación de las dos cadenas del gen completo, serán necesarios de 8 a 4 iniciadores, dos de los cuales podrán ser los mismos utilizados en la amplificación.

Sin embargo, la secuencia obtenida podrá contener errores y/o presentar posiciones ambiguas. La obtención de la secuencia definitiva requiere la evaluación de los electroferogramas y la alineación de la cadena directa con la reversa, para resolver las posibles discrepancias. Así, aunque la secuenciación de una cadena del amplicón puede conducir a una correcta identificación, la calidad de la secuencia será óptima cuando la comparación de ambas cadenas se utilice para la corrección de errores (32).

Ya se ha indicado que la identificación de una bacteria a nivel de especie no requiere necesariamente la secuenciación del rRNA 16S completo. De hecho, aunque existen posiciones filogenéticamente informativas a lo largo de todo el gen, la mayor variabilidad se concentra en las primeras 500 bases, correspondientes al extremo 5'. Generalmente, esta secuencia de 500 bases será suficiente para la correcta identificación de un aislado clínico, necesitándose únicamente 2 iniciadores (34).

Análisis de la secuencia.

La última etapa es la comparación de la secuencia del rRNA 16S con las depositadas en bases de datos como GenBank, Ribosomal Database Project (RDP) y Eztaxon. Los valores de semejanza de las secuencias del gen 16S rRNA son importantes, por ello Stackebrandt y Ebers propusieron que el valor de semejanza se encuentre en un rango de 98.7-99%, dado que los valores de semejanza varían de acuerdo a los algoritmos utilizados en el alineamiento. La elección de la base de datos es importante, siendo recomendable la utilización de más de una de ellas, para comprobar si conducen al mismo resultado (36).

Se puede construir un árbol filogenético, que refleja, de forma esquemática, el grado de parentesco genético entre las bacterias comparadas (37).

1.3. Epidemiología de la tuberculosis.

1.3.1. Epidemiología de la tuberculosis humana a nivel mundial.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su informe del año 2010 señala que existen en todo el mundo alrededor de 9.4 millones de nuevos casos de TB (8.9 - 9.9 millones), lo que equivale a 137 casos por cada 100 mil habitantes, y se estimó que 1.1 millones de estos casos fueron positivos al virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Se estimó una mortalidad de 1.3 millones en VIH negativos lo que equivale a 20 millones de muertos por cada 100 mil habitantes. La mayor ocurrencia de casos se presenta en Asia con 55% y África con 30%, la menor proporción de casos ocurrió en la región Este del Mediterráneo con 7%, en la región Europea con 4% y en el Continente Americano solo el 3% (38).

1.3.2. Epidemiología de la tuberculosis humana en México.

En México esta enfermedad ocupa el lugar número 17 entre las causas de muerte y el primero como causa de muerte por un agente infeccioso (39). En el 2010 se reportaron 18, 848 casos de tuberculosis en todas sus formas clínicas, con una tasa del 16.77 por cada 100, 000 habitantes, 15, 384 casos correspondían con tuberculosis pulmonar (40). En lo referente a

mortalidad, en el año 2006 se registró una tasa de 1.8 por cada 100 mil habitantes, la población que presentó la mayor tasa de incidencia es el grupo de edad con 60 años y más, con respecto al género esta enfermedad afecta en mayor grado a los hombres en una razón de 1.5 a 1 (41).

La situación de la TB en las entidades federativas presenta patrones de concentración bien definidos, los Estados con tasas de incidencia elevadas están ubicados en el occidente y Golfo de México, la menor incidencia está en los Estados del centro del país. Cabe señalar que Tamaulipas y Baja California duplican la tasa nacional (13.5 por 100 mil habitantes), y junto con Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Sonora, Oaxaca y Chihuahua concentran 70% de los casos reportados en el país (41).

1.3.3. Epidemiología de la tuberculosis humana en el Estado de México.

En el Estado de México la TB se encuentra distribuida ampliamente en la totalidad del territorio, para el año 2005 se reportan 609 casos nuevos, representando una tasa del 4.1 por cada 100 mil habitantes, de los 609 casos nuevos solo el 69% terminaron el tratamiento y se encuentran clasificados como curados, en cuanto a la localización de la TB el 88% fue pulmonar (42). De acuerdo a los boletines epidemiológicos del Instituto de Salud del Estado de México (ISEM), en el año 2007 se reportaron 457 casos de tuberculosis, para el año 2008 fueron 468 casos y para el 2009 disminuyó a 410 casos, hasta la semana epidemiológica 52 (43).

1.3.4. Epidemiología de la tuberculosis bovina.

La tuberculosis bovina (TBb) tiene distribución mundial, por ser una enfermedad con potencial zoonótico, se encuentra ubicada en la lista de enfermedades de notificación de la Organización Mundial de Sanidad Animal, antes llamada Organización Internacional de Epizootias (OIE) (23), situación que ha estimulado a la mayoría de los países a establecer programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina (44).

Los programas para la erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino a nivel mundial, se han establecido en primera instancia para reducir las principales fuentes potenciales de infección para el hombre, como lo es la leche cruda y los derivados lácteos fabricados con leche de origen no pasteurizada, esto se ha observado con mayor frecuencia y principalmente en los países en vías de desarrollo (45, 46).

M. bovis es responsable de aproximadamente 700 casos nuevos de tuberculosis humana en América Latina, el problema se agudiza en pacientes inmunodeprimidos (con el virus de la inmunodeficiencia humana), ya que son más susceptibles a infecciones con esta especie (47). La información epidemiológica sobre el impacto del *M. bovis* en la salud humana es limitado debido a que el diagnóstico de la tuberculosis humana se realiza por medio de un frotis de esputo y a un cultivo bacteriológico en Lowenstein-Jensen, al respecto autores como Pérez y col. en el 2008 (48) y Srivastava y col. en el 2008 (49) mencionan que con la adición de glicerol en este medio se dificulta el crecimiento de *M. bovis*.

En México la comercialización de ganado en pie con los Estados Unidos de Norte América, ha obligado a mejorar las estrategias en el control de la tuberculosis bovina, ya que se utiliza como una barrera no arancelaria para el comercio internacional entre estos países (50-52). Por otra parte, al ser la tuberculosis una enfermedad debilitante, los animales tienen una considerable disminución en su producción láctea pudiendo disminuir hasta un 17 %, reduce la ganancia de peso y la tasa conversión alimentaria en un 15 % y la fertilidad en un 6%; generando pérdidas económicas en la industria pecuaria mexicana (51, 53).

De acuerdo con el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), en su informe del año 2012 correspondiente a TBb indica el 31,2% de los Estados (10 de 32) está en fase de erradicación (prevalencia menor a 2%), 46,9% (15 de 32) de los Estados cuentan con un compartimento en fase de erradicación y el 21,9% (7 de 32) de los Estados está en fase de control (prevalencias mayor al 2% o desconocida) (54).

El Estado de México se encuentra en fase de control en tuberculosis bovina y actualmente cuenta con una zona geográfica en baja prevalencia de TB (0.5%) reconocida por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (54).

1.4. Sistemas de Información Geográfica (SIG).

Los SIG son un conjunto organizado de equipo y programas de computación que integra mapas y gráficos, bases de datos sobre un espacio geográfico definido. Los datos geográficos que se usan son tanto de naturaleza espacial como descriptiva. Los SIG se define como, el conjunto de herramientas integradas en un sistema automatizado capaz de coleccionar, almacenar, manejar, analizar y visualizar información referenciada geográficamente (55).

1.4.1. Aplicación de los SIG en salud.

En el campo de la epidemiología es importante facilitar la identificación de áreas geográficas y grupos de población que presentan mayor riesgo de enfermar o de morir prematuramente y que por tanto requieren de mayor atención ya sea preventiva, curativa o de promoción de la salud. En la actualidad los programas de salud requieren de un sistema de información ágil que les permita una mejor toma de decisiones. Con el advenimiento de las computadoras, informática y comunicaciones, es más factible lograr que los sistemas de información de los servicios de salud operen de manera más eficiente. Se estima que cerca del 80% de las necesidades de información de quienes toman decisiones y definen políticas en los gobiernos locales están relacionadas con una ubicación geográfica. Es en este contexto los SIG pueden ser considerados como una de las tecnologías existentes para facilitar los procesos de información y de toma de decisiones en los servicios de salud (56).

Los SIG permiten producir distintos tipos de mapas analíticos. Uno de ellos son los mapas de referencia, en donde se muestran los límites de ciertas áreas y se localizan diferentes objetos dentro de cada una, etiquetando usualmente cada objeto. Un ejemplo de este tipo de mapa son los mapas de rutas con tipos de carretera, fronteras municipales, distancias, poblados. Por su simpleza conceptual, el sobreponer capas de información en un mapa resulta atractivo ya que

son fáciles de manipular como cualquier conjunto de imágenes, pero estos no permiten otras operaciones de los SIG. Los mapas temáticos o de coropleticos son aquellos en los que las áreas de un mapa se colorean o marcan de acuerdo a alguna clave, de manera que la naturaleza del color o marca reflejen la intensidad de alguna variable que se mapea (57).

Los SIG ejecutan operaciones que son de gran valor para el análisis y la toma de decisiones: la demarcación de zonas buffer (amortiguamiento) y la determinación de la distancia entre objetos. La demarcación de zonas de buffer permite seleccionar territorios u objetos, continuos o no, de determinadas dimensiones y formas para conformar una región o área virtual, sin modificar para ello los límites. Al igual que con la operación anterior, se captura la información de atributos de los elementos en esa zona o región para su manejo y análisis. La determinación de distancia permite calcular la distancia real entre dos o más puntos de un mapa o la superficie de un territorio (55).

Los SIG tienen la capacidad de procesar imágenes, como fotografías aéreas o imágenes satelitales, lo que implica que se pueden cubrir de manera continua y sistemática grandes extensiones geográficas con diferentes tipos de información, tales como precipitación, nubosidad, cobertura vegetal, tipo de suelos y erosión (58).

1.4.2. Usos de los SIG en salud pública.

El uso de los SIG en el campo de la salud pública es muy reciente, el desarrollo de estos sistemas ha tenido sus raíces en otras áreas tales como el mercadeo, el transporte, la seguridad pública, el monitoreo de fenómenos geológicos y climáticos de la tierra. Sin embargo los SIG pueden aplicarse en salud pública para diferentes aspectos, la mayoría de ellos conectados entre sí. Entre algunos de los usos más comunes en salud pública son: la identificación de grupos de alto riesgo a la salud, la planeación y programación de actividades, monitoreo, evaluación de intervenciones y determinar el comportamiento de una enfermedad en el espacio y tiempo (57).

En la actualidad el agrupamiento de las enfermedades en el espacio y tiempo es una de las técnicas de mayor interés en el campo de la epidemiología, ya que permiten identificar zonas

geográficas donde una determinada enfermedad se está agrupando y esta agrupación no es producto de la casualidad sino a factores climáticos, ambientales o sociales que la están favoreciendo (59).

1.4.3. Estadístico espacial SCAN.

El agrupamiento de las enfermedades, es una de las técnicas de mayor interés en el campo de la epidemiología; en 1995 Kuldorff y Negarwalla desarrollaron un nuevo método estadístico espacial, llamado SCAN para la detección e inferencia de clústers en el espacio y tiempo, con una prueba de hipótesis basada en una razón de máxima verosimilitud (Log Likelihood Ratio LLR por sus siglas en inglés) (60, 61).

El estadístico SCAN en un análisis espacial y temporal, es definido con un gran número de cilindros traslapados entre ellos, la base circular define el área geográfica con un radio que puede variar de cero a una distancia mayor la cual está influida por el porcentaje de población en riesgo, la altura del cilindro refleja la parte temporal, para cada cilindro se calcula una LLR, el cilindro con la mayor LLR constituye el clúster más probable. Para la obtención del valor de p utiliza una simulación de Monte Carlo (59).

La fórmula matemática de **LLR** para el modelo de Poisson es la siguiente:

$$LLR(z) = \left(\frac{c_z}{n_z}\right)^{c_z} \left(\frac{C - c_z}{C - n_z}\right)^{C - c_z}$$

Dónde: $LLR(z)$ - es la razón de máxima verosimilitud de un cilindro, c_z - número de casos en un cilindro z , n_z - número de casos esperados en un cilindro z , C - número total de casos en un cilindro z , n - población total en un cilindro z (59).

1.4.4. SIG aplicados en estudios de tuberculosis humana.

En el caso particular de la TB diferentes autores han utilizado los SIG para estudiar esta enfermedad infecciosa, Moonan y col. 2004 (62) los utilizaron para identificar las áreas de

transmisión e incidencia de TB en los Estados Unidos, durante los años 1993-2000. Por su parte en la India Tiwari y col. 2006 (63) realizaron una investigación geo-espacial para la ocurrencia de TB en el distrito de Almora, usando los SIG y el estadístico SCAN. En Portugal Nunes 2007 (64) realizó un análisis para detectar clústers espaciales y temporales de TB durante los años 2000-2004 utilizando el estadístico SCAN. Los autores mencionados anteriormente coinciden en que los SIG y el SCAN son una herramienta muy útil en la vigilancia de la TB.

El SCAN ha sido utilizado por diferentes investigadores en el mundo, utilizando diferentes tamaños de ventana de búsqueda, los tamaños que se han utilizado con mayor frecuencia son 25% y 50% de la población. Por su parte autores como Sabel y col. 2007 (65) han utilizado algunos determinantes de salud como la edad, sexo y marginalidad como covariables en su modelo estadístico como una forma de corrección o ajuste.

1.4.5. SIG aplicados en estudios de tuberculosis bovina.

Los SIG han sido aplicados en el estudio de la tuberculosis bovina en países como EE.UU, en el cual Miller y col. 2007 (66) realizaron una investigación para identificar los patrones de distribución geográfica de esta enfermedad y utilizaron variables ambientales ya que el problema al que se enfrentaban era la reemergencia del *M. bovis* a partir de especies silvestres.

En Argentina Pérez y col. en el 2002 (67) realizaron un estudio a partir de los hallazgos de bovinos con lesiones sugestivas a tuberculosis bovina a nivel de rastro, identificaron las zonas con mayor prevalencia de tuberculosis, así como las zonas geográficas que se encontraban agrupadas con casos de tuberculosis, mencionando de la utilidad de los SIG en veterinaria para la vigilancia de enfermedades infecciosas a partir de la colección de información de un rastro.

En Chile en el 2008 Roco (68) identificó como se encontraba distribuía espacial y temporalmente la tuberculosis en el sur de Chile utilizando diferentes metodologías para identificar agrupamientos espaciales, concluyendo en la utilidad de los SIG como parte de un sistema sofisticado de vigilancia epidemiológica.

En México Zendejas y col. en el 2007 (51) utilizaron los SIG para predecir la distribución de la tuberculosis en Guadalajara, utilizando un método de interpolación con los datos colectados por el Comité de Fomento Pecuario de Guadalajara, mostrando cómo se encontraba distribuida la tuberculosis en este municipio. En el Estado de México Zaragoza en el 2009 realizó un estudio en el cual identificó los patrones de distribución espacial y los relacionó con variables ambientales y demográficas de los hatos, utilizando el estadístico SCAN, logrando identificar un agrupamiento espacial relacionado con el tipo de suelo regosol (69).

1.4.6. Modelo de predicción espacial con SIG.

Los SIG pueden interactuar con modelos matemáticos que permiten identificar zonas geográficas con condiciones similares a las zonas donde se está presentando una enfermedad o evento, el modelo de distancia de Mahalanobis es uno de ellos y es utilizado para predecir zonas con alta probabilidad de que ocurra un evento de acuerdo a las variables ingresadas en el modelo ya que se ha observado que algunas enfermedades está relacionada con los cambios en los ecosistemas, climas, usos de suelo, temperatura y huéspedes susceptibles. Por lo que la integración de los SIG y el conocimiento de los agentes infecciosos pueden ayudar a ubicar zonas apropiadas para que se presente una enfermedad (70).

De acuerdo a lo descrito anteriormente en cuanto a la complejidad de la tuberculosis humana y tuberculosis bovina planteamos la siguiente problemática.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La tuberculosis es una enfermedad curable, sin embargo es la segunda causa de muerte a nivel mundial después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), por lo que la Organización Mundial de la Salud en el año 1993 declaró a esta enfermedad como reemergente.

La reemergencia de la tuberculosis humana se debe al sinergismo que tiene *Mycobacterium tuberculosis* con el virus de la inmunodeficiencia humana y a la aparición de cepas resistentes a fármacos antituberculosos. *Mycobacterium bovis* es la especie causante de la tuberculosis

bovina, micobacteria con alto riesgo zoonótico que presenta resistencia natural a pirazinamida fármaco antituberculoso de primera línea. Aunado a esto se ha observado un incremento en el número de casos de infección con diferentes especies de micobacterias atípicas, principalmente en pacientes con alguna alteración en su sistema inmunológico.

Las micobacterias afectan a humanos y diversas especies de animales, una de las más afectadas es la bovina, la cual es una fuente económica y de alimento en poblaciones marginadas, en las cuales debido a costumbres culturales como el consumo de leche no pasteurizada se encuentran en alto riesgo de ser infectadas por especies como *M. bovis*.

El Estado de México cuenta con áreas geográficas marginadas que al mismo tiempo son vulnerables a ser zonas con una mayor incidencia de tuberculosis, tanto humana como bovina. El Instituto de Salud del Estado de México (ISEM) ha reportado 410 casos nuevos de tuberculosis en el año 2009, lo que nos indica la presencia de la enfermedad en el Estado de México. Por su parte el Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPPEM) ha detectado la presencia de *M. bovis*. en aproximadamente 20 hatos en la zona sur del Estado de México.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, existe la necesidad de conocer la distribución geográfica actual que muestre las zonas con mayor frecuencia de tuberculosis humana y tuberculosis bovina en el Estado de México y a su vez predecir las regiones geográficas en las que se podría presentar la tuberculosis aun cuando no se ha detectado. De la misma forma es necesario conocer la especie del género *Mycobacterium* que predomina en la población humana y bovina en las regiones con mayor número de casos de tuberculosis humana y tuberculosis bovina.

Pregunta investigación:

¿Cómo se encuentra distribuida geográficamente la tuberculosis en el Estado de México y qué especie del género *Mycobacterium* predomina en la población humana y bovina?

3. HIPÓTESIS.

Hipótesis nula.

La tuberculosis humana y la tuberculosis bovina en el Estado de México, se encuentran distribuidas aleatoriamente y predomina una especie del género *Mycobacterium*.

Hipótesis alterna.

La tuberculosis humana y la tuberculosis bovina en el Estado de México no se encuentran distribuida aleatoriamente y predomina más de una especie del género *Mycobacterium*.

4. OBJETIVOS.

General:

Identificar la distribución geográfica actual de la tuberculosis humana y la tuberculosis bovina, así como la especie del género *Mycobacterium* predominante en el Estado de México.

Específicos:

1. Construir mapas geográficos con la distribución de la tuberculosis humana y la tuberculosis bovina en el Estado de México, utilizando los Sistemas de Información Geográfica.
2. Identificar las regiones geográficas con mayor frecuencia de casos de tuberculosis humana y bovina.
3. Realizar un muestreo dirigido tomando como referencia los mapas construidos con los Sistemas de Información Geográfica.
4. Identificar por medio del análisis de la secuencia del gen rRNA 16S la especie de *Mycobacterium* predominante en las zonas con mayor frecuencia de casos de tuberculosis en el Estado de México.

5. JUSTIFICACIÓN.

Los Sistemas de Información Geográfica son una herramienta novedosa, que se han utilizado en diferentes países como la India, Estados Unidos de Norte América, Brasil, Argentina, Chile y México, para monitorear el comportamiento de enfermedades infecciosas. Estos sistemas han sido utilizados en epidemiología y particularmente en el estudio de la tuberculosis. Por lo que pueden ser utilizados para determinar la distribución geográfica de la tuberculosis humana y tuberculosis bovina en el Estado de México.

Los SIG pueden mostrar la ubicación de las zonas con mayor frecuencia de casos de tuberculosis humana y tuberculosis bovina, por lo que pueden ser un indicativo para el planteamiento de las zonas de muestreo, orientados a la identificación de las especies predominantes del género *Mycobacterium*.

Por otra parte en el diagnóstico de la tuberculosis se han incorporado herramientas moleculares orientadas a la identificación de especies bacterianas como las que conforman el género *Mycobacterium*. Por medio del análisis de la secuencia del gen rRNA 16S es posible identificar el género y especie de una bacteria así como realizar estudios filogenéticos con excelentes resultados.

Con la información de la identificación de las especies del género *Mycobacterium* predominantes en la población humana y bovina, se tendrá un antecedente de la presencia de dichas especies en las zonas geográficas del Estado de México.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1. Diseño de estudio.

La presente investigación, se dividió en dos secciones: tuberculosis humana (Etapa 1 y Etapa 2) y tuberculosis bovina (Etapa 1 y Etapa 2):

Tuberculosis humana.

Etapa 1: Se recabo la información con respecto a los casos de tuberculosis humana en el Estado de México, reportados en la base de datos del registro estatal de casos de tuberculosis del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), con la información recabada se realizó un análisis espacial así como un análisis espacial y temporal para identificar la distribución geográfica de la tuberculosis humana. Los análisis permitieron identificar la distribución geográfica de la tuberculosis humana, así como las regiones con mayor frecuencia de casos de TB en el Estado de México, esta información se tomó como base para seleccionar las zonas geográficas para la captación de muestras de esputo.

Etapa 2: Se realizó un análisis del gen rRNA 16S de las cepas aislada en esta investigación para identificar las especies de *Mycobacterium* presentes en la población humana.

Tuberculosis bovina.

Etapa 1: Se recabo la información con respecto a los hatos positivos a tuberculosis bovina en el Estado de México, reportados por el Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Mexico (CFPPPEM), con la información recabada se realizó un análisis espacial y temporal así como una predicción espacial. Por medio de estos análisis se identificó la distribución geográfica de la tuberculosis bovina, así como las regiones con mayor frecuencia de hatos positivos a TBb en el Estado de México. A partir de los resultados de esta etapa se seleccionaron las zonas de captación de muestras de leche y exudado nasal de bovinos.

Etapa 2: Se realizó un análisis del gen rRNA 16S de las cepas aislada en esta investigación para identificar las especies de *Mycobacterium* presentes en la población bovina.

6.1.1. Tipo de estudio.

Tuberculosis humana.

Etapa 1: Se realizó un estudio observacional, se incluyeron todas las localidades con casos de tuberculosis reportados en la bases de datos del registro nacional de casos de tuberculosis del Sistema Nacional Automatizado de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Secretaria de Salud durante el periodo 2006 al 2010.

Etapa 2: Se realizó un estudio experimental con las muestras obtenidas de los pacientes.

Tuberculosis bovina.

Etapa 1: Se realizó un estudio observacional, se incluyeron todos los hatos de bovinos con casos de tuberculosis reportados por el Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPPEM) durante el periodo 2005 al 2010.

Etapa 2: Se realizó un estudio experimental con las muestras captadas de leche y exudado nasal de los hatos seleccionados.

6.1.2. Tamaño de muestra.

Tuberculosis humana.

Se realizó el muestreo por conveniencia, dirigido a las zonas geográficas con mayor frecuencia de casos de tuberculosis humana, de acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa 1 del presente estudio.

Tuberculosis bovina.

El muestreo fue por conveniencia y dirigido a las regiones geográficas con mayor número de hatos positivos a tuberculosis bovina, de acuerdo a los resultados de la etapa 1 del presente estudio.

6.2. Criterios de inclusión y eliminación.

Criterios de inclusión:

Tuberculosis humana.

Etapa 1: Se incluyeron todas las localidades con casos de tuberculosis reportados en la bases de datos del registro estatal de casos de tuberculosis del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) durante el periodo 2006 al 2010.

Etapa 2: Se incluyeron todas las cepas aisladas en el presente estudio que presentaron una morfología macroscópica y microscópica correspondiente con el género *Mycobacterium*, así como todas las cepas que amplificaron el marcador filogenético de 100 pb presente en el gen rRNA 23S.

Tuberculosis bovina.

Etapa 1: Se incluyeron todos los hatos positivos a tuberculosis bovina en el Estado de México reportados por el CFPPEM durante el periodo 2005 al 2010.

Etapa 2: Se incluyeron todas las cepas aisladas en el presente estudio que presentaron una morfología macroscópica y microscópica correspondiente con el género *Mycobacterium*, así como todas las cepas que amplificaron el marcador filogenético de 100 pb presente en el gen rRNA 23S.

Criterios eliminación:

Tuberculosis humana.

Etapa 2: Se descartaron todas las cepas que no tuvieron una morfología macroscópica y microscópica correspondiente al género *Mycobacterium* y todas la cepas que no amplificaron el marcador filogenético de 100 pb presente en el gen rRNA 23S.

Tuberculosis bovina.

Etapa 2: Se descartaron todas las cepas que no tuvieron una morfología macroscópica y microscópica correspondiente al género *Mycobacterium* y todas la cepas que no amplificaron el marcador filogenético de 100 pb presente en el gen rRNA 23S.

6.3. Procedimiento.

6.3.1. Tuberculosis humana. Etapa 1

6.3.1.1. Análisis espacial.

6.3.1.1.1. Obtención de datos de la población.

De acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) en 499 localidades del Estado de México, se reportaron casos de TB durante 2010-2006.

Para cada localidad se utilizó el índice de marginación 2005, el cuál fue codificado en 5 categorías (Categoría 1: muy bajo; Categoría 2: bajo; Categoría 3: medio; Categoría 4: alto; Categoría 5: muy alto) (71).

El número de habitantes de cada localidad, así como la edad y género de los mismos, se obtuvieron del “II Censo de Población y Vivienda 2005” realizado por el Instituto Nacional

de Estadística y Geografía, (INEGI). La edad fue clasificada en 5 categorías: 1: 0 a 4 años; 2: 5 a 14 años; 3: 15 a 17 años; 4: 18 a 59 años y 5: 60 años o más (72).

Se combinaron los datos de sexo con las 5 categorías formadas para la edad por localidad con su respectivo índice de marginalidad y de esta forma se crearon 10 grupos “edad-género-marginación”. Estos grupos fueron usados para describir la composición de la población en cada localidad del área de estudio.

6.3.1.1.2. Obtención de casos de tuberculosis humana.

Se colectaron datos de los casos de TB, los cuales fueron diagnosticados por diferentes hospitales y centros de salud, notificados en el registro nacional de casos de TB durante los años 2010-2006, se obtuvieron las características de edad y género por caso de TB. La marginalidad se obtuvo a partir del índice de marginalidad 2005 en la localidad donde se presentó el caso de TB (71). Se utilizaron como covariables en el modelo estadístico la edad-género y marginación.

6.3.1.1.3. Datos de localización geográfica.

La localidad donde se presentó el caso de TB se tomó como unidad geográfica para el análisis, la georeferencia fue tomada en el sistema de proyección Latitud-Longitud, dicha información fue obtenida a través del Instituto de Geografía Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM) (73).

6.3.1.1.4. Análisis estadístico y geográfico.

La determinación e identificación de clústers de TB se realizó por medio del estadístico espacial SCAN, el cual fue calculado usando el paquete SaTSCAN (V8.0) con el cual se calculó la significancia estadística y la localización aproximada de los clústers. El SaTSCAN utiliza 3 archivos de entrada: archivo de casos, archivo de población, archivo de localización geográfica. Para la determinación e identificación de clústers se seleccionó el modelo de

probabilidad de Poisson, con un análisis puramente espacial, se utilizaron dos ventanas de búsqueda una 25% y otra del 50% de población dentro ellas con altas tasas, los grupos: edad, género e índice de marginación se ingresaron como covariables.

Para la representación gráfica de los clúster se construyó un mapa con la información obtenida del estadístico espacial SCAN en el software IDRISI Taiga 16.0. Se utilizó un mapa en formato vectorial del Estado de México obtenido del IGCEM (74) así como un imagen satelital en color compuesto infrarrojo mediano utilizando las bandas 2,4,7 del satélite Lansat 7 (75).

6.3.1.2. Análisis espacial y temporal.

Para la realización de este análisis se utilizaron los datos de la población, los casos de tuberculosis y la localización geográfica descritos anteriormente, Para la determinación e identificación de clústers se seleccionó el modelo de probabilidad de Poisson, con un análisis espacial y temporal, se utilizaron dos ventanas de búsqueda una 25% y otra del 50% de población dentro ellas con altas tasas, los grupos: edad, género e índice de marginación se ingresaron como covariables.

La representación gráfica de los clúster se construyó un mapa con la información obtenida del estadístico espacial SCAN en el software IDRISI Taiga 16.0. Se utilizó un mapa en formato vectorial del Estado de México obtenido del IGCEM (74), así como un imagen satelital en color compuesto infrarrojo mediano utilizando las bandas 2,4,7 del satélite Lansat 7 (75).

6.3.2. Tuberculosis humana. Etapa 2

6.3.2.1. Captación de muestras de esputo.

A partir de los resultados obtenidos en la primera etapa del estudio, se seleccionaron las zonas de captación de muestras de esputo, para lo cual se trabajó en conjunto con la coordinación oriente de investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Se colectaron las muestras por triplicado de esputo (expectoración) de pacientes con diagnóstico positivo a TB por baciloscopia o con alta sospecha de tener la enfermedad, en un recipiente con boca ancha de aproximadamente 5 mL, estéril y rotulado con la información del paciente, las cuales se transportaron en refrigeración, protegidas de la luz, sin agregar formol o algún otro conservador a el Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México para su procesamiento.

6.3.2.2. Procesamiento de la muestra en el laboratorio.

Una vez llegadas las muestras, fueron registradas en la bitácora del laboratorio y se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento.

Se utilizó el siguiente protocolo de tinción y cultivo de micobacterias a partir de muestras clínicas de esputo, siguiendo la metodología descrita en los manuales para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis (baciloscopia y cultivo) (12, 13)

Preparación del frotis.

- a) Las muestras se colocaron en la campana de flujo laminar.
 - b) Se ordenaron las muestras a trabajar.
 - c) Se identificaron las laminillas con el número asignado a la muestra.
 - d) Se seleccionó la partícula mucopurulenta, se tomó con un asa previamente esterilizada al fuego.
 - e) La muestra seleccionada se depositó en la laminilla correspondiente y se extendió de forma uniformemente.
 - f) Una vez que la muestra se secó totalmente, se fijó por calor pasando tres veces la laminilla por la llama de mechero.
-

6.3.2.2.1. Tinción de Ziehl-Neelsen.

Se realizó una primera tinción Ziehl-Neelsen directa de la muestra de esputo.

-
- a) Las laminillas se colocaron en la varilla de tinción, separadas por 2 cm entre ellas y no colocando más de 6 laminillas por tinción.
 - b) Se cubrió totalmente la laminilla con fucsina fenicada (previamente filtrada), se calentó suavemente por la parte de debajo de los extendidos con la llama de una torunda embebida de alcohol, hasta la emisión de los primeros vapores, entre cinco y ocho minutos hasta la emisión de vapores.
 - c) Una vez transcurrido el tiempo, se tomó la laminilla con una pinza del borde donde se encuentra la identificación, se inclinó la laminilla y se enjuago suavemente con abundante agua a baja presión, eliminando la fucsina, se enjuago la parte posterior de laminilla de la misma forma, se mantuvo inclinada la laminilla eliminando el exceso de agua para evitar diluir los reactivos siguientes.
 - d) Las laminillas se colocaron nuevamente en la varilla de tinción, se cubrieron totalmente con alcohol-acido al 3% (solución decolorante) durante 2 o 3 minutos, se enjuago suavemente con abundante agua a baja presión, se eliminó el exceso de agua inclinado el porta objetos.
 - e) La laminilla se cubrió con azul de metileno (coloración de fondo), se dejó actuar durante un minuto, la laminilla se enjuago suavemente con abundante agua a baja presión y se dejó secar a temperatura ambiente.
 - f) Se revisó si la identificación de la laminilla era clara y visible.
 - g) Se le colocó una gota de aceite de inmersión en el extendido y se observó en el microscopio con el lente de 100x.
-

6.3.2.2.2. Descontaminación de la muestra de esputo.

Una vez terminada la primera baciloscopia la muestra se sometió a un proceso de descontaminación mediante la técnica de hidróxido de Sodio N-acetil-L-cisteína, con el fin de conseguir la licuefacción de restos orgánicos (tejido, moco y otros materiales) y la eliminación de bacterias que interfieren con el desarrollo de la micobacterias.

-
- a) Al momento de iniciar el proceso de descontaminación se mezcló 50 mL de citrato trisódico (3%) con 50 mL de hidróxido de sodio (4%) (soluciones estériles) y se agregó 0.5 g de N-acetil-L-cisteína, esta combinación llevo el nombre de reactivo digestivo.
 - b) Se mezcló por partes iguales de esputo y reactivo digestivo en un tubo con tapón de rosca y se mezcló en un CórteX por no más de 30 segundos. Si la licuefacción no era completa se repitió la agitación dejando reposar durante 3 minutos entre cada ciclo.
 - c) Una vez licuado el esputo se llenó el tubo hasta 2 cm de la boca, con buffer de fosfatos. Se centrifugo a 2000 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Se decantó el sobrenadante en un vaso con fenol al 5%.
 - d) Al sedimento se le agrego 1 mL gelatina estéril, para re-suspender.
-

6.3.2.2.3. Segunda tinción de Ziehl-Neelsen.

A partir de este producto se realizó una segunda baciloscopia como se describió anteriormente.

6.3.2.2.4. Cultivo y aislamiento.

Una vez descontaminada la muestra, con un hisopo estéril se inocularon los medios de cultivo selectivos para micobacterias. Se inocularon los siguientes medios:

-
- a. Lowenstein-Jensen: Adecuado para el aislamiento de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*.
 - b. Stonebrink: Adecuado para el aislamiento de *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*.
 - c. Los medios de cultivo se incubaron a 37°C.
 - d. Se revisaron periódicamente y se anotó el crecimiento o cambio del medio.
 - e. Las colonias observadas se aislaron en el medio Midlebrook, para un mejor manejo y posterior identificación por biología molecular
-

6.3.2.2.5. Tinción de Ziehl-Neelsen a las cepas aisladas.

A las cepas aisladas se les realizó nuevamente la tinción de Ziehl-Neelsen descrita previamente para verificar la presencia de bacilos ácido alcohol resistentes.

6.3.2.2.6. Identificación genética de micobacterias aisladas de esputo.

Obtención de biomasa.

Las cepas aisladas fueron inoculadas en el medio líquido Midlebrook para obtener biomasa se utilizó el siguiente protocolo:

-
1. Se inocularon las cepas seleccionadas en matraces de 125 ml con 30 mL de medio de cultivo líquido Midlebrook 7H9 (BD L007467).
 2. Cuando se observó un crecimiento suficiente, se transfirió el medio líquido junto con la biomasa a tubos Falcón de 15 mL estériles y se centrifugaron por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet se transfirió a tubos ependorf de 1.5 mL, se centrifugaron los ependorf a 14 000 revoluciones por minuto por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y quedo únicamente el pellet bacteriano para iniciar con el protocolo de extracción del ADN.
-

6.3.2.2.6.1. Extracción de material genético (ADN).

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit Promega Wizard® Genomic No. de catálogo A1120. Se utilizó el siguiente protocolo:

-
1. Se re suspendió el pellet de células bacterianas con 480µL de EDTA 0.5M
 2. Se agregó 120µl de lisozima, se mezcló cuidadosamente con una pipeta.
 3. Se incubó la muestra a 37° C por 60 minutos, se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos y se retiró sobrenadante.
-

-
4. Posteriormente se agregaron 600µl de solución nuclear de lisis del kit de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” mezclando cuidadosamente.
 5. Se incubó a 80° C durante 5 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente.
 6. Se agregó 3µL de solución de RNAsa del kit de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic”, se mezcló por inversión del tubo de 2 a 3 veces.
 7. Se incubó el tubo a 37° C por 60 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente.
 8. Se agregaron 200µl de solución de precipitación de proteínas del kit de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” al lisado tratado con RNAsa, se agitó vigorosamente en un vortex durante 20 segundos. para mezclar.
 9. Se incubó la mezcla en hielo durante 5 min.
 10. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de eppendorf de 1.5 mL estériles con 600 µl de isopropanol.
 11. Se mezcló suavemente por inversión hasta que se observó la formación de hebras de ADN visibles.
 12. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos.
 13. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el tubo se golpeó suavemente sobre un papel absorbente, se adicionó 600µl de etanol al 70%, se invirtió de 2 a 3 veces el tubo con el pellet de ADN.
 14. Se centrifugó a 14 000 rpm durante 2 minutos, se retiró cuidadosamente el etanol, se dejó secar durante 15 min a temperatura ambiente.
 15. En el último paso se agregó 100µl de solución de rehidratación del kit de purificación de ADN “Promega Wizard® Genomic” y se incubó en refrigeración (4° C) por 12 horas.
 16. Se almacenó en congelación hasta su utilización
-

El ADN se visualizó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con los productos de extracción de ADN para observar la presencia y la calidad del ADN, se utilizó el siguiente protocolo:

-
1. En un matraz de 200 mL se colocaron 0.25gr de agarosa y 25mL de solución TAE 1X.
 2. Se agitó suavemente y se calentó en un horno de microondas por 40 segundos, y dos veces más por 20 segundos.
 3. Previamente se armó la cámara de electroforesis y se vertió la agarosa sobre el molde, se dejó solidificar la agarosa por 15 minutos y se retiró el peine.
 4. Se cubrió el gel con solución TAE 1X.
 5. Se mezclaron 7 µl de muestra con buffer de carga y se depositaron en los pozos del gel. Se depositaron 7 µl de marcador de peso molecular.
 6. Se cerró la cámara de electroforesis y fue programada a 120 Volts y 300 micro Amperes por 45 min.
 7. Una vez transcurridos los 45 minutos se retiró el gel y se reveló en una solución de bromuro de etidio por 15 segundos.
 8. Se capturo la imagen en un foto documentador.
-

6.3.2.2.6.2. Amplificación del marcador filogenético.

A las cepas aisladas se les amplificó el marcador filogenético 100 pares de bases localizado en el gen rRNA 23S, por medio la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las secuencias que se utilizaron como iniciadores fueron:

23S INSt, 5'-(AC)AGCGTAG(AGCT)CGA(AT)GG-3'.

23S InsR 5'-GTG(AT)CGGTTT(AGCT)(GCT)GGT A-3'.

La reacción se llevó a cabo utilizando Taq ADN Polimerase in Storage Buffer B (Promega). Las condiciones en el ciclo térmico fueron: un ciclo de pre desnaturalización, 5 minutos (94°C); desnaturalización, 30 segundos (94°C); acoplamiento, 45 segundo (46°C); elongación 50 segundos (72°C); repetir 29 ciclos y un ciclo de pos elongación de 5 minutos a (72°C). Los fragmentos amplificados se observaron por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, revelado en bromuro de etidio por 15 segundos.

6.3.2.2.6.3. Amplificación del gen rRNA 16S.

A las cepas que amplificaron marcador filogenético de 100 pb presente en el gen rRNA 23S se les realizó la amplificación el gen rRNA 16S por medio de la PCR, se utilizaron las siguientes secuencias de nucleótidos:

8f: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG.

1492r: TACGGYTACCTTGTTACGACTT.

La reacción se llevó a cabo utilizando Taq ADN Polimerase in Storage Buffer B (Promega M1661). Las condiciones del ciclo térmico fueron: un ciclo de pre desnaturalización, 5 minutos (94°C); desnaturalización, 30 segundos (94°C); acoplamiento, 20 segundos (52°C); elongación 1:30 minutos (72°C). Los productos amplificados serán observados en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio por 15 segundos.

6.3.2.2.6.4. Identificación de especies.

Los productos amplificados se enviaron al servicio de secuenciación de Macro Gen U.S.A, los productos obtenidos se analizaron y se comparados con las secuencias depositadas en la base de datos del Gen Bank utilizando el programa BLAST (36).

6.3.2.2.6.5. Análisis filogenético.

Las secuencias del gen rRNA 16S se alinearon en el programa BioEdit (76), una vez alineadas las secuencias se compararan en las bases de datos: BLAST (36), EzTaxon (77), con la finalidad de obtener información de las cepas con alta similitud. Con las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético utilizando el método de máxima parsimonia utilizando el programa de bioinformática MEGA versión 4 (78).

6.3.3. Tuberculosis bovina. Etapa 1

6.3.3.1. Análisis espacial y temporal.

6.3.3.1.1. Obtención de casos tuberculosis bovina.

Se obtuvo información referente a los hatos positivos a tuberculosis bovina (TBb) de la campaña de erradicación de la TBb en el Estado de México, de los años 2005-2010. La información se obtuvo del Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPPEM) el cual reportó un total de 50 hatos con cuarentena establecida y con aislamiento de *M. bovis* y 72 hatos con animales positivos a TBb diagnosticados por medio de la prueba de tuberculina cervical comparativa

6.3.3.1.2. Localización geográfica.

La localidad donde se presentaron los hatos positivos a TBb se consideró como unidad geográfica para el análisis, la referencia geográfica fue tomada en el sistema de proyección longitud-latitud, información obtenida del Instituto de Estadística y Geografía del Gobierno del Estado de México (IGECEM) (73).

6.3.3.1.3. Análisis estadístico y geográfico.

Los agrupamientos de TB se identificaron por medio del estadístico SCAN con un modelo de probabilidad discreto utilizando una permutación espacial y temporal con ventanas de búsqueda del 50% y 25%, el análisis se realizó en el paquete SaTSCAN, con el que se calculó la significancia estadística, así como la localización de los clústers.

Para la representación geográfica de los clústers se construyó un mapa con los resultados del estadístico SCAN en el software Idrisi Taiga 16.0. Se utilizó un mapa en formato vectorial del Estado de México obtenido del IGECEM (74), así como una imagen satelital en color compuesto infrarrojo mediano utilizando las bandas 2,4,7 del satélite Lansat 7 (75).

6.3.3.2. Modelo de predicción.

6.3.3.2.1. Obtención de casos de tuberculosis bovina.

Se seleccionaron 50 hatos con antecedente de aislamiento *M. bovis* reportados por el CFPPEM, las coordenadas geográficas de los hatos fueron importadas en formato vector en el software Idrisi Taiga 16.0, se convirtió a formato raster para la formación de un buffer de 93 metros para cada hato.

6.3.3.2.2. Obtención de variables ambientales.

Como variables ambientales se tomaron: a) el uso de suelo y b) tipo de suelo, los cuales fueron obtenidos en formato vector del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (79) (INEGI, 2012b) y transformados a formato raster en el Idrisi Taiga 16.0; c) la temperatura, obtenida de las estaciones climatológicas del Servicio Meteorológico Nacional (SMN) (80), con la información obtenida se realizó una interpolación espacial en Idrisi Taiga 16.0 y d) el modelo digital de elevación (DEM) obtenido directamente de la Science for a Changing World USGS (75).

6.3.3.2.3. Obtención de variables demográficas.

Como variables demográficas se tomaron: a) el índice de marginalidad 2005 de la Comisión Nacional de Población (CONAPO) (71), el cual fue espacializado por interpolación; b) la distancia de las carreteras del Estado de México, obtenida a partir del vector de carreteras de INEGI y c) la distancia a polígonos urbanos, obtenida a partir del vector de uso de suelo de INEGI (79).

6.3.3.2.4. Análisis estadístico.

Se aplicó el modelo de distancia de Mahalanobis para realizar la predicción de zonas con alta probabilidad de presentar casos de tuberculosis bovina, la predicción se realizó con el 80% del

total de los sitios seleccionados y el 20% se utilizó para la validación del modelo. Para el modelo de predicción se siguió la siguiente fórmula matemática (70):

$$MD = (X - m)^T C^{-1} (X - m)$$

Dónde: MD=Distancia de Mahalanobis, X=Los datos del vector de los casos de tuberculosis bovina, m=La media del valor de las variables independientes, ^T=Transpuesta de la matriz, C⁻¹ = La inversa de la matriz de covarianza de las variables independientes.

6.3.4. Tuberculosis bovina. Etapa 2

6.3.4.1 Obtención de muestras de leche y exudado nasal de bovinos.

A partir de los resultados obtenidos en la primera etapa del estudio, se seleccionó la zona geográfica para la captación de muestras de leche y exudado nasal de bovinos, para lo cual se trabajó en conjunto con el Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPEM).

El muestreo se realizó en hatos positivos a TBb de acuerdo con los registro del CFPPEM, se colectaron aproximadamente 5 mL de leche directamente del pezón, en vasos estériles, rotulados con la información individual y del hato, se colectaron muestras de exudado nasal por medio de hisopos estériles, los cuales se colocaron en tubos con solución salina al 0.85% estéril, las muestras se trasportaron en refrigeración, protegidas de la luz, sin agregar formol o algún otro conservador a el Laboratorio de Microbiología Medica y Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México para su procesamiento.

6.3.4.2. Procesamiento de las muestras de leche y exudado nasal en el laboratorio.

Una vez llegadas las muestras, se registraron en la bitácora del laboratorio y se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento.

Preparación del frotis a partir de una muestra de leche.

- a. Las muestras se colocaron en la campana de flujo laminar.
 - b. Se ordenaron las muestras a trabajar.
 - c. Se identificaron las laminillas con el número asignado a la muestra.
 - d. Se sumergió el asa previamente esterilizada en el recipiente con la muestra (leche) y se depositó en la laminilla correspondiente y se extendió uniformemente.
 - e. Una vez que la muestra se secó, se fijó por calor pasando tres veces la laminilla por la llama de mechero.
-

Preparación del frotis a partir de muestras de exudado nasal.

- a. Las muestras se colocaron en la campana de flujo laminar.
 - b. Se ordenaron las muestras a trabajar.
 - c. Se identificaron las laminillas con el número asignado a la muestra.
 - d. Por medio del hisopo la muestra se depositó en la laminilla correspondiente y se extendió uniformemente.
 - e. Una vez que la muestra se secó, se fijó por calor pasando tres veces la laminilla por la llama de mechero.
-

6.3.4.2.1. Tinción Ziehl-Neelsen.

Se realizó una tinción Ziehl-Neelsen directa de las muestra como se describió para la muestra de esputo.

6.3.4.2.2. Inoculación de medios de cultivo.

Se inocularon las muestras de leche con un hisopo estéril y las muestras de exudado nasal con el hisopo con el que fueron obtenidas, se inocularon los siguientes medios cultivos selectivos para micobacterias:

-
- a. Stonebrink: Adecuado para el aislamiento de *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*.
 - b. Midelbrook: Adecuado para el aislamiento de *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *fortuitum*)
 - c. Midelbrook con piruvato de sodio: Adecuado para el aislamiento de *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *fortuitum*
 - d. Los medios de cultivo se incubaron a 37°C.
 - e. Se revisaron periódicamente y se anotó el crecimiento o cambio del medio.
 - f. Una vez obteniendo el crecimiento bacteriano se seleccionaron las cepas con morfología de micobacteria y fueron resembradas en el medio Midlebrook y Midlebrook adicionado con piruvato, para un mejor manejo de ellas y posterior identificación por técnicas de biología molecular
-

6.3.4.2.3. Clasificación de las cepas aisladas.

Las cepas fueron clasificadas en grupos tomando en cuenta sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas. Para lo cual se observaron las colonias considerando su pigmentación y aspecto para su clasificación macroscópica y por medio de la tinción Ziehl Neelsen se clasificó microscópicamente las cepas.

6.3.4.2.4. Identificación genética de las bacterias aisladas de bovinos.

Obtención de biomasa de las cepas aisladas.

-
1. Se inocularon las cepas seleccionadas en matraces de 125 ml con 30 mL de medio de cultivo líquido BHI (Infusión Cerebro Corazón)
 2. Cuando se observó un crecimiento suficiente, se transfirió el medio líquido junto con la biomasa a tubos falcón de 15 mL estériles y se centrifugaron por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y el pellet se transfirió a tubos eppendorf de 1.5 mL, se centrifugaron los eppendorf a 14 000 revoluciones por minuto por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y

quedo únicamente el pellet bacteriano para iniciar con el protocolo de extracción del material genético ADN.

6.3.4.2.4.1. Extracción de material genético.

La extracción de ADN se realizó en el kit Promega Wizard® Genomic No. de catálogo A1120. Se siguió la metodología descrita en el apartado correspondiente a humanos. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% con los productos de extracción para observar la presencia y calidad del ADN de las muestras, se siguió la metodología descrita en el apartado correspondiente a humanos.

6.3.4.2.4.2. Amplificación del marcador filogenético.

Se realizó la amplificación del marcador filogenético de aproximadamente 100 pb localizado en el gen rRNA 23S, mediante el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrito por Roller y col 1992 y Ramírez y col 2006 (30, 31); las secuencias que se utilizaron como iniciadores fueron:

23S INSt, 5'-(AC)AGCGTAG(AGCT)CGA(AT)GG-3'.

23S InsR 5'-GTG(AT)CGGTTT(AGCT)(GCT)GGT A-3'.

La reacción se llevó a cabo utilizando Taq ADN Polimerase in Storage Buffer B (Promega). Las condiciones en el ciclo térmico fueron: un ciclo de pre desnaturalización, 5 minutos (94°C); desnaturalización, 30 segundos (94°C); acoplamiento, 45 segundo (46°C); elongación 50 segundos (72°C); repetir 29 ciclos y un ciclo de pos elongación de 5 minutos a (72°C). Los fragmentos amplificados se observaron por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, revelado en bromuro de etidio por 15 segundos.

6.3.4.2.4.3. Amplificación del Gen rRNA 16S.

Se realizó la amplificación del gen rRNA 16S utilizando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron las siguientes secuencias de nucleótidos:

8f: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG.

1492r: TACGGYTACCTTGTTACGACTT.

La reacción se llevó a cabo utilizando Taq ADN Polimerase in Storage Buffer B (Promega M1661). Las condiciones del ciclo térmico fueron: un ciclo de pre desnaturalización, 5 minutos (94°C); desnaturalización, 30 segundos (94°C); acoplamiento, 20 segundos (52°C); elongación 1:30 minutos (72°C). Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio por 15 segundos.

6.3.4.2.4.4. Identificación de especies.

Los productos amplificados se enviaron al servicio de secuenciación de Macro Gen U.S.A, los productos obtenidos se analizaron y se comparados con las secuencias depositadas en la base de datos del Gen Bank utilizando el programa BLAST.

6.3.4.2.4.5. Análisis filogenético.

Las secuencias del gen rRNA 16S se alinearon utilizando el programa BioEdit (76), una vez alineadas las secuencias se compararan en las bases de datos: BLAST (36), EzTaxon (77), con la finalidad de obtener información de las cepas con alta similitud. Con las secuencias obtenidas se construyó un árbol filogenético utilizando el método de máxima parsimonia utilizando el programa de bioinformática MEGA versión 4 (78). .

6.4. Variables de Estudio.

Independientes:

Tuberculosis humana

Tuberculosis bovina

Dependientes:

Distribución geográfica

Especies del género *Mycobacterium*.

6.5. Implicaciones bioéticas.

El presente trabajo de investigación se basó en el artículo 79, del reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, título IV Bioseguridad de las Investigaciones.

La investigación que se realizó estuvo sustentada en los principios bioéticos de beneficencia, no maleficencia y justicia, esta investigación tuvo como fin el beneficio a la salud humana, no provocando un perjuicio a la misma, y haciendo públicos los resultados, con esto beneficiar a la mayor cantidad de personas posible.

Las muestras de pacientes se solicitaron por medio de una carta de consentimiento informado, para su procesamiento en el laboratorio (Anexo 1) y se recabo información del paciente por medio de una hoja de captura (Anexo 2).

7. RESULTADOS.

7.1. Título corto del artículo publicado.

“Spatial and temporal distribution of tuberculosis the State of Mexico, Mexico”

7.1.1. Página frontal del artículo publicado.

Spatial and temporal distribution of tuberculosis the State of Mexico, Mexico.

Adrian Zaragoza Bastida¹, Marivel Hernández Tellez², Lilia P Bustamante Montes¹, Imelda Medina Torres³, Jaime Nicolás Jaramillo Paniagua³, Germán David Mendoza Martínez⁴, Ninfa Ramírez Durán^{1*}.

¹ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México

² Centro Interamericano de Recursos del Agua, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

³ Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

⁴ Departamento de Producción agrícola y animal, Universidad Autónoma Metropolitana.

* Email address: nramirezd@uaemex.mx.

7.1.2. Carta de aceptación.

The Scientific World Journal
Volume 2012, Article ID 570278, 7 pages
doi:10.1100/2012/570278

The Scientific World JOURNAL

Research Article

Spatial and Temporal Distribution of Tuberculosis in the State of Mexico, Mexico

Adrian Zaragoza Bastida,¹ Marivel Hernández Tellez,²
Lilia P. Bustamante Montes,¹ Imelda Medina Torres,³ Jaime Nicolás Jaramillo Panlagua,³
Germán David Mendoza Martínez,⁴ and Ninfa Ramírez Durán¹

¹Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, 50180, Toluca, MEX, Mexico

²Centro Interamericano de Recursos del Agua, Universidad Autónoma del Estado de México, 50200, Toluca, MEX, Mexico

³Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50200, Toluca, MEX, Mexico

⁴Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana, 04960, México, DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Ninfa Ramírez Durán, nramirez@uaemex.mx

Received 17 April 2012; Accepted 29 May 2012

Academic Editors: K. Akakura, P. Domingo, and Q. He

Copyright © 2012 Adrian Zaragoza Bastida et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Tuberculosis (TB) is one of the oldest human diseases that still affects large population groups. According to the World Health Organization (WHO), there were approximately 9.4 million new cases worldwide in the year 2010. In Mexico, there were 18,848 new cases of TB of all clinical variants in 2010. The identification of clusters in space-time is of great interest in epidemiological studies. The objective of this research was to identify the spatial and temporal distribution of TB during the period 2006–2010 in the State of Mexico, using geographic information system (GIS) and SCAN statistics program. Nine significant clusters ($P < 0.05$) were identified using spatial and space-time analysis. The conclusion is that TB in the State of Mexico is not randomly distributed but is concentrated in areas close to Mexico City.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is an infectious disease, generally chronic, and caused by a group of bacteria: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* and *M. canettii* [1]. The main transmission is from person to person by microdroplets generated by coughing or sneezing of a person with active TB [1, 2].

TB is one of the oldest human diseases that still affects large population groups, mainly in marginal areas and comprising vulnerable groups impacted by extreme poverty, malnutrition, and crowded housing. These groups are prone to infection by the tuberculosis bacilli and to acquiring active TB [2, 3].

In Mexico, the National Population Commission (CONAPO) considers a marginal index based on a census of localities according to the global impact of several total measurements or items, such as lack of education (illiteracy,

incomplete grade school) and inadequate housing conditions (without water, drainage, bathrooms, electricity, refrigerator [4], and other basic household equipment, houses with earth floors and crowded living conditions). These items can be used to identify geographic areas with greater marginalization (socioeconomic development) and a greater risk from TB infection.

The World Health Organization (WHO) reported in 2010 that there were an estimated 9.4 million incident cases (range 8.9 million–9.9 million) of TB globally, equivalent to 137 cases per 100,000 population, and that 1.1 million of those cases also tested positive for human immunodeficiency virus (HIV). The mortality of HIV-negative patients with TB was estimated at 1.3 million, this being equivalent to 20 deaths per 100,000 people. The incidence of TB patients in Asia was 55% and 30% in Africa; smaller proportions of cases occurred in the Eastern Mediterranean Region (7%), the European Region (4%), and the Americas Regions (3%) [5].

7.1.3. ABSTRACT.

Tuberculosis (TB) is one of the oldest human diseases that still affects large population groups. According to the World Health Organization (WHO), there were approximately 9.4 million new cases worldwide in the year 2010. In Mexico there were 16,964 new cases of TB of all clinical variants in 2007. The identification of clusters in space-time is of great interest in epidemiological studies. The objective of this research was to identify the spatial and temporal distribution of TB during the period 2006–2010 in the State of Mexico, using geographic information system (GIS) and SCAN statistics programs. Nine significant clusters ($p < 0.05$) were identified using temporal and space-time analysis. The conclusion is that TB in the State of Mexico is not randomly distributed but is concentrated in areas close to Mexico City.

7.1.4. INTRODUCTION.

Tuberculosis (TB) is an infectious disease, generally chronic and caused by a group of bacteria: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* and *M. canettii* [1]. The main transmission is from person to person by microdrops generated by coughing or sneezing of a person with active TB [1, 2].

TB is one of the oldest human diseases that still affects large population groups, mainly in marginal areas and comprising vulnerable groups impacted by extreme poverty, malnutrition and crowded housing. These groups are prone to infection by the tuberculosis bacilli and to acquiring active TB [2,3].

In Mexico, the National Population Commission (CONAPO) considers a marginal index based on a census of localities according to the global impact of several total measurements or items, such as: lack of education (illiteracy, incomplete grade school); and inadequate housing conditions (without water, drainage, bathrooms, electricity, refrigerator [4] and other basic household equipment, houses with earth floors and crowded living conditions). These items can be used to identify geographic areas with greater marginalization (socio-economic development) and a greater risk from TB infection.

The World Health Organization (WHO) reported in 2010 that there were an estimated 9.4 million incident cases (range, 8.9 million–9.9 million) of TB globally, equivalent to 137 cases

per 100,000 population, and that 1.1 million of those cases also tested positive for human immunodeficiency virus (HIV). The mortality of HIV-negative patients with TB was estimated at 1.3 million, this being equivalent to 20 deaths per 100,000 people. The incidence of TB patients in Asia was 55% and 30% in Africa; smaller proportions of cases occurred in the Eastern Mediterranean Region (7%), the European Region (4%) and the Americas Regions (3%) [5].

In Mexico, 16,964 TB cases (in all clinical forms) were reported in 2007, which is a rate of 16.03 per 100,000 habitants. Of all the cases reported, 14,281, or 13.5 per 100,000, corresponded to lung TB [3]. The mortality rate in 2006 was 1.8 per 100,000 [6] and the incidence rate was higher in the 60 year old or 60+ year old groups of patients, and males had a 1.5 times higher rate than females [3].

In the Federal Entities, TB presents a well-defined concentration pattern. High incidence rates are present in the Western States and the Gulf of Mexico, and lower rates are found in the Central States. Tamaulipas and Baja California have double the national rate (13.5 per 100,000 inhabitants). In these States, together with the Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Sonora, Oaxaca and Chihuahua States, are concentrated 70% of all the identified cases of TB in the country [3].

At present, geographic information systems (GIS) are among the most useful tools in epidemiology, as they can be used to identify geographical areas and population groups with a higher risk of sickness or premature mortality and which therefore require higher preventive care or health information and monitoring of diseases in time and space [7, 8].

Spatial cluster of a disease grouping is one of the most important techniques in epidemiology. In 1995, Kuldorff and Negarwalla developed a new space statistics method called SCAN for the detection and cluster inference in time-space under the Likelihood Ratio (LLR) hypothesis [8].

SCAN statistics is a spatial-temporal analysis defined by a large number of transposed cylinders; the circular base defines the geographic area with a radius that can vary from zero to a larger distance influenced by the percentage of the population at risk, while the height of the cylinder represents the temporal parameter. The LLR was calculated for each cylinder. The cylinder with the highest LLR was considered to constitute the most probable cluster. A Monte Carlo simulation was used to calculate the p value [9].

In the case of TB, various researchers have used GIS to study this infectious disease. Moonan et al [10] used GIS to identify the geographic locations of TB transmission and incidence in the United States of America during 1993 to 2000. In India, Tiwarin et al. [11] carried out a geo-spatial investigation of TB occurrence in the Almora district using GIS and the SCAN statistics program. Nunes [12] in Portugal detected spatial and temporal clusters during 2000–2004 by using SCAN. The above-mentioned authors agree that GIS and SCAN are useful tools for vigilance against TB.

The SCAN statistics program has been used worldwide by various researchers with different length search windows: the most frequently used are 25% and 50% of the population [11]. Clive et al.[13] added some health determinants in their model, such as age, gender and margination, as co-variants as a form of correction or data adjustment.

The object of this research was to use the spatial statistics program SCAN and GIS to identify the spatial and temporal distribution of TB during 2006 to 2010 and to determine the geographic locations of higher transmission and incidence of TB in the State of Mexico, Mexico.

7.1.5. MATERIALS AND METHODS.

Study location.

This study used as its research area the State of Mexico, located in the centre of the Mexican Republic at 98° 35' 30"–100° 37' 00" West longitude and 18° 21' 15"–20° 17' 00" North latitude, and occupying 22,499.95 km², which represents 1.1% of the national territory. It is divided into 125 municipalities that include 4, 341 localities (Figure 1).

According to the II Censo de Población and Vivienda 2005, (II Population and Housing Census 2005) the State of Mexico had 14,007,495 inhabitants, representing 13.6 % of the entire Mexican population and making it the most populated State.

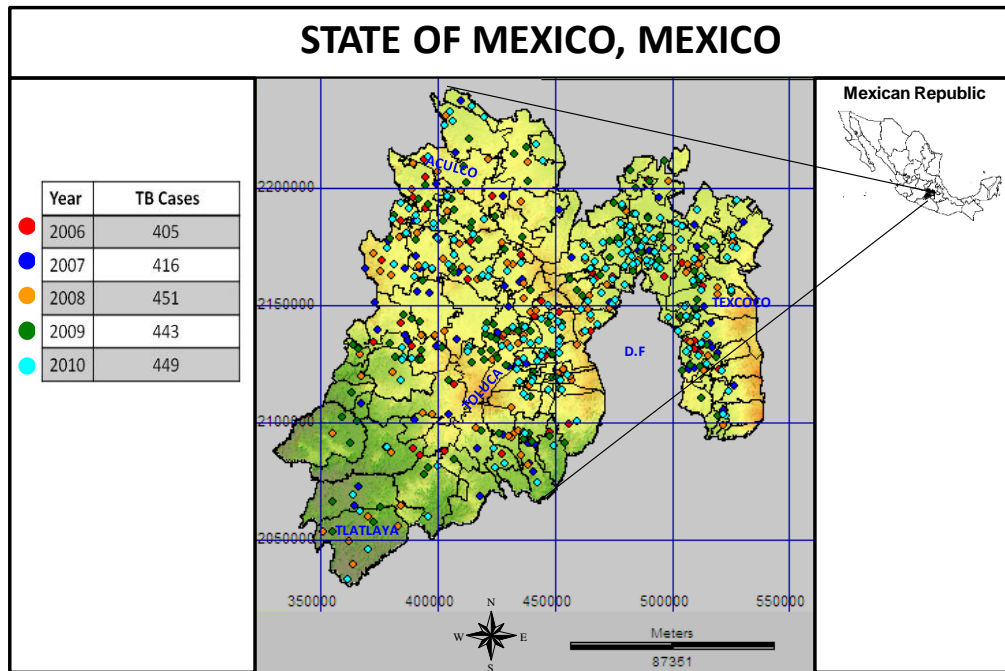


Figure 1. Location and geographic distribution of tuberculosis cases during 2006–2010 in the State of Mexico.

Data collection

a) Population data

In accord with the Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Epidemiology Vigilance National Surveillance), tuberculosis cases were reported from 499 localities during the period 2006–2010. Cases in each locality were categorized using a marginalization index [15]: Category 1, very low; Category 2, low; Category 3, medium; Category 4, high; Category 5, very high. The number, age and gender of the inhabitants in each locality was obtained from the II Population and Housing Census 2005 by the “Instituto Nacional de Estadística y Geografía”, INEGI (National Institute of Statistics and Geography) [14]. Age was classified into five categories: Category 1, 0–4 years old; Category 2, 5–14 years old; Category 3, 15–17 years old; Category 4, 18–59 years old and Category 5, 60 and 60+ years of age. The data for gender was combined with the age categories, and therefore 10 groups of age-gender were created to describe the population of each locality.

b) Tuberculosis case data

The collected cases were diagnosed at several hospitals and healthcare centres and their demographic characteristics were reported to the TB National Registry during 2006–2010. Marginality was obtained from the 2005 marginality index [15] for the locality where each TB case was found. For the statistical strategy, the co-variables were age-gender and margination.

c) Geographic localization data

For data analysis, locality with the TB case was used as a geographic unit. The geo-reference came from the latitude–longitude projection system obtained from the Instituto de Geografía Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM) (Institute of Statistical Geography and Tax Revenue of the State of Mexico) [16].

Statistical and geographic analysis

a) TB cluster detection and identification

Determination and identification of TB clusters was carried out with the statistics spatial SCAN program and calculated with the SaTSCAN™ (V8.0) computer package that obtains statistical significance and the approximate cluster localization. The SaTSCAN™ program requires three files for initiation: cases, population and geography localization files. A Poisson probability model was used with a 25% and 50% search window for high rates: age, gender and margination index were the co-variables.

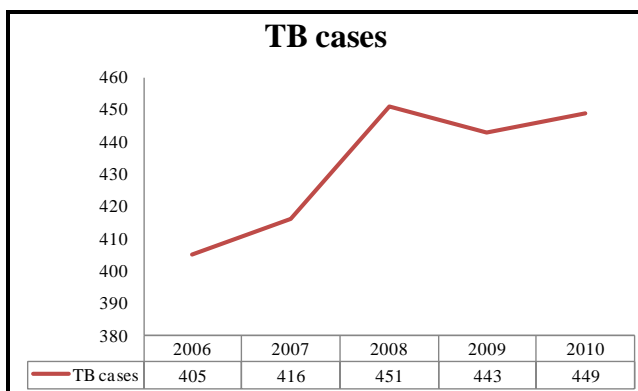
b) Geographic analysis

For the graphic cluster representation, a map was drawn based on the information obtained with the SCAN and the IDRISI Taiga software. A factorial format map of the State of Mexico obtained from the IGCEM and a Lansat 7 satellite medium infrared colour image at bands 2, 4, 7 was used [17].

7.1.6. RESULTS.

There were 2,164 human TB cases detected from 2006 to 2010, distributed in 499 localities and in 125 municipalities. The municipalities with more than 100 TB cases are: Ecatepec de Morelos with 365 (16.9%) cases; Netzahualcōyotl with 172 (7.9%); Naucalpan de Juárez with 153 (7%); Tlalnepantla de Baz with 123 (5.7%); and Toluca county with 109 cases (5%). The

distribution of the 2,164 cases is shown in Graph 1 with an increment from 405 cases in 2006 up to 449 in 2010.



Graph 1. Frequency of TB cases in the State of Mexico during the years 2006 to 2010.

As mentioned in the methodology section, the 10 “age-gender-margination” groups or categories were found in 499 locations with TB cases. A database with 4990 groups was created. Two analyses were performed using the collected information: the first analysis was spatial and the second was a space-time analysis.

Spatial analysis

A search window with a maximum length of $\leq 50\%$ population with high TB rates was used. A primary cluster and five secondary clusters were identified. The centre of the primary cluster was located in the municipality of Valle de Chalco Solidaridad in the locality of Santa Cruz. The relative risk (RR) was 337.68 with 14 TB cases *versus* the 0.04 expected cases. The second cluster was formed of the municipalities of Acolman, Atenco, Chiautla, Chiconcuac, Ecatepec de Morelos, Papalotla, Tecámac, Teotihuacán, Tepetlaoxtoc, Texcoco and Tezoyuca. The RR was 1.68 with 423 TB cases and the expected RR was 282.2 cases. The third cluster, in the Atizapán de Zaragoza, Villa Nicolás Romero and Cuautitlán Izcalli municipalities, had a 215.58 RR with seven TB cases compared to 0.03 expected cases. The 10.75 RR for the fourth cluster with 20 TB cases, located in Huixquilucan and Lerma municipalities, had an expected number of cases of 1.88.

Cluster 5, located in the municipalities of Tlalnepantla de Baz, Tultitlán, Apizapán de Zaragoza and Cuahutitlán Izcalli, was found to have a 4.39 RR with 38 TB cases compared with the 8.77 expected cases.

The last identified secondary cluster, located in the Tlalnepantla de Baz, Jilotzingo, Atizapán de Zaragoza and Naucalpan de Juárez, showed a 10.24 RR with eight TB cases against the 0.78 expected cases.

A maximum length $\leq 25\%$ search window was used for a population with high TB rates and the results of the analysis were similar to those obtained with a $\leq 50\%$ search window. General information about the identified clusters is shown in Table 1, and their geography is shown in Figure 2.

Table 1: TB clusters with a high RR identified in the State of Mexico using a space analysis and a search window maximum length of $\leq 50\%$ and $\leq 25\%$ population, adjusted for age-gender-margination.

Cluster	Loc. ^a	Centre coordinates	Radius (km)	Obs ^b	Exp ^c	RR ^d	LLR ^e	<i>p</i>
Primary cluster	1	19.287 N, 98.933 W	0	14	0.04	337.68	67.5	0.001
Secondary clusters								
	2	19.585 N, -98.945 W	13.11	423	282.20	1.62	35.8	0.001
	3	19.596 N, -99.269 W	4.48	7	0.03	215.58	30.6	0.001
	4	19.306 N, -99.386 W	6.88	20	1.88	10.75	29.3	0.001
	5	19.610 N, -99.191 W	5.08	38	8.77	4.39	26.7	0.001
	6	19.501N, -99.284 W	5.57	8	0.78	10.24	11.4	0.001

^a Locations with TB cases, ^b Observed number of cases in cluster, ^c Expected number of cases in cluster, ^d Relative risk of the cluster, ^e Log likelihood ratio.

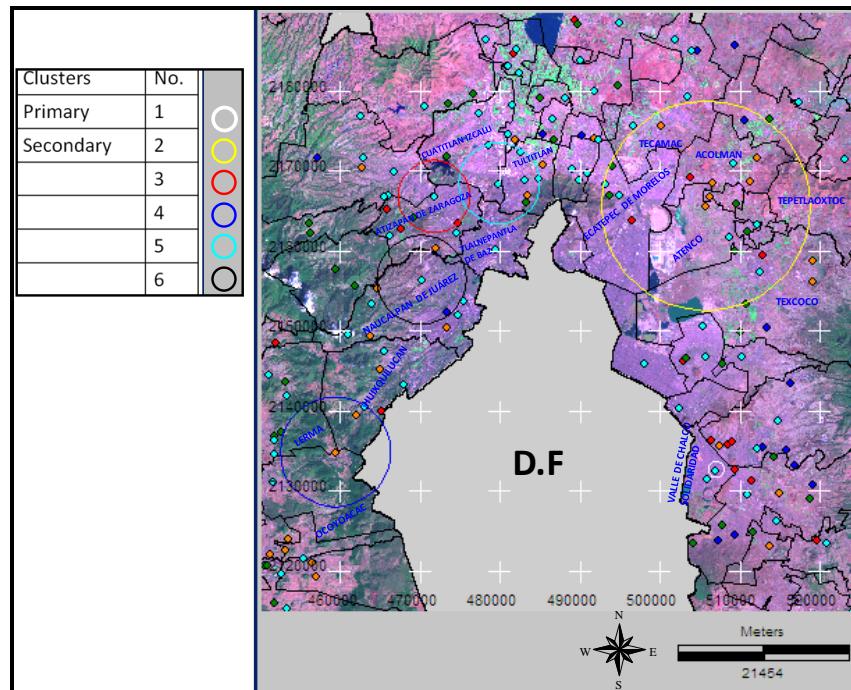


Figure 2: Geographic locations of the identified clusters with high rates detected using a spatial analysis and a search window maximum of $\leq 50\%$ and $\leq 25\%$ population, adjusted for age-gender-margination.

Space-time analysis

A primary cluster was identified using a search window maximum of $\leq 50\%$ population with high TB rates. The cluster centre was located in the Tultitlan, a municipality formed of the Tlalnepantla de Baz, Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, and Atizapán de Zaragoza municipalities. The relative risk (RR) during the 2007–2009 period was 6.22 with 27 TB cases and 4.39 expected cases. Secondary clusters were not identified.

A search window maximum of $\leq 25\%$ population was used to identify three significant clusters. The primary cluster was located in the Valle de Chalco Solidaridad, Ixtapaluca and a small part of Chalco. The RR was 81.08, with 16 TB cases during the period 2008–2006, compared with 0.2 expected cases.

Two secondary clusters were identified. One was similar to that described above using the $\leq 50\%$ population search window. The other was formed by 11 municipalities: Acolman, Atenco, Chicuaula, Chiconcuac, Ecatepec de Morelos, Papalotla, Tecamac, Teotihuacan,

Tepetlaoxtoc, Texcoco and Tezoyuca. The RR was 2.03 with 267 cases of TB during the years 2006–2008 against expected cases of 140.50. General information about the identified clusters is shown in Table 2 and their geography in Figure 3.

Table 2: A cluster with high rates of tuberculosis in the State of Mexico was detected with a spatial-temporal analysis and a search window maximum of $\leq 50\%$ and $\leq 25\%$ risk population, adjusted for age-gender-margination.

Cluster	Loc ^a	Centre coordinates	Radius (km)	Year	Obs ^b	Exp ^c	RR ^d	LLR ^e	<i>p</i>
Primary cluster	1	6 19.315 N, -98.928 W	3.49	2006 - 2008	16	0.2	81.08	54.467248	0.001
Secondary clusters									
	2	19 19.585 N, -98.945 W	11.93	2006 - 2008	267	140.59	2.03	48.880307	0.001
	*3	5 19.610 N, -99.191 W	5.08	2007 - 2009	27	4.39	6.22	26.578700	0.001

^a Locations with TB cases, ^b Observed number of cases in cluster, ^c Expected number of cases in cluster, ^d Relative risk of the cluster, ^e Log likelihood ratio, * Cluster detected with a search window maximum of $\leq 50\%$ risk population

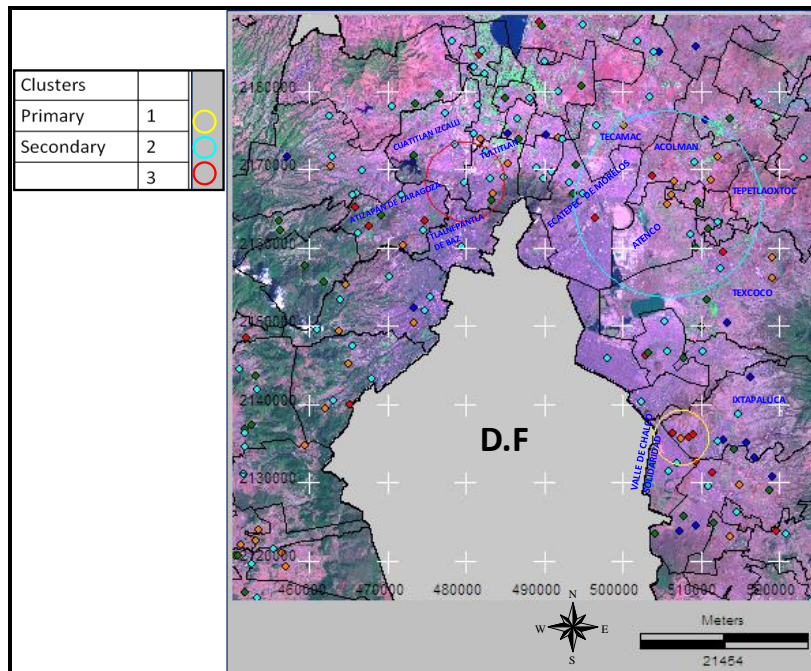


Figure 3. Geography of the identified high TB rate clusters in the State of Mexico detected with a space-time analysis and a search window maximum length of $\leq 50\%$ and $\leq 25\%$ population, adjusted for age-gender-margination.

7.1.7. DISCUSSION.

In the field of epidemiology one of the most important analyses is the detection in space-time of a disease cluster, since a non-control-spreading of the disease takes place and a social or economic factor favours cluster formation. The use of GIS plus spatial statistics has been used to determine spatial distribution patterns of various infectious and non-infectious diseases [18, 19, 20, 21, 22]. SCAN, available in the SaTSCAN™ V8 software, has been used worldwide to detect various disease clusters, including TB.

GISs plus molecular diagnosis techniques have been used to locate TB clusters and to identify the Mycobacterium responsible for the outbreak [10]. Frequently, however, it is not possible to obtain a detailed and complete analysis since the information is mainly based on a positive bacilloscopy.

However, this study obtained data on TB according to age, gender and marginality index, representing valuable information since the highest rate of this disease occurs in adults of 60 and 60+ years of age [3], in males 1.5 to 1 rate and in marginal groups [2].

With the SCAN statistical results and a 25% and 50% search window population and a spatial analysis ($p \leq 0.05$), six clusters were identified, showing that TB is not randomly distributed in the State of Mexico but in clusters in a spatial pattern. In similar studies by Nava et al. [23] in Acapulco, Mexico, using a different spatial method, clusters were not found. We used two search windows (50% and 25%) in order to find small clusters but identification differences were not seen in cluster identification. These results were in agreement with those reported by Tiwarin et al. [11].

The six identified clusters are located close to and around Mexico City (D.F Federal District), the largest city in the Mexican Republic. The highest incidence rates of TB are found in urban zones [24] in comparison with rural areas. Our results agreed with those reported by Moonan et al. [10]. They found a strong association between the strains of TB clusters and the distance to the centre of urban zones.

Three TB clusters were identified with spatial and temporal analysis using the same search windows; two of these clusters grouped the TB cases from the 2006 to 2008 period, and the cases from 2007 to 2009 were in the third cluster. The three clusters all contained the 2008 TB cases, making it the year with the highest incidence.

Of the three identified clusters, only one is in agreement with those identified with the spatial-only analysis, but the others are located in areas close to the spatial clusters.

The results of the present study are of great importance in TB epidemiological surveys in the State of Mexico. The presence of clusters is valuable to the healthcare system since strategy can be revised accordingly in those areas containing TB clusters.

7.1.8. CONCLUSIONS.

TB is spatially clustered in the State of Mexico, Mexico. Nine clusters were identified using two types of analysis: spatial and spatial-temporal. Such clusters were mainly found in Valle de Chalco Solidaridad, Atenco, Ecatepec de Morelos, Tlalnepantla de Baz, Acolma, Tultitlan, Cuautitlán Izcalli, Atizapán de Zaragoza, Huixquilucan and Naucalpan de Juárez, all municipalities that are very close to Mexico City (D.F. Federal District).

7.1.9. ACKNOWLEDGEMENTS.

We extend our thanks to The Health Institute of the State of Mexico for providing the necessary help and support for the study. This work is derived from the Thesis for the degree of Doctorate in Sciences of Health, registered in the PNPC-CONACYT, and benefited from the economic contribution of project SIEA-UAEM 2742/2008U.

7.1.10. REFERENCES.

1. S. D. Lawn and A. I. Zumia, "Tuberculosis," *Lancet*, vol. 378, no. 9785, pp. 57–72, 2011.
2. M. G. Baker, K. Venugopal, and C. P. Howden, *Household crowding and tuberculosis*, World Health Organization Regional Office for Europe, pp. 57-79, Denmark, 2011.
3. Secretaria de Salud, Programa de Acción Específico 2007–2012 Tuberculosis, Distrito Federal, México, 2008.

4. Consejo Nacional de Población (CONAPO), *Índice de Marginación 2005 a nivel localidad*, 2005.
http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=194
5. World Health Organization (WHO), *Global Tuberculosis Control 2010*, Geneva, Switzerland, 2010.
6. Secretaria de Salud, *Tuberculosis en México*, Vigilancia Epidemiológica, Mexico, 2008.
7. R. Martinez, M. Vidaurre, P. Najera, E. Loyola, and C. Castillo, “SIG-Epi Uso de Sistemas de Información Geográfica en Epidemiología y Salud Pública”, *Boletín Epidemiológico, Organización Panamericana de la Salud*, vol. 22, no. 3, pp. 1–8, 2001.
8. M. Kulldorff and N. Nagarwalla, “Spatial disease clusters detection and inference”, *Statistics in Medicine*, vol. 14, no. 9, pp. 799–810, 1995.
9. M. Kulldorff, F. Mostashari, L. Duczmal, K. Yih, K. Kleinman, and R. Platt, “Multivariate SCAN Statistics for Disease Surveillance”, *Statistics in Medicine*, vol. 26, no. 8, pp. 1824–1833, 2007.
10. P. Moonan, B. Bayona, T. Quitugua, J. Oppong, D. Dunbar, K. Jost, G. Burgess, K. Singh, and W. Stephen, “Using GIS technology to identify areas of tuberculosis transmission and incidence”, *International Journal of Health Geographics*, vol. 3, no. 23, 10 p., 2004
11. N. Tiwari, C. Adhikari, A. Tewari, and V. Kandpal, “Investigation of geo-spatial hotspots for the occurrence of tuberculosis in Almora district, India, using GIS and spatial SCAN statistics”, *International Journal of Health Geographics*, vol. 5, no. 33, 11 p., 2006.
12. C. Nunes, “Tuberculosis incidence in Portugal: spatiotemporal clustering”, *International Journal of Health Geographics*, vol. 6, no. 30, 10 p., 2007.
13. E. Clive, S. Wilson, J. Gaines, S. Kingham, C. Tisch and M. Epton, “Spatial implications of covariate adjustment on patterns of risk: Respiratory hospital admissions in Christchurch, New Zealand”, *Social Science & Medicine*, vol. 65, pp. 43–59, 2007.
14. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), *Conteo de Población y Vivienda*, 2005,
http://www.inegi.org.mx/sistemas/consulta_resultados/iter2005.aspx?c=27436&s=est; 2005.
15. Consejo Nacional de Población (CONAPO), *Índice de marginación a nivel localidad*, 2005 (data base),
http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=194; 2005.
16. Instituto de Geografía Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM), *Nomenclator de Localidades del Estado de México*, 2009,
<http://igecem.edomex.gob.mx/descargasgeograficas.htm>

17. Instituto de Geografía Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM), *División Política del Estado de México (Metadatos)*, 2010, <http://igecem.edomex.gob.mx/descargasgeograficas.htm>
18. E. Johannes, D. Harmsen, H. Claus, W. Hellenbrand, M. Frosch, and U. Vogel, “Spatiotemporal analysis of invasive meningococcal disease, Germany”, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 12, no. 11, pp. 1689–1695, 2006.
19. R. E. Bonilla, “Distribución espacio-temporal de la fiebre dengue en Costa Rica”, *Población y Salud en Mesoamérica*, vol. 3, no. 2, pp. 1–9, 2006.
20. J. Oeltmann, J. K. Varma, L. Ortega, Y. Liu, T. O. Rourke, M. Cano, T. Harrington, S. Toney, W. Jones, S. Karuchit, L. Diem, D. Rienthong, J. W. Tappero, K. Ijaz, and S. A. Maloney, “Multidrug-resistant Tuberculosis outbreak among US-bound Hmong refugees, Thailand, 2005”, *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 11, pp. 1715–1721, 2008.
21. D. Wheeler, “A comparison of spatial clustering and cluster detection techniques for childhood leukemia incidence in Ohio, 1996–2003”, *International Journal of Health Geographics*, vol. 6, no. 13, 16 p., 2007,.
22. D. Gregorio, I. Samociuk, H. DeChello, and L. Swede, “Effects of study area size on geographic characterizations of health events: Prostate cancer incidence in Southern New England, USA, 1994–1998”, *International Journal of Health Geographics*, vol. 5, no. 8, 8 p., 2005.
23. E. Nava, A. López, Y. V. Harris, E. Morales, A. P. Mitchell, S. Flores, M. M. Villegas, A. A. Legorreta, J.S. Ledogar and R. Andersson, “Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* cases in Acapulco: spoligotyping and risk factors”, *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2011, 2011.
24. R. Barr, G. Diez, A. V. R. Knirsch, C. A. Pablos and A. Méndez, “Neighborhood poverty and the resurgence of Tuberculosis in New York City, 1984–1992”, *American Journal of Public Health*, vol 91, no. 9, pp. 1487–1493, 2001.

7.2. Título corto del artículo enviado.

“Spatial distribution and prediction of bovine tuberculosis in the state of Mexico, Mexico”

7.2.1. Página frontal del artículo enviado.

“Spatial distribution and prediction of bovine tuberculosis in the State of Mexico, Mexico”

Adrian Zaragoza Bastida¹, Marivel Hernández Tellez², Lilia Patricia Bustamante Montes¹,
Jaime Nicolás Jaramillo Paniagua³, María Eugenia Jaimes Benítez⁴, Germán Eduardo
Mendoza Barrera⁵, Ninfa Ramírez Durán^{1*}

¹Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, 50180, Toluca, México.

²Centro Interamericano de Recursos del Agua, Universidad Autónoma del Estado de México, 50200, Toluca, México.

³Facultad de Medicina Veterinaria Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50200, Toluca, México.

⁴Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México. 50070, Toluca, México.

⁵Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, D.F., México.

*Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina. Paseo Tollocan s/n esquina con Jesús Carranza, C.P. 50180, Toluca, Estado de México. Teléfono (01722) 2773326, e-mail: qramirezd@uaemex.mx.

7.2.2. Carta de envío del artículo.

> From: prevet@elsevier.com
> To: ninfard@hotmail.com
> Date: Wed, 24 Jul 2013 21:00:31 +0100
> Subject: Submission Confirmation for Preventive Veterinary Medicine
>
> Title: Spatial distribution and prediction of bovine tuberculosis in the State of Mexico, Mexico
>
> Dear Dr. Ramirez,
> > Your submission has been received by the journal
> Preventive Veterinary Medicine.
>
> You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:
>
> <http://ees.elsevier.com/prevet/>
> Your username is: Ninfa
> If you need to retrieve password details, please go to:
> http://ees.elsevier.com/prevet/automail_query.asp
>
> Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.
>
> For guidelines on how to track your manuscript in EES please go the following address:
> http://help.elsevier.com/app/answers/detail/p/7923/a_id/89
>
> Thank you for submitting your work to this journal.
>
> Kind regards,
>
> Preventive Veterinary Medicine
> _____
> For further assistance, please visit our customer support site at
> <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range
> of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive
> tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further
> assistance from one of our customer support representatives.
>

7.2.3. ABSTRACT.

Bovine tuberculosis (BT) is a chronic infectious disease that affects both domestic animals and wildlife. Veterinary epidemiology studies evaluate BT using geographic information systems (GIS), which can characterise the spatial and temporal distribution of diseases and identify the geographic areas and animal populations at risk of contracting a disease. The present study used the spatial SCAN statistic to identify the spatial and temporal distribution of BT from 2005 to 2010 in the State of Mexico and created a prediction model using the Mahalanobis Distance statistic to identify areas with a high probability of BT incidence. Three significant clusters ($P < 0.05$) were identified using the spatial SCAN statistic, and the prediction model based on the Mahalanobis Distance identified several areas with a high risk of BT occurrence. The results demonstrate that the occurrence of BT in the State of Mexico is not randomly distributed.

Keywords: Bovine tuberculosis, spatial SCAN statistic, geographic information systems, Mahalanobis Distance statistic.

7.2.4. INTRODUCTION.

Bovine tuberculosis (BT) is a chronic infectious disease whose etiological agent is *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) (Karlson and Lessel, 1970), and it affects both domestic and wild animals (Miller et al., 2007; O'Brien et al., 2002; Phillips et al., 2003). Oral transmission of *M. bovis* occurs through consumption of contaminated grasses in extensive exploitation systems. Aerial transmission is more prevalent in intensive exploitation systems, and young animals in these systems can also be infected by drinking milk contaminated with *M. bovis* (Phillips et al., 2003).

BT is important in Mexico and other Latin American countries because of the zoonotic potential of *M. bovis* infection through the consumption of raw milk and milk derivatives produced with unpasteurised milk; this problem is more prevalent in underdeveloped countries (Abalos and Retamal, 2004; de Kantor et al., 2008; Milián-Suazo et al., 2010). Only 30% of Mexico's milk production is pasteurised (SAGARPA, 1996).

BT causes both direct and indirect economic losses in livestock: infected animals present reduced production of milk and meat and must either be removed or suffer premature death (Milián-Suazo et al., 2002; Perez et al., 2002). Tuberculosis has particular economic repercussions for the international marketing of cattle and beef products because export products must be certified as BT-free (Livingstone et al., 2006; OIE, 2012).

In 1995, Mexico established a national campaign for the eradication of BT that is still in effect. This campaign uses the tuberculin test to diagnose tuberculosis at cattle farms, and the policy for BT control indicates that every animal that tests positive should be sent to slaughter (SAGARPA, 1996). In slaughterhouses, samples from BT-typical lesions are collected for microbiological culture, and if *M. bovis* is isolated, the entire herd is quarantined; however, it is not always possible to trace the source of infection because of the lack of information on the origins of all of the animals (John, 2006; Milián-Suazo et al., 2002; SAGARPA, 1996).

Mexico currently claims that 83.12% of the country has eradicated BT (prevalence <0.5%), and that the State of Mexico has eradicated the bacterium in its southern area (SAGARPA, 2012).

BT can be grouped into certain geographical areas by risk factors, such as sharing pastures, movement of infected animals within the geographic area and informal trade patterns (Darren et al., 2008; Perez et al., 2002; Phillips et al., 2003).

An important tool in veterinary epidemiology is the use of geographic information systems (GIS), which permit the identification of geographic areas and animal populations that are at risk of contracting a disease and the need to take preventive measures. GIS have been used to monitor diseases in time and space, thus generating a better understanding of the occurrence of these diseases (Carpenter, 2001; Ward and Carpenter, 2000a; Ward and Carpenter, 2000b).

Determining the spatial and temporal clustering of a disease is one of the most important techniques in epidemiology. In 1995, Kulldorff and Negarwalla developed the spatial SCAN statistic for the detection and inference of disease clusters in time and space under the log likelihood ratio (LLR) hypothesis (Kulldorff et al., 2005; Kulldorff et al., 2007; Kulldorff, 1995).

The spatial SCAN statistic is a spatial-temporal analysis defined by a large number of transposed cylinders; the circular base of each cylinder defines the geographic area with a radius that can vary from zero to a larger distance as determined by the percentage of the population at risk, whereas the height of the cylinder represents the temporal parameter. The LLR is then calculated for each cylinder. The cylinder with the highest LLR is considered to constitute the most probable cluster. A Monte Carlo simulation is then used to calculate the P value (Kulldorff et al., 2005; Kulldorff et al., 2007).

GIS have been used to study several infectious diseases, including BT. In 2005, Olea-Popelka et al. conducted an analysis of the spatial relationship between the *M. bovis* strains in cattle and badgers in four areas in Ireland using the spatial SCAN statistic, thereby increasing the understanding of the epidemiology of tuberculosis in these geographical areas (Olea-Popelka et al., 2005). In 2007, Miller et al. applied GIS technology and the spatial SCAN statistic to study the resurgence of bovine tuberculosis among white-tailed deer in Michigan (Miller et al., 2007). In Argentina in 2002, Perez et al. used GIS and the spatial SCAN statistic to identify district groupings of bovine tuberculosis and described their geographical distribution (Perez et al., 2002). In 2007, Zendejas-Martinez et al. applied GIS technology to monitor the

geographic distribution of bovine tuberculosis in Guadalajara Jalisco, Mexico, by spatial interpolation (Zendejas et al., 2007).

Current GIS include mathematical models that allow the identification of areas with conditions similar to those of areas where a disease or event is actually occurring. For example, the Mahalanobis Distance statistic is used to predict areas with high probability for the occurrence of an event according to the variables used (Ozdenerol et al., 2008). In the present study, the spatial SCAN statistic and GIS were used to identify the spatial and temporal distribution of bovine tuberculosis from 2005 to 2010 in the State of Mexico. We also created a prediction model using the Mahalanobis Distance statistic to identify at-risk geographic areas in which there are no current reports of bovine tuberculosis.

7.2.5. METHODOLOGY.

2.1. Study area.

The research area of this study was the State of Mexico, located in the centre of Mexico between the geographical coordinates Longitude West $98^{\circ} 35' 30''$ - $100^{\circ} 37' 00''$ and Latitude North $18^{\circ} 21' 15''$ - $20^{\circ} 17' 00''$ (INEGI, 2012a) (Figure 1).

2.2. Data collection.

2.2.1. Bovine tuberculosis case data.

Information on BT-positive herds was obtained from the national eradication campaign that lasted from 2005 to 2010. The information was provided by the Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México (CFPPEM), who reported a total of 50 herds in which *Mycobacterium bovis* was isolated and 72 herds that tested positive for BT but were diagnosed with a comparative cervical tuberculin.

2.2.2. Geographic localisation data.

For data analysis, each locality with a BT case was used as a geographic unit. The georeferences were obtained from the latitude-longitude projection system provided by the

Instituto de Geografía Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM) (IGECEM, 2009).

2.3. Temporal and spatial analysis.

2.3.1. Statistical analysis.

BT clusters were identified using the spatial SCAN statistic. A discrete probability model was employed with both spatial and temporal permutation using search windows of 50% and 25%, respectively. The analysis was conducted using the SaTSCAN software (V8.0) computer package to test the statistical significance and to determine the approximate location of each cluster.

2.3.2. Geographic analysis.

A map was made using the results of the spatial SCAN statistical analysis to provide a geographic representation of the clusters using the Idrisi Taiga 16.0 software. A vector format map of the State of Mexico was obtained from the Instituto de Geografía Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM) (Institute of Statistical Geography and Tax Revenue of the State of Mexico) (IGECEM, 2010), and Landsat 7 satellite medium infrared colour images at bands 2, 4 and 7 were also used (USGS, 2012).

2.5 Prediction model.

2.5.1. Selection of bovine tuberculosis cases.

The geographic coordinates of the 50 herds in which *M. bovis* had been reported by CFPPEM were imported into the Idrisi Taiga 16.0 software in vector format; the coordinates were later converted into raster format to create a 93-meter buffer for each herd.

2.5.2. Environmental variables.

Soil use and soil type were used as environmental variables; data for both were obtained in vector format from the Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (INEGI, 2012b) and converted to raster format using Idrisi Taiga 16.0. Temperature data were obtained from the National Meteorological Service and spatialised by interpolation in Idrisi Taiga 16.0. The

digital elevation model (DEM) was obtained from Science for Changing World (USGS) (USGS, 2012).

2.5.3. Demographic variables.

The following demographic variables were considered: a) the 2005 marginality index of the Consejo Nacional de Población (CONAPO) (CONAPO, 2005), which was spatialised by interpolation; b) the distance between the roads of the State of Mexico, which was obtained from the roads vector (INEGI, 2012b); and c) the distance from urban polygons, which was obtained from the soil use vector (INEGI, 2012b).

2.5.4. Statistical analysis.

The Mahalanobis Distance statistic was used to predict areas with a high risk of BT occurrence using Idrisi Taiga 16.0 software; predictions were made using 80% of the selected sites, whereas 20% were used for model validation. For the prediction model, the following formula was used:

$$MD = (X - m)^T C^{-1} (X - m)$$

Where MD is the Mahalanobis Distance, X is the vector of BT cases, m is the vector of the mean values of the independent variables, C^{-1} is the inverse covariance matrix of the independent variables and T indicates whether a vector should be transposed.

7.2.6. RESULTS.

Most of the herds that tested positive for BT in the state of Mexico from 2005 to 2010 were located in the southern region of the state. The following locations reported more than seven BT-positive herds: Tlatlaya, with 32 positive herds; Zacazonapan, with 18 positive herds; Amatepec, with nine positive herds; Luvianos, with eight positive herds; and Almoloya de Alquisiras, with seven positive herds. In the northern part of the state, seven cases were registered in the municipality of Polotitlan (Figure 1).

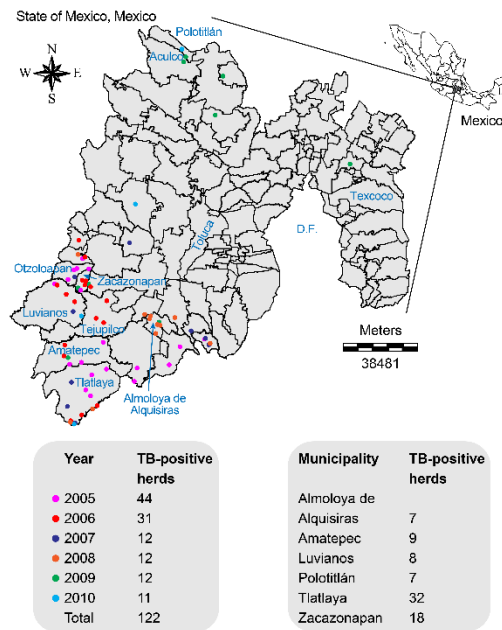


Figure 1. Location and geographic distribution of BT-positive herds from 2005 to 2010 in the State of Mexico.

3.1. Spatial and temporal analysis.

The spatial SCAN statistic, using a search window of $< 50\%$, identified one cluster of BT-positive herds ($P < 0.009$). The centre of this cluster was located at longitude north 18.9, latitude west -100.25, and it had a radius of 31.91 km, in which 58 BT-positive herds were identified from 2008 to 2010 (Table 1). The location of the centre of this cluster corresponds to the municipality of Luvianos, and the cluster's radius covered all of the municipalities of Otzoloapan, Zacazonapan and Tejupilco and portions of the municipalities of San Simon de Guerrero, Santo Tomas of Bananas, Valle de Bravo, Temascaltepec Texcaltitlán, Sultepec, Amatepec and Tlatlaya (Figure 2).

The spatial SCAN statistic, using a search window of $< 25\%$, identified two clusters of BT-positive herds ($P < 0.05$). The first cluster, with a $P < 0.026$, had its centre at longitude north 19.12 and latitude west -100.28, and it had a radius of 7.8 km, in which 19 BT-positive herds were identified from 2008 to 2010. The location of the centre of this cluster corresponds to the municipality of Otzoloapan, and this cluster extends into the municipalities of Zacazonapan, Temascaltepec, Santo Tomas de lo Platanos and Valle del Bravo. The second cluster, with $P <$

0.031, was located at longitude north 18.54 and latitude west -100.23, and it had a radius of 19.2 km, in which 28 BT-positive herds were identified from 2009 to 2010. The centre of the cluster corresponds to the municipality of Tlatlaya, and the cluster extends into a part of Amatepec (Table 1, Figure 2).

Table 1. Clusters of BT-positive herds detected by permutation spatial searches with windows of $\leq 50\%$ and $\leq 25\%$ in the State of Mexico.

Cluster	Search window	Centre coordinates	Radios (km)	Year	BT positive herds*	LLR	P
1	$\leq 50\%$	18.90, -100.25	31.9	2008-2010	58	6.3	0.009
2	$\leq 25\%$	19.12, -100.28	7.8	2008-2010	19	5.6	0.026
3	$\leq 25\%$	18.54, -100.23	19.2	2009-2010	28	5.4	0.031

* Herds reported as positive for bovine tuberculosis by the CFPPEM; LLR: Log likelihood ratio.

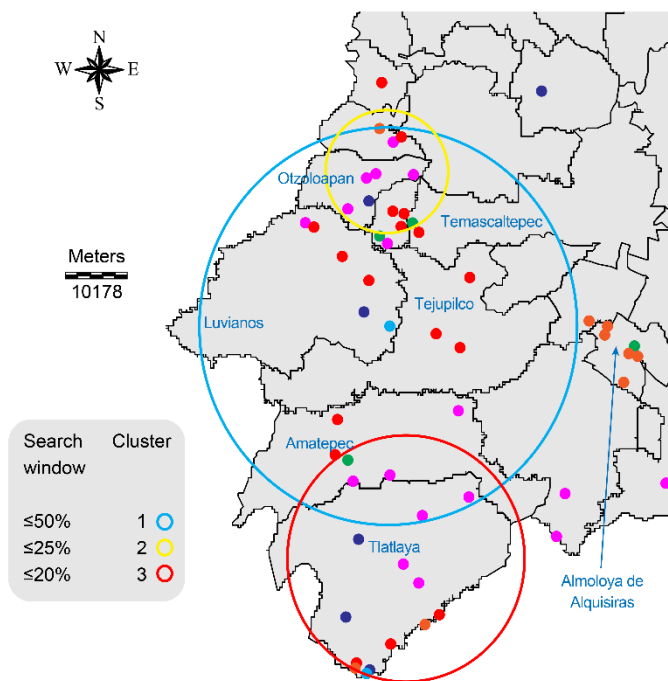
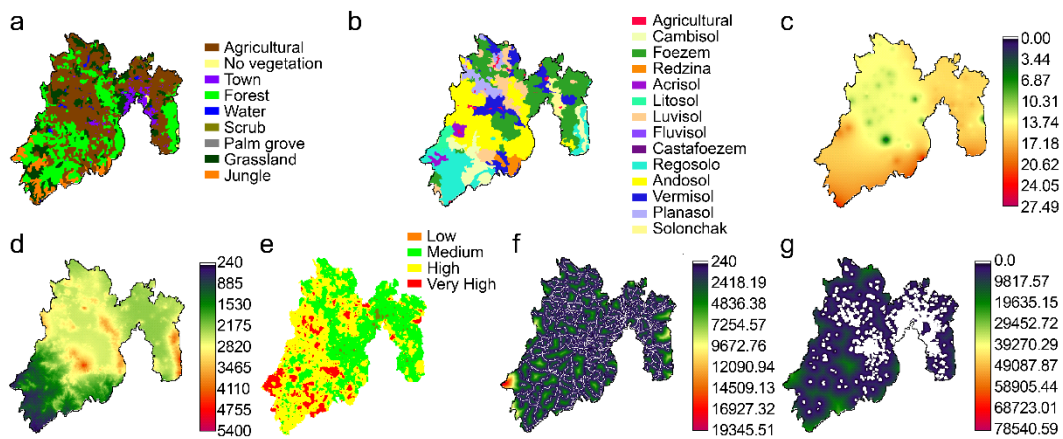


Figure 2. Geographic locations of the clusters identified using permutation spatial searches with windows of $\leq 50\%$ and $\leq 25\%$ in the State of Mexico.

3.2. Prediction model.

The following observations were made regarding the environmental variables: a) forests, jungles and grasslands dominate the soil usage map in the southern part of the State of Mexico; b) regosol is the most common type of soil found in the southern part of the State of Mexico; c) the highest temperatures are found in the southern part of the State of Mexico; and d) in the digital elevation model (DEM), the lowest elevation is found in the municipality of Tlatlaya (400 meters above sea level), which is located in the southern part of the State of Mexico.

The following observations were made regarding the demographic variables: a) in the map of the marginality index for 2005 in the State of Mexico, the southern region had predominately high or very high marginality; b) the southern region of the State of Mexico contains relatively few roads and therefore large distances are present between roads; and c) there are relatively few urban polygons in the area, with large distances between them (Figure 3).



a) Soil use, b) Soil type, c) Temperature, d) Digital elevation model, e) 2005 Marginality index, f) Distance between the roads, g) Distance from urban polygons.

Figure 3. Demographic and environmental variables for the State of Mexico used in the prediction model for bovine tuberculosis.

The prediction model identified the following areas as having the highest risk of BT (75-100%) occurrence: the municipalities of Tlatlaya, Amatepec, Luvianos, Tejupilco Zacazonapan, Temascaltepec, Santo Tomas de los Platanos, Ixtapan de Oro and Valle de Bravo. The northern, central and eastern parts of the state were predicted as having lower BT risk, with intervals ranging from 0-40%.

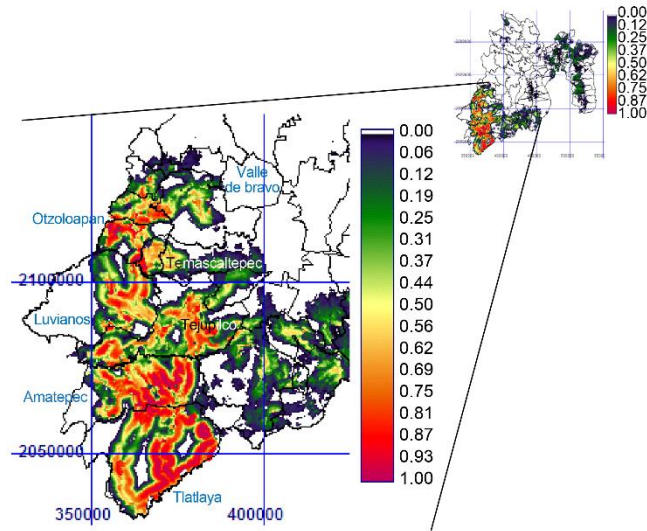


Figure 4. Prediction map for bovine tuberculosis in the State of Mexico constructed using the Mahalanobis Distance statistic.

In the 20% of herds in which *Mycobacterium bovis* had been isolated that were used to validate the prediction model, five herds had a probability of 30% to 45% for BT-positive cases, whereas the other five had a probability of 55 to 82% for BT-positive cases.

7.2.7. DISCUSSION.

BT is a disease that can be found worldwide, and Mexico is no exception, with cases observed across the entire republic. In the State of Mexico, most positive cases of BT are found in the south of the state because the BT eradication campaign is still ongoing in this area; the region is currently declared a “BT in eradication” zone.

The spatial SCAN statistical analysis showed that BT is not randomly distributed in the State of Mexico but rather clusters in a spatial pattern, and three clusters were identified.

The first cluster was identified using a search window of $< 50\%$, and 58 of the 105 BT-positive cases were grouped together in a radius of 31.9 km in this cluster. The cluster extended to the municipalities of Amapepec, Luvianos, Sultepec, Tlatlaya and Tejupilco, which contain the majority of cattle in the southern part of the state, according to the 2007 census (INEGI, 2007). This result is in agreement with the characteristics of the cluster identified in Argentina by Perez et al. (Perez et al., 2002).

The two remaining clusters were identified using a search window of $\leq 25\%$. The first of these clusters contained 19 BT-positive herds within a 7.8 km radius, whereas the other contained 28 herds within a radius of 19.2 km. The first and second clusters were located in the municipalities of Zacazonapan and Tlatlaya, respectively, which contained the highest numbers of positive herds.

The clusters identified using a window of $\leq 25\%$ show a clear agglomeration of herds; this pattern was not observed in the cluster identified with a window of $\leq 50\%$ because this cluster covered most municipalities in which the eradication of bovine tuberculosis was still in progress.

The prediction model constructed using the Mahalanobis Distance and the demographic and environmental variables allowed us to locate other areas in the southern part of the State of Mexico with conditions similar to those of areas in which cases of bovine tuberculosis are actually occurring and the causative agent of the disease has been isolated. However, the model was not able to identify geographic areas with high BT risk in the rest of the state because the environmental and demographic conditions associated with BT occurrence are typical of the southern region of the State of Mexico, as can be observed in the maps of the variables used in the study (Figure 3).

However, prediction model identified several areas with a very high probability of bovine tuberculosis cases in the south, including the municipalities of Ixtapan Oro and Valle del Bravo, for which BT information was unavailable.

An important finding of our study was that the results of the spatial SCAN statistic and the prediction model constructed using the Mahalanobis Distance are in agreement; the three identified clusters cover areas with a higher probability of bovine tuberculosis. The Mahalanobis distance model can be used to make comparisons in studying the spatial distribution of BT, but the use of more than one method is recommended for this type of study (Ward and Carpenter, 2000a, b).

7.2.8. CONCLUSIONS.

GIS proved to be a useful tool in this study of the geographical distribution of bovine tuberculosis in the State of Mexico. The spatial SCAN statistical analysis shows that the disease is not randomly distributed but rather is concentrated in certain municipalities in the southern part of the State of Mexico. The prediction model indicated several other areas in the state with a high probability of bovine tuberculosis occurrence, and the results of the prediction model match those of the statistic spatial SCAN.

7.2.9. ACKNOWLEDGMENTS.

The authors extend their thanks to the Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México for providing the necessary help and support for the study. This work is derived from a thesis for the degree of Doctorate in Health Sciences registered in the PNPC-CONACYT.

7.2.10. REFERENCES.

- Abalos, P., Retamal, P., 2004, Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz 23, 583-594.
- Carpenter, T.E., 2001, Methods to investigate spatial and temporal clustering in veterinary epidemiology. Preventive Veterinary Medicine 48, 303-320.

- CONAPO 2005. Índice de marginación a nivel localidad 2005 (base de datos) (http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=46&Itemid=194).
- Darren, M.G., Istvan, Z.K., Andrew, P.M., Rowland, R.K., 2008, Estimates for local and movement-based transmission of bovine tuberculosis in British cattle. *Proc. R. Soc. B* 275, 1001–1005.
- de Kantor, I.N., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Da Silva Telles, M.A., Osório Ribeiro, M., Garzón Torres, M.C., Llerena Polo, C., Ribón, W., García, V., Kuffo, D., Asencios, L., Vásquez Campos, L.M., Rivas, C., de Waard, J.H., 2008, Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis* 88, 358-365.
- IGECEM 2009. Nomenclátor de localidades del Estado de México (<http://igecem.edomex.gob.mx/descargasgeograficas.htm>).
- IGECEM 2010. División Política del Estado de México (Metadatos) 2010 (<http://igecem.edomex.gob.mx/descargasgeograficasDIVIPOLITICA.zip>).
- INEGI 2007. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007, Geografía, I.N.d.E.y., ed. (México, http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/Agro/ca2007/Resultados_Agricola/default.aspx).
- INEGI 2012a. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geografia/default.aspx>).
- INEGI 2012b. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia/default.aspx>).
- John, D.C., 2006, Tuberculosis in cattle: Strategic planning for the future. *Veterinary Microbiology* 112, 369-381.
- Karlson, A.G., Lessel, E.F., 1970, *Mycobacterium bovis* nom. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 20, 273-282.

- Kulldorff, M., Heffernan, R., Hartman, J., Assuncao, R., Mostashari, F., 2005, A Space–Time Permutation SCAN Statistic for Disease Outbreak Detection. *PLoS Medicine* 2, 216-224.
- Kulldorff, M., Mostashari, F., Duczmal, L., Yih, K., Kleinman, K., Platt, R., 2007, Multivariate SCAN Statistics for Disease Surveillance. *Statistics in Medicine* 26, 1824-1833.
- Kulldorff, M., Nagarwalla, N., 1995, Spatial disease clusters detection and inference. *Statistics in Medicine* 14, 799-810.
- Livingstone, P.G., Ryan, T.J., Hancox, N.G., Crews, K.B., Bosson, M.A.J., Knowles, G.J.E., McCook, W., 2006, Regionalisation: A strategy that will assist with bovine tuberculosis control and facilitate trade. *Veterinary Microbiology* 112, 291-301.
- Milián-Suazo, F., Banda-Ruíz, V., Ramírez-Casillas, C., Arriaga-Díaz, C., 2002, Genotyping of *Mycobacterium bovis* by geographic location within Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 55, 255-264.
- Milián-Suazo, F., Pérez-Guerrero, L., Arriaga-Díaz, C., Escartín-Chávez, M., 2010, Molecular epidemiology of human cases of tuberculosis by *Mycobacterium bovis* in Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 97, 37-44.
- Miller, R., Kaneene, J.B., Schmitt, S.M., Lusch, D.P., Fitzgerald, S.D., 2007, Spatial analysis of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Michigan, USA. *Preventive Veterinary Medicine* 82, 111-122.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fierke, J.S., Hogle, S.A., Winterstein, S.R., Cooley, T.M., Moritz, W.E., Diegel, K.L., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Kaneene, J.B., 2002, Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995–2000. *Preventive Veterinary Medicine* 54, 47-63.
- OIE, 2012, Medidas comerciales, procedimientos de importación y exportación y certificación veterinaria, In: *Terrestrial Animal Health Code*.

- Olea-Popelka, F.J., Flynn, O., Costello, E., McGrath, G., Collins, J.D., O’Keeffe, J., Kelton, D.F., Berke, O., Martin, S.W., 2005, Spatial relationship between *Mycobacterium bovis* strains in cattle and badgers in four areas in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 71, 57-70.
- Ozdegerol, E., Bialkowska-Jelinska, E., Taff, G., 2008, Locating suitable habitats for West Nile Virus-infected mosquitoes through association of environmental characteristics with infected mosquito locations: a case study in Shelby County, Tennessee. *International Journal of Health Geographics* 7, 12.
- Perez, A.M., Ward, M.P., Torres, P., Ritacco, V., 2002, Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Preventive Veterinary Medicine* 56, 63-74.
- Phillips, C.J.C., Foster, C.R.W., Morris, P.A., Teverson, R., 2003, The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. *Research in Veterinary Science* 74, 1-15.
- SAGARPA, 1996, Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-045-1995 Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina (*M. bovis*). *Diario Oficial de la Federación*, 12-32.
- SAGARPA 2012. Situación Actual de la Tuberculosis Bovina. In Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (<http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>).
- USGS 2012. Science for a changing world (<http://earthexplorer.usgs.gov/>).
- Ward, M.P., Carpenter, T.E., 2000a, Analysis of time–space clustering in veterinary epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine* 43, 225-237.
- Ward, M.P., Carpenter, T.E., 2000b, Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 257-284.
- Zendejas, H.M., Milián, S.F., García, L.C., Cruz, G.B., Escalera, A.M.A., Márquez, G.H., 2007, La utilidad de los sistemas de información geográfica en la predicción de la distribución regional de la tuberculosis bovina. *Téc Pec Méx* 45, 279-287.

7.3. Resultados adicionales.

7.3.1. Tuberculosis humana. Etapa 1

Los casos detectados de tuberculosis humana de los años 2006 al 2010, fueron 2,164, los cuales se encontraron distribuidos en 499 Localidades y estas a su vez en 125 Municipios del Estado de México; los Municipios que destacan con la mayor frecuencia por arriba de 100 casos de tuberculosis son: Ecatepec de Morelos con 365 (16.9%), Netzahualcóyotl con 172 (7.9%), Naucalpan de Juárez con 153 (7%), Tlalnepantla de Baz con 123 (5.7%) y Toluca con 109 casos (5%) (Figura 1).

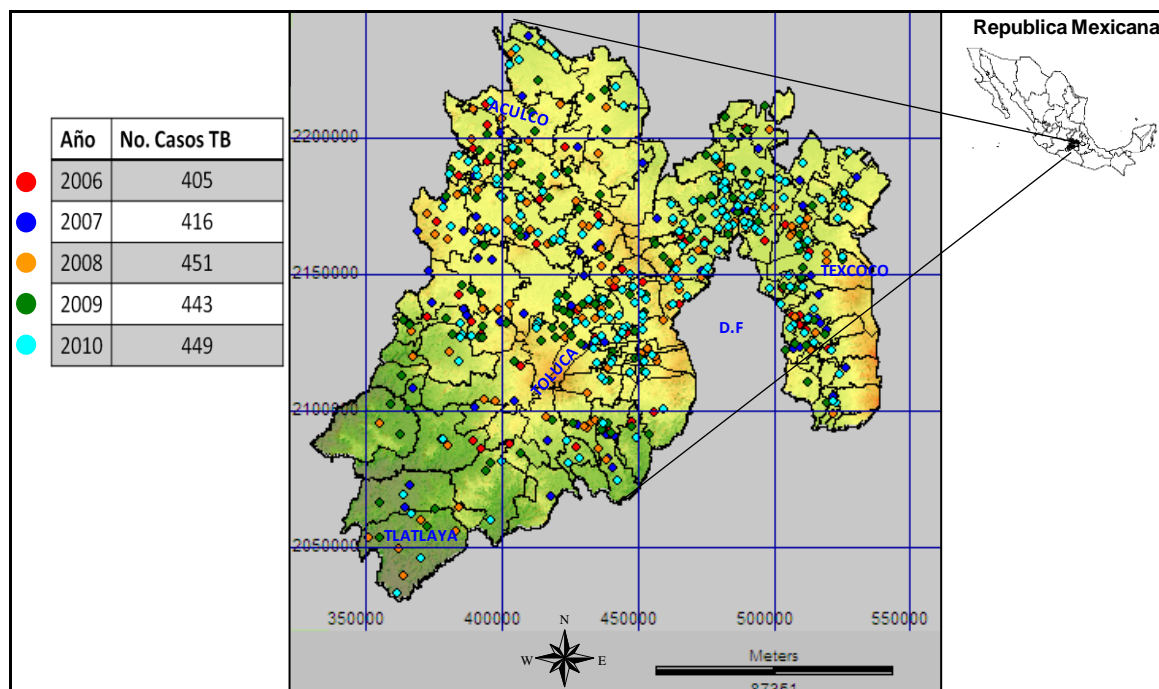


Figura 1. Ubicación del Estado de México y la distribución geográfica de los casos de tuberculosis durante los años 2010-2006.

La distribución de los 2,164 casos de TB se muestra en la Figura 2 donde se aprecia un incremento de 405 casos del 2006 hasta 449 casos en el 2010.

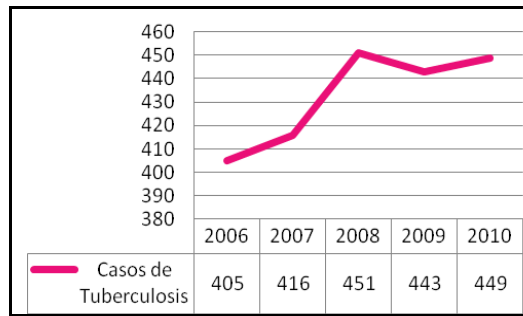


Figura 2. Frecuencia de casos de Tuberculosis en el Estado de México, durante los años 2010-2006.

Como se mencionó en la metodología se crearon 10 grupos “edad-sexo-marginación” por localidad que presentó casos de tuberculosis, un total de 499 Localidades con casos de tuberculosis, con lo que se construyó una base de datos 4990 grupos, con la información recabada se realizaron dos análisis, el primero espacial y el siguiente espacio- temporal.

7.3.1.1. Análisis espacial.

Se utilizó una ventana de búsqueda con un tamaño máximo de $\leq 50\%$ de la población, con altas tasas de tuberculosis, por medio de la cual se identificó un clúster primario y cinco secundarios.

El centro del primario se ubicó en el Municipio de Valle de Chalco Solidaridad en la localidad de Santa Cruz, el Riesgo Relativo (RR), para esta localidad fue de 337.68, con 14 casos de tuberculosis, comparado con 0.04 casos esperados (Tabla 1 y Figura 3).

El segundo clúster lo conformaron los Municipios de Acolman, Atenco, Chiautla, Chiconcuac, Ecatepec de Morelos, Papalotla, Tecámac, Teotihuacán, Tepetlaoxtoc, Texcoco y Tezoyuca, el RR para este clúster fue de 1.68, con 423 caso de tuberculosis, comparado con 282.2 casos esperados (Tabla 1 y Figura 3).

El tercer clúster se ubicó en los Municipio de Atizapán de Zaragoza, Villa Nicolás Romero y Cuautitlán Izcalli, el RR para el clúster fue de 215.58, con 7 casos de tuberculosis, comparado con 0.03 casos esperados (Tabla 1 y Figura 3).

El cuarto clúster se ubicó en los Municipios de Huixquilucan y Lerma, presentado un RR de 10.75, con 20 casos de tuberculosis, comparado con 1.88 casos esperado (Tabla 1 y Figura 3).

El quinto clúster se ubicó en los Municipios de Tlalnepantla de Baz, Tultitlán, Atizapán de Zaragoza y Cuautitlán Izcalli, presentando un riesgo de 4.39, con 38 casos de tuberculosis, comparado con 8.77 casos esperados (Tabla 1 y Figura 3).

El último clúster secundario identificado se ubicó en los Municipios de Tlalnepantla de Baz, Jilotzingo, Atizapán de Zaragoza y Naucalpan de Juárez, con un riesgo de 10.24, con 8 casos de tuberculosis, comparado con 0.78 casos esperados (Tabla 1 y Figura 3).

Se utilizó una ventana de búsqueda con un tamaño máximo de $\leq 25\%$ de la población, con altas tasas de tuberculosis, los resultados del análisis fueron similares a los obtenidos con la ventana de búsqueda de $\leq 50\%$ (Tabla 1 y Figura 3).

7.3.1.2. Análisis espacial y temporal.

Se utilizó una ventana de búsqueda con un tamaño máximo de $\leq 50\%$ de la población, con altas tasas de tuberculosis, se identificó solo un clúster y su centro se ubicó en el municipio de Tultitlan, los Municipios que conforman el clúster son Tlalnepantla de Baz, Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, y Atizapán de Zaragoza, el Riesgo Relativo (RR) para este clúster fue de 6.22, con 27 casos de tuberculosis durante los años 2007-2009, comparado con 4.39 casos esperados para este clúster, no se identificaron clústers secundarios (Tabla 2 y Figura 4).

Tabla 1. Clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial utilizando ventanas de búsqueda $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.

Clúster	No. Localidades	Coordenadas centro	Radio (km)	No. casos	RR	LLR	P
Primario	1	19.3 N-98.9 W	0	14	337.7	67.5	0.001
secundarios	2	19.6 N-98.9 W	13.1	423	1.6	35.8	0.001
	3	19.6 N-99.3 W	4.4	7	215.6	30.6	0.001
	4	19.3 N-99.4 W	6.8	20	10.7	29.3	0.001
	5	19.6 N-99.2 W	5.1	38	4.4	26.7	0.001
	6	19.5 N-99.3 W	5.6	8	10.2	11.4	0.001

RR Riesgo relativo, LLR Razón de máxima verosimilitud.

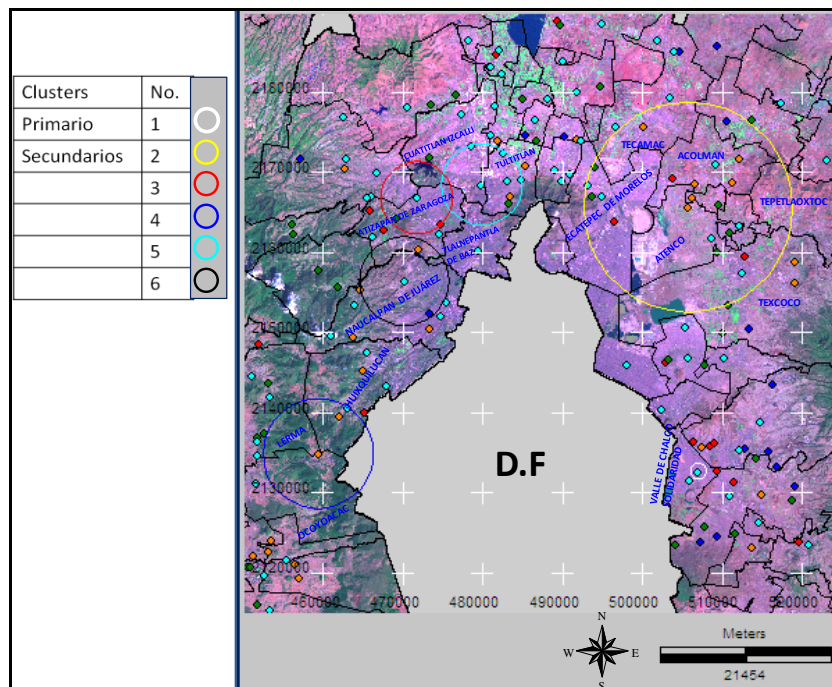


Figura 3. Ubicación geográfica de los clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial con ventanas de búsqueda de $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.

Se utilizó una ventana de búsqueda de un tamaño máximo $\leq 25\%$ de la población, con el cual se identificaron tres clústers significativos.

El clúster primario se ubicó en los municipios de Valle de Chalco Solidaridad, Ixtapaluca y una pequeña parte de Chalco, el RR para el clúster fue de 81.08, con 16 casos de tuberculosis durante los años 2006-2008, comparados con 0.2 casos esperados (Tabla 2 y Figura 4).

Se identificaron dos clústers secundarios uno de ellos fue similar al que se describió anteriormente utilizando un ventana de busque de $\leq 50\%$ de la población, el restante está conformado por 11 Municipios entre ellos Acolman, Atenco, Chicauatla, Chiconcuac, Ecatepec de Morelos, Papalotla, Tecámac, Teotihuacán, Tepetlaoxtoc, Texcoco y Tezoyuca, el RR para el clúster fue de 2.03, con 267 casos de tuberculosis durante los años 2006-2008, comparado con 140.50 casos esperados (Tabla 2 y Figura 4).

Tabla 2. Clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial y temporal utilizando ventanas de búsqueda $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.

Clúster	No. Localidades	Coordenadas centro	Radio (km)	Año	No. casos	RR	LLR	P	
Primario	1	6	19.3 N-98.9 W	3.5	2006-2008	16	81.08	54.5	0.001
Secundarios									
	2	19	19.6 N-98.9 W	11.9	2006-2008	267	2.03	48.9	0.001
	3*	5	19.6 N-99.2 W	5	2007-2009	27	6.22	26.6	0.001

RR Riesgo relativo, **LLR** Razón de máxima verosimilitud, *Clúster de tuberculosis con altas tasas en el Estado de México, detectado por un análisis espacial y temporal con una ventana de búsqueda de $\leq 50\%$ de población en riesgo.

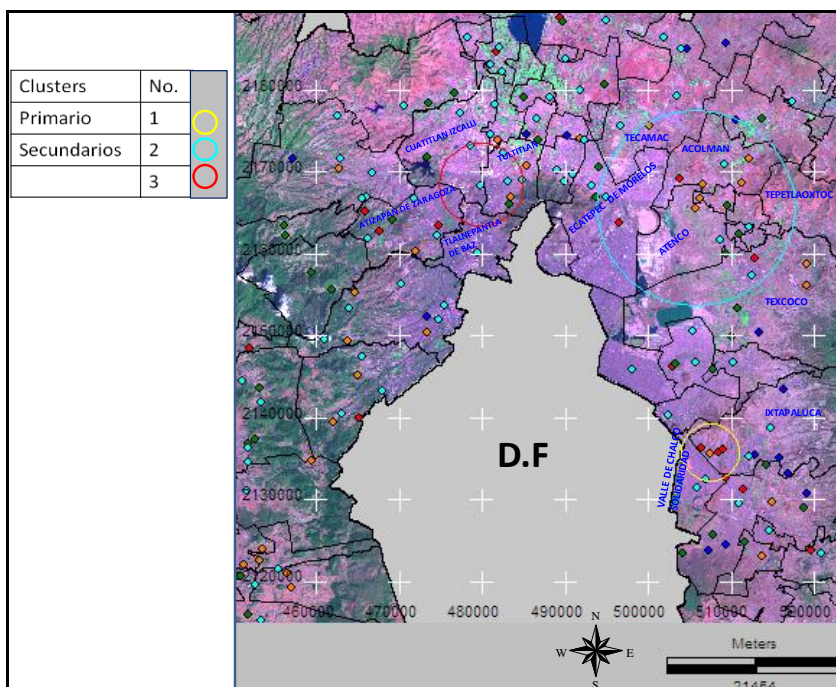


Figura 4: Ubicación geográfica de los clústers de tuberculosis identificados con un análisis espacial y temporal con ventanas de búsqueda de $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.

7.3.2. Tuberculosis humana. Etapa 2

7.3.2.1. Captación de muestras de esputo.

Tomando como base los resultados de los SIG se seleccionaron las zonas de captación de muestras. Se recolectaron 31 muestras de pacientes con cuadros respiratorios y diagnóstico positivo a tuberculosis por baciloscopia positiva (BAAR), las muestras se recolectaron de 7 clínicas del IMSS jurisdicción oriente (Tabla 3).

La información recabada muestra que los pacientes en promedio tenían 57 años de edad, un Índice de Masa Corporal de 25.8, el 65% de los pacientes son masculinos, el 40% de los pacientes están pensionados, 3 pacientes tenían familiares con antecedente de tuberculosis y solo un paciente ya había sufrido de tuberculosis (Tabla 4 y 5).

Tabla 3. Ubicación de las Clínicas del IMSS de donde se colectaron muestras de pacientes.

No. Clínica	Municipio	Dirección	No. Pacientes
62	Cuautitlán de Romero R.	Av. 16 de Septiembre No 39	3
64	Tlalnepantla de Baz	Gustavo Baz y Av. Ceylán	11
68	Ecatepec de Morelos	Av. Morelos	3
77	Ecatepec de Morelos	San Agustín	5
79	Tlalnepantla de Baz	Valle de Ceylán	1
91	Coacalco de Berriozábal	Villa de las Flores	6
92	Ecatepec de Morelos	Av. Central	2
Total			31

Con respecto a los síntomas clínicos los pacientes presentaron tos, fiebre, diaforesis, disnea, mialgias, artralgia, astenia, adinamia, artritis, pérdida de peso (Tabla 6).

Tabla 4. Características demográficas de los pacientes con baciloscopía positiva.

Variable	Mínimo	Máximo	Media	DS
Edad	22	102	57	19.7
Talla	138	175	160	12
Peso	31	90	62	12.7
IMC	14.5	44.24	25.8	7.4

DS Desviación Estándar, IMC índice de masa corporal

Las principales enfermedades que tenían los pacientes diagnosticados con tuberculosis fueron diabetes, hipertensión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, alcoholismo y una paciente fibrosis pulmonar (Tabla 7).

Tabla 5. Características sociodemográficas de los pacientes con baciloscopía positiva.

Variable	No. Pacientes	Categoría	Frecuencia	Porcentaje
Sexo	31	Masculino	20	65
		Femenino	11	35
Ocupación*	20	Hogar	6	30
		Empleado	5	25
		Pensionado	8	40
		Estudiante	1	5
Antecedentes Familiares TB*	20	No	17	85
		Si	3	15
Antecedente de TB*	20	No	19	95
		Si	1	5

*no se contó con la información del 100% de los pacientes.

Tabla 6. Síntomas clínicos de los pacientes con baciloscopía positiva.

Variable	No de pacientes	Categoría	Frecuencia	Porcentaje
Tos*	22	Ausencia	4	20
		Presencia	18	80
Fiebre*	20	Ausencia	4	70
		Presencia	16	30
Diaforesis*	20	Ausencia	13	65
		Presencia	7	35
Disnea*	20	Ausencia	15	75
		Presencia	5	25
Mialgias*	22	Ausencia	18	82
		Presencia	4	18
Artralgia*	22	Ausencia	18	82
		Presencia	4	18
Astenia*	21	Ausencia	16	80
		Presencia	5	20
Adinamia*	21	Ausencia	16	80
		Presencia	5	20
Artritis*	20	Ausencia	19	95
		Presencia	1	5
Pérdida de peso*	20	Ausencia	8	40
		Presencia	12	60

*no se contó con la información del 100% de los pacientes.

Tabla 7. Enfermedades de los pacientes con baciloscopía positiva.

Enfermedad	No de pacientes	Categoría	Frecuencia	Porcentaje
Diabetes*	21	Ausencia	10	48
		Presencia	11	52
Hipertensión*	23	Ausencia	17	74
		Presencia	6	26
EPOC*	22	Ausencia	17	77
		Presencia	5	23
Alcoholismo*	21	Ausencia	18	90
		Presencia	3	10
Fibrosis Pulmonar*	20	Ausencia	19	95
		Presencia	1	5

*no se contó con la información del 100% de los pacientes, **EPOC** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

7.3.2.2. Procesamientos en el laboratorio.

7.3.2.2.1. Tinción de Ziehl-Neelsen.

Con respecto a los resultados en el laboratorio, 24 muestras resultaron positivas a la tinción de Ziehl-Neelsen antes y después de ser sometidas al proceso de descontaminación, en 7 muestras no se observaron bacilos alcohol resistentes (BAAR) antes y después de ser sometidas al proceso de descontaminación (Tabla 8).

7.3.2.2.2. Aislamiento de cepas de *Mycobacterium* sp.

Se aislaron 10 cepas con BAAR procedentes de diferentes pacientes, en 9 cepas se observó un crecimiento lento las colonias se desarrollaron después de 14 días de incubación, solo en una cepa se observó crecimiento a los 7 días, las 10 cepas no presentan pigmentación y su aspecto fue seco y granular (Tabla 8).

7.3.2.2.3. Identificación genética de *Mycobacterium* sp. aisladas de esputo.

Las 10 cepas aisladas en el presente trabajo de muestras de esputo amplificaron el marcador filogenético de 100 pb presente en el gen rRNA 23S (Figura 5) y se les amplificó el gen rRNA 16S (Figura 6).

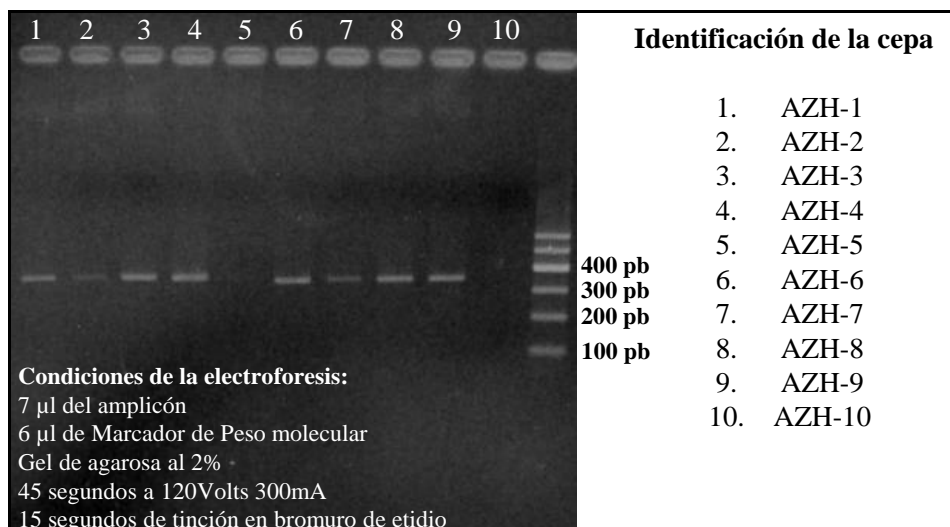


Figura 5. Amplificación del marcador filogenético en las cepas aisladas de muestras de esputo.

Por medio de la comparación de las secuencias obtenidas y las depositadas en el GenBank se identificó que 9 cepas tiene una semejanza del 100% con las micobacterias que forman el complejo tuberculosis y la cepa restante tiene una semejanza del 99.9% *Mycobacterium conceptionense* (Tabla 9).

Tabla 8. Resultados de las baciloscopias y aislamientos a partir de las muestras de esputo.

Información general de las muestras				Baciloscopia			Cultivo y aislamiento				
Id-LAB	Id-SEC	Procedencia	Clúster	Direc	Descon	LJ	F-Ino	F-Crec	SB	F-Ino	F-Crec
62-1	/	Cuautitlán	3 y 5	-	-	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
62-2	/	Teoloyucan	2	-	-	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
62-3	/	Tultepec	2	-	-	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
64-1	/	Tlalnepantla	5 y 6	++	+	/	30/03/2012	/	/	30/03/2012	/
64-2*	AZH-1	Tlalnepantla	5 y 6	++	+	C	23/04/2012	21/05/2012	C	23/04/2012	21/05/2012
64-3	/	Tlalnepantla	5 y 6	+	+	/	17/05/2012	/	/	17/05/2012	/
64-4*	AZH-2	Tlalnepantla	5 y 6	+	+	/	17/05/2012	/	C	17/05/2012	/
64-5*	AZH-3	Tlalnepantla	5 y 6	+	+	/	17/05/2012	/	C	17/05/2012	27/05/2012
64-6*	AZH-4	Tlalnepantla	5 y 6	+	+	/	21/06/2012	/	C	21/06/2012	27/06/2012
64-7*	AZH-5	Tlalnepantla	5 y 6	+	+	C	21/06/2012	/	C	21/06/2012	27/06/2012
64-8*	AZH-6	Tlalnepantla	5 y 6	++	++	C	27/08/2012	17/09/2012	/	27/08/2012	/
64-9	/	Tlalnepantla	5 y 6	+	+	/	28/09/2012	/	/	28/09/2012	/
64-10	/	Tlalnepantla	6 y 6	+	+	/	28/09/2012	/	/	28/09/2012	/
64-11	/	Tlalnepantla	7 y 6	+	+	/	28/09/2012	/	/	28/09/2012	/
68-1*	AZH-7	Ecatepec	2	++	+	/	27/08/2012	/	C	27/08/2012	10/9/2012
68-2*	AZH-8	Tecámac	2	++	+	/	27/08/2012	/	C	27/08/2012	10/9/2012
68-3	/	Tecámac	2	+	+	/	27/08/2012	/	/	27/08/2012	/
77-1*	AZH-9	Ecatepec	2	+	+	C	07/05/2012	21/05/2012	/	07/05/2012	/

77-2	/	Ecatepec	2	+	+	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
77-3	/	Ecatepec	2	+	+	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
77-4	/	Ecatepec	2	-	-	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
77-5	/	Ecatepec	2	-	-	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
79-1	/	Tlalnepantla	5 y 6	-	-	/	07/05/2012	/	/	07/05/2012	/
91-1	/	Tultitlan	5	+	+	/	23/04/2012	/	/	23/04/2012	/
91-2	/	Coacalco	Sin/Clus	++	++	/	23/04/2012	/	/	23/04/2012	/
91-3	/	Coacalco	Sin/Clus	+	+	/	23/04/2012	/	/	23/04/2012	/
91-4*	AZH-10	Coacalco	Sin/Clus	++	+	/	23/04/2012	/	C	23/04/2012	28/05/2012
91-5	/	Coacalco	Sin/Clus	++	+	/	23/04/2012	/	/	23/04/2012	/
91-6	/	Coacalco	Sin/Clus	-	-	/	23/04/2012	/	/	23/04/2012	/
92-1	/	Ecatepec	2	++	+	/	17/05/2012	/	/	17/05/2012	/
92-2	/	Ecatepec	2	++	+	/	17/05/2012	/	/	17/05/2012	/

Id-LAB identificación de la muestra en el laboratorio, **Id-SEC** identificación de la cepa secuenciada, **Sin/Clus** muestra colectada fuera de los clúster identificados, **Direc** baciloscopia directa de la muestra sin ningún tratamiento, **Descon** baciloscopia después del proceso de descontaminación de la muestra, - no se observaron BAAR en más de 100 campos observados, + se observa entre 10 y 99 BAAR en 100 campos observados, ++ se observan de 1 a 10 BAAR por campo en 50 campos observados, **LJ** medio Lowenstein Jensen, **SB** medio Stonebrink, **C** crecimiento bacteriano, **F-Ino** fecha de inoculación del medio de cultivo, **F-Crec** Fecha en la que se observó el crecimiento bacteriano, / no se observó crecimiento bacteriano después de tres meses de incubación, * cepas aisladas y secuenciadas.

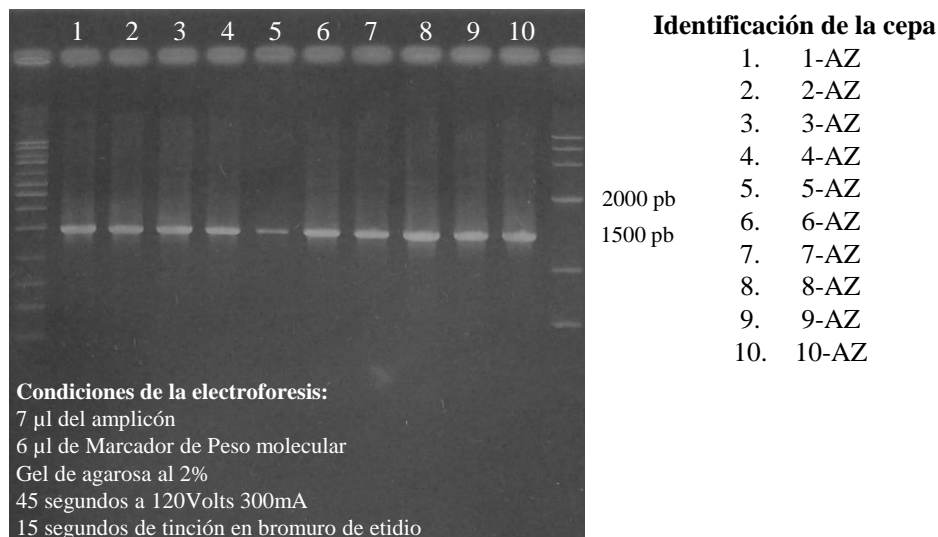


Figura 6. Amplificación del gen rRNA 16S a las cepas aisladas de las muestras de esputo.

Tabla 9. Comparación de secuencias de las cepas aisladas con las cepas depositadas en Gen Bank, utilizando Blast y Eztaxon.

Id-LAB	Id-SEC	Semejanza Blast	(%)	Semejanza Eztaxon	(%)
64-2	AZH-1	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
64-4	AZH-2	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
64-5	AZH-3	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
64-6	AZH-4	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
64-7	AZH-5	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
64-8	AZH-6	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
68-1	AZH-7	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
68-2	AZH-8	<i>M. conceptionenses</i>	99	<i>M. conceptionenses</i>	99.9
77-1	AZH-9	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100
91-4	AZH-10	<i>C. tuberculosis</i>	100	<i>C. tuberculosis</i>	100

C. tuberculosis complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti* y *M. caprae*), **Id-LAB** identificación de la muestra en el laboratorio, **Id-SEC** identificación de la cepa secuenciada

7.3.2.3. Análisis filogenético.

El árbol filogenético se formó con el género *Mycobacterium* y dos grupos de especies, el primer grupo está conformado por las micobacterias que pertenecen al complejo tuberculosis y el segundo con especies muy relacionadas entre ellas como son *M. conceptionense*, *M. senegalense* y *M. farcinogenes*, el árbol permitió observar las relaciones filogenéticas entre las cepas colección del género y especies con las cepas aisladas en el presente trabajo. Los valores de bootstrap se obtuvieron de 1000 repeticiones, para formar la raíz del árbol se utilizó una secuencia de *Salmonella enterica* (Figura 7).

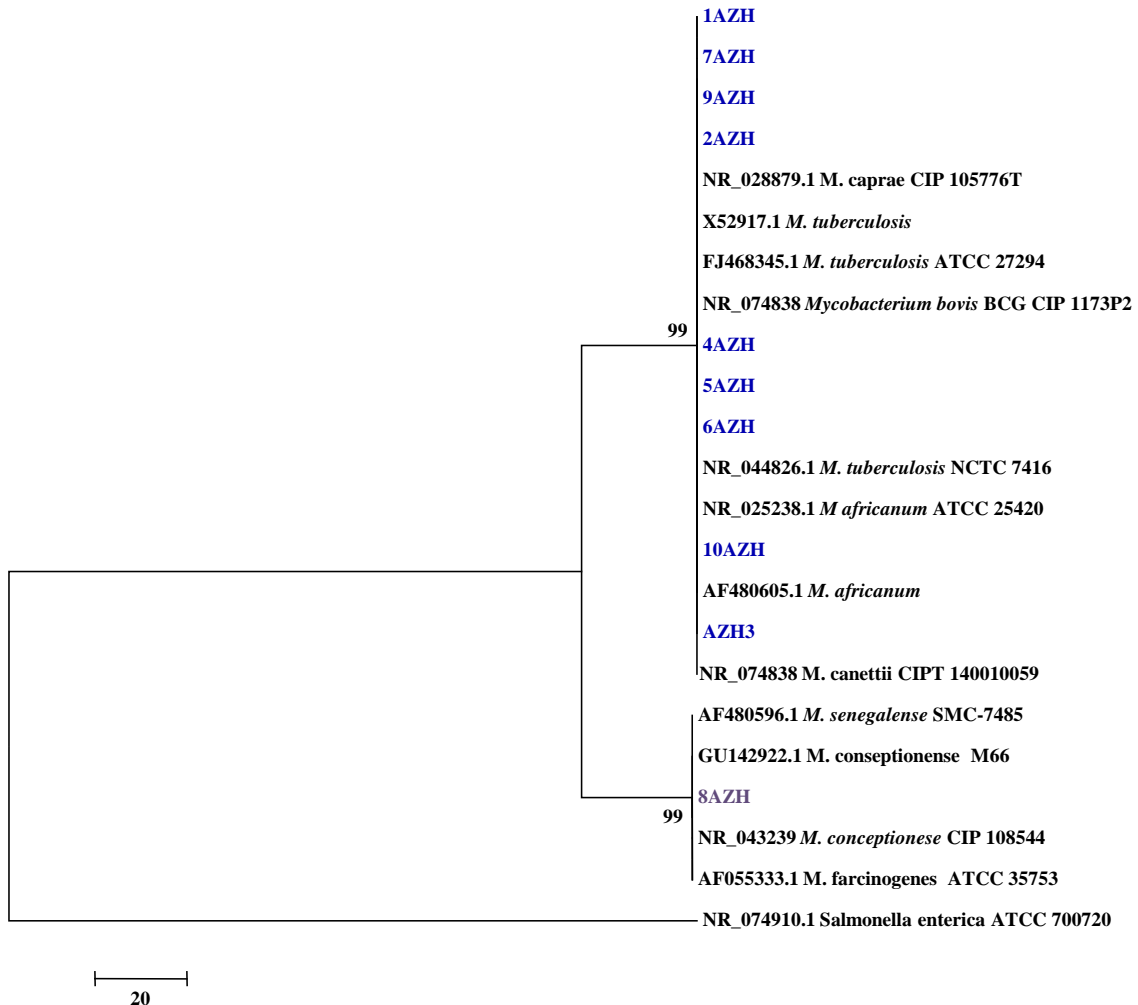


Figura 7. Árbol filogenético construido con secuencias del gen rRNA 16S de las cepas aisladas y cepas de colección.

Por otra parte se analizaron las diferentes variables que se obtuvieron para realizar una comparación entre los pacientes de los cuales se aislaron las micobacterias con los pacientes de los cuales no se aislaron micobacterias, sin embargo solo la diabetes ($P=0.034$) y la fibrosis pulmonar ($P= 0.05$) fueron significativas (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de las características de los pacientes con aislamiento de BAAR y sin aislamiento de BAAR.

Variable	Categoría	No	Con aislamiento	Sin aislamiento	Valor-P*
Edad	media(años)	28	7	21	0.5594
IMC	media	29	7	22	0.5129
Sexo	Masculino	20	6	14	0.873
	Femenino	11	3	8	
	Hogar	6	2	4	
Ocupación	Empleado	5	0	5	0.444
	Pensionado	8	1	7	
	Estudiante	1	0	1	
Tos	Ausencia	4	0	4	0.38
	Presencia	18	3	15	
Fiebre	Ausencia	14	3	11	0.219
	Presencia	6	0	6	
Diaforesis	Ausencia	13	1	12	0.212
	Presencia	7	2	5	
Disnea	Ausencia	15	1	14	0.071
	Presencia	5	2	3	
Diabetes	Ausencia	10	0	10	0.034
	Presencia	11	4	7	
Hipertensión	Ausencia	17	3	14	0.423
	Presencia	6	2	4	
EPOC	Ausencia	17	3	14	0.905
	Presencia	5	1	4	
Alcoholismo	Ausencia	18	3	15	0.445
	Presencia	3	0	3	
Fibrosis Pulmonar	Ausencia	19	0	19	0.05
	Presencia	1	1	0	
Artritis	Ausencia	19	3	16	0.85
	Presencia	1	0	1	
Artralgia	Ausencia	18	2	16	0.47
	Presencia	4	1	3	

Astenia	Ausencia	16	3	13	0.549
	Presencia	5	0	5	
Adinamia	Ausencia	15	3	12	0.526
	Presencia	6	0	6	

*ttest, *Chi2

7.3.3. Tuberculosis bovina. Etapa 1

Los hatos positivos a TBb en el Estado de México se encontraron distribuidos principalmente el sur del estado, siendo Tlatlaya el municipio con mayor frecuencia de hatos positivos (32), seguido por Zacazonapan con 18, Amatepec con 9, Luvianos 8, sin embargo en la parte norte del estado en el municipio de Polotitlán se presentaron 7 hatos positivos (Figura 8).

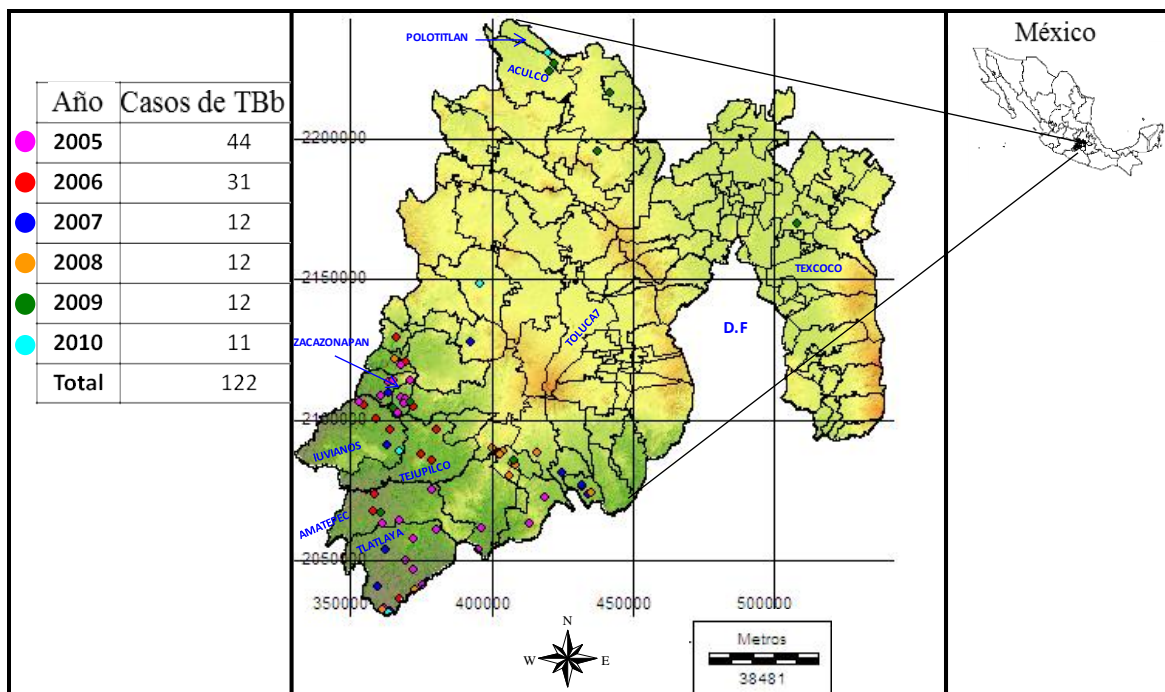


Figura 8. Distribución geográfica de los hatos de tuberculosis bovina del Estado de México, durante el periodo 2005-2010.

7.3.3.1. Análisis espacial y temporal.

El estadístico SCAN, con una ventana de búsqueda del $\leq 50\%$, identificó un agrupamiento de TBb con un valor de P 0.009, las coordenadas geográficas del centro fueron longitud norte 18.90 y latitud oeste -100.25, con un radio de 31.91 km, en el cual se aglomeran 58 hatos positivos a TBb (Tabla 11), el agrupamiento se ubicó en el Municipio de Luvianos, comprendiendo la totalidad de los Municipios de Otzoloapan, Zacazonapan y Tejupilco; y una parte del territorio de los Municipios de San Simón de Guerrero, Santo Tomas de los Plátanos, Valle de Bravo, Temascaltepec, Texcaltitlán, Sultepec, Amatepec y Tlatlaya (Figura 9).

Tabla 11. Clústers de tuberculosis bovina identificados por permutación espacial y temporal con ventanas de búsqueda de $\leq 50\%$ y $\leq 25\%$.

clúster	Ventana de búsqueda	Coordenadas del centro	Radio (km)	Año	No de hatos positivos *	LLR	Valor-p
1	50	18.90,-100.25	31.9	2008-2010	58	6.3	0.009
2	25	19.12, -100.28	7.8	2008-2010	19	5.6	0.026
3	25	18.54, -100.23	19.2	2009-2010	28	5.4	0.031

*Hatos reportados como positivos a TB por el CMFPPEM, LLR razón máxima de verosimilitud.

Con la finalidad de encontrar nuevos agrupamientos, se utilizó una ventana de búsqueda con un tamaño máximo de $\leq 25\%$, con la cual se identificaron dos agrupamientos de TB bovina.

El primero con un valor de P 0.026, las coordenadas geográficas del centro fueron longitud norte 19.12 y latitud oeste -100.28, con un radio de 7.8 km, en el cual se aglomeran 19 hatos positivos a TB (Tabla 11), el agrupamiento se ubicó en el Municipio de Otzoloapan, comprendiendo una parte del territorio de los municipios de Zacazonapan, Temascaltepec, Santo Tomas de los plátanos y Valle de Bravo (Figura 9).

El segundo agrupamiento con un valor de P 0.031, las coordenadas geográficas del centro fueron longitud norte 18.54 y latitud oeste -100.23, con un radio de 19.2 km, en el cual aglomeran 28 hatos positivos a TB bovina (Tabla 11), el agrupamiento se ubicó en el Municipio de Tlatlaya, comprendiendo una parte del territorio de Amatepec (Figura 9).

7.3.3.2. Modelo de predicción.

Se construyeron tres mapas con las variables demográficas: en el mapa de marginalidad del Estado de México se observó que en la zona sur predomina la alta y muy alta marginalidad, el mapa de distancia a carreteras mostro que en la zona sur del Estado existen pocas carreteras y por lo tanto las mayores distancias, en el mapa de distancia a polígonos urbanos se observó que en la zona existen grandes distancias a polígonos urbanos (Figura 10).

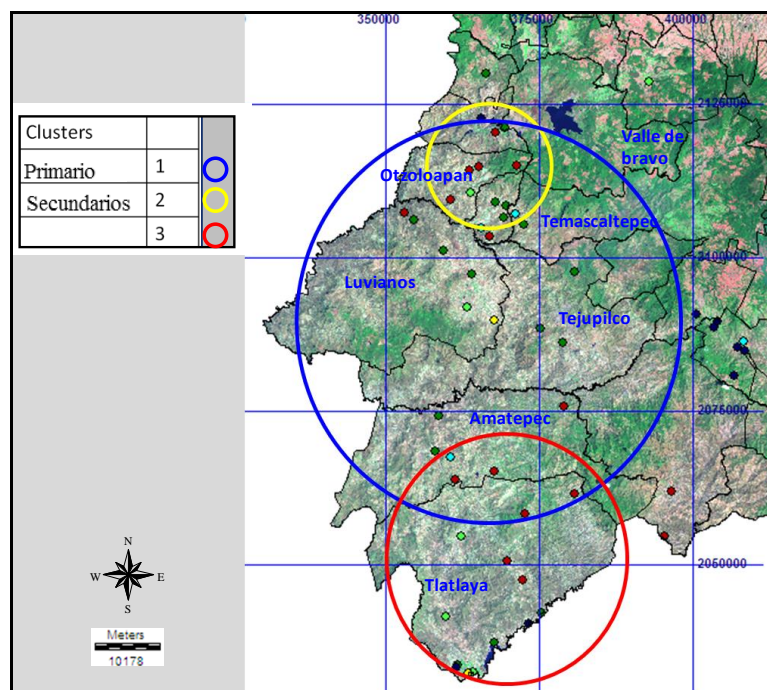


Figura 9. Ubicación de los clústers de tuberculosis bovina detectados por permutación espacial y temporal.

Se construyeron cuatro mapas con las variables ambientales: en el mapa de uso de suelo se observa que existen diferentes uso de suelo en el Estado y en la zona sur predominado los bosques, selvas y pastizales, en el mapa de tipo de suelo se observó que el suelo predominante

en el sur del Estado de México es el regosol, en el mapa de temperatura media anual se observó que las mayores temperaturas están en el sur del Estado y en el mapa de elevación se observó que la zona sur es la de menor altitud en comparación con el resto del Estado. Se observó que las variables utilizadas no están distribuidas uniforme en el Estado de México (Figura 10).

El modelo de predicción identificó las mayores probabilidades (75-100%) de ocurrencia de casos de TB bovina en los zonas geográficas de los municipios de Tlatlaya, Amatepec, Luvianos, Tejupilco, Zacazonapan, Temascaltepec, Santo tomas de los Plátanos, Valle de Bravo e Ixtapan del Oro. En tanto que en el centro, norte y oriente del Estado de México se identificaron las nulas y menores probabilidades de existencia de casos de TB bovina (0-40%) (Figura 11).

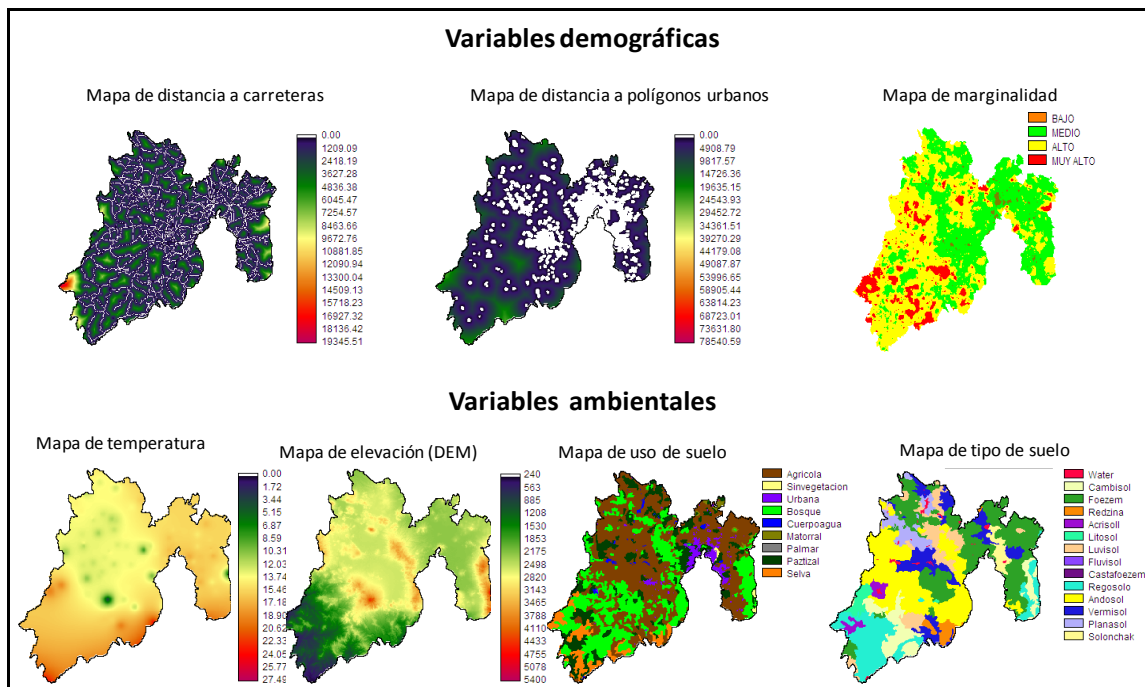


Figura 10. Variables demográficas y ambientales del Estado de México, utilizadas en el modelo de predicción de la tuberculosis bovina.

Los resultados para la validación del modelo de predicción utilizando 10 hatos (20%) con aislamiento de *Mycobacterium bovis*, permitió observar que 5 hatos tenían una probabilidad

del 30 al 45% de que existieran casos de TB y en el restante se observaron probabilidades del 55 al 82 % de que existieran casos de TB bovina en su ubicación geográfica.

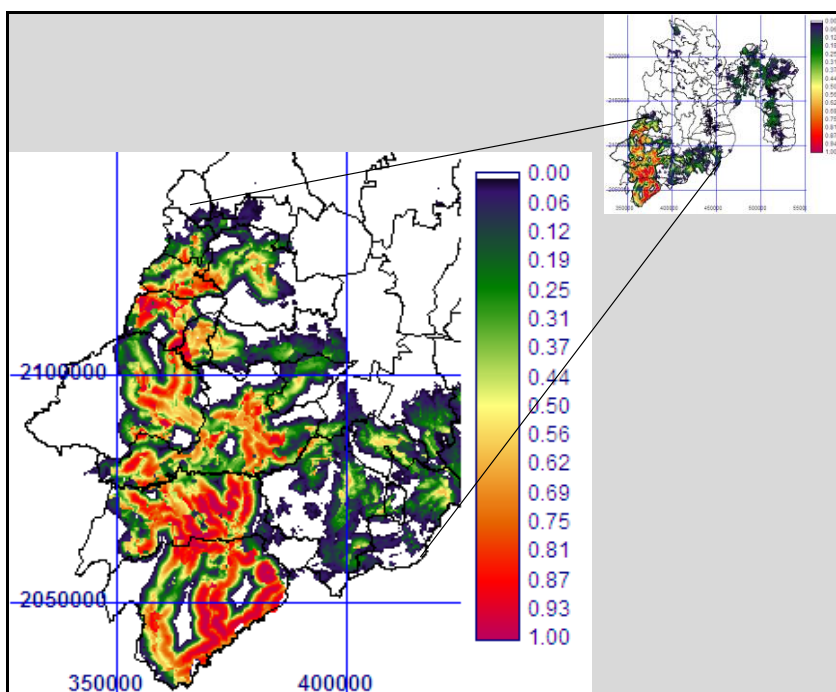


Figura 11. Mapa de predicción de la tuberculosis bovina en el Estado de México utilizando el modelo de distancia de Mahalanobis.

7.3.4. Tuberculosis bovina. Etapa 2

7.3.4.1. Captación de muestras de leche y exudado nasal de bovinos.

Se recolectaron 103 muestras de cuatro hatos de los municipios de Temascaltepec (1) y Zacazonapan (3), 35 muestras fueron de leche y 68 de exudado nasal (Tabla 12).

7.3.4.2. Procesamientos en el laboratorio.

7.3.4.2.1. Tinción de Ziehl- Neelsen.

El 100% de las muestras colectadas resultaron negativas a la tinción de Ziehl-Neelsen no se observaron bacilos acido-alcohol resistentes (BAAR) en la revisión de más de 100 campos en el microscopio.

Tabla 12. Número muestras de los hatos muestreados en el clúster 2 identificado en el Sur del Estado de México.

Información General	Hato 1	Hato 2	Hato 3	Hato 4	Total
Municipio	Temascaltepec	Zacazonapan	Zacazonapan	Zacazonapan	
Raza	F1 suizo-cebú	Holstein-F	Holstein-F	Holstein-F	
Ubicación geográficas	La-19°03'13.7" Lo-00°13'36.7"	La-19°03'39.5" Lo-00°16.'30.9"	La-19°04'0.4" Lo-00°15'11.5"	La-19°03'41", Lo-100°16'06"	
Antecedentes de TBb bovina	Prevalencia de 0.2%*	Prevalencia de 0.2% *	Prevalencia de 0.2% *	Prevalencia de 0.2% *	
Muestras obtenidas					
Leche	15	20	0	0	35
Hisopo nasal	0	18	23	27	68
Total					103

La Latitud, Lo Longitud, TBb tuberculosis bovina, * información obtenida por el CFPPEM.

7.3.4.2.2 Aislamiento de cepas a partir de muestras de leche y exudado nasal.

Con respecto al aislamiento de cepas de las muestras colectadas, se revisaron frecuentemente los diferentes medios de cultivo, se observó crecimiento desde los primeros siete días post-inoculación, en las muestras de leche se observaron diferentes colonias (más de 3 colonias por caja y tubo) en todos los medios inoculados para este tipo muestra. En las muestras de hispo nasal se observó una mayor diversidad de colonias (más de 4 colonias por caja y tubo) en todos los medios inoculados para estas muestras (Tabla 13).

Tabla 13. Numero de cajas y tubos con crecimiento bacteriano de las muestras de bovinos.






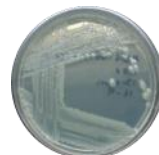
Muestra	Middlebrook	Middlebrook-P*	Stonebrink
Leche	35	35	35
Hisopo nasal	68	68	68
Total	103	103	103

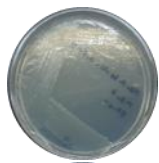


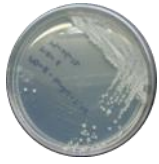



* Middlebrook adicionado con piruvato de sodio.

Una vez seleccionas las colonias de interés, se aislaron en el medio Middlebrook y Medio Middlebrook adicionado con Piruvato de sodio de acuerdo al medio del que fueron aisladas.

Se recuperaron 103 cepas, las cuales fueron agrupadas como se mencionó en la metodología, se conformaron 13 grupos, 17 cepas fueron BAAR las cuales fueron incluidas en los grupos 11 y 12 (Tabla 14).

Tabla 14. Agrupación de las cepas aisladas de muestras de bovinos de acuerdo a características macroscópicas y microscópicas.

Grupo	No. cepas	Característica morfológica			Ziehl-Neelsen	Imagen
		Pigmentación	Aspecto			
1	29	Amarillo	Cremosa	-		
2	10	SNP	Lisa	-		
3	14	SNP	Rugosa	-		
4	2	Salmon	Rugosa	-		
5	2	Salmon	Rugosa	-		
6	2	Blanco centro oscuro	Lisa	-		

7	2	SNP	Lisa	-	
8	3	Centro oscuro	Lisa	-	
9	4	SNP	Rugosa	-	
10	10	Diferentes	Diferentes	-	
11	10	SNP	Secas	+	
12	7	Amarillo y SNP	Rugosa	+	
13	13	SNP	Rugosa	-	
Total	108				

- BAAR negativos, + BAAR positivos, SNP sin pigmentación.

7.3.4.2.3. Identificación genética de cepas de *Mycobacterium* sp.

Se seleccionaron las 17 cepas pertenecientes a los grupos 10 y 11, así como dos cepas representativas de los grupos restantes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 13) para la identificación de la especie.

Se les amplificó el marcador filogenético de 100 pb presente en el gen rRNA 23S a las 39 cepas seleccionadas, 13 cepas amplificaron 350 pares de bases y el resto amplificó 250 pares de bases por lo que fueron eliminadas del proceso de identificación de especie, se muestra un ejemplo de las cepas que amplificaron el inserto de 100 pb en la Figura 12.

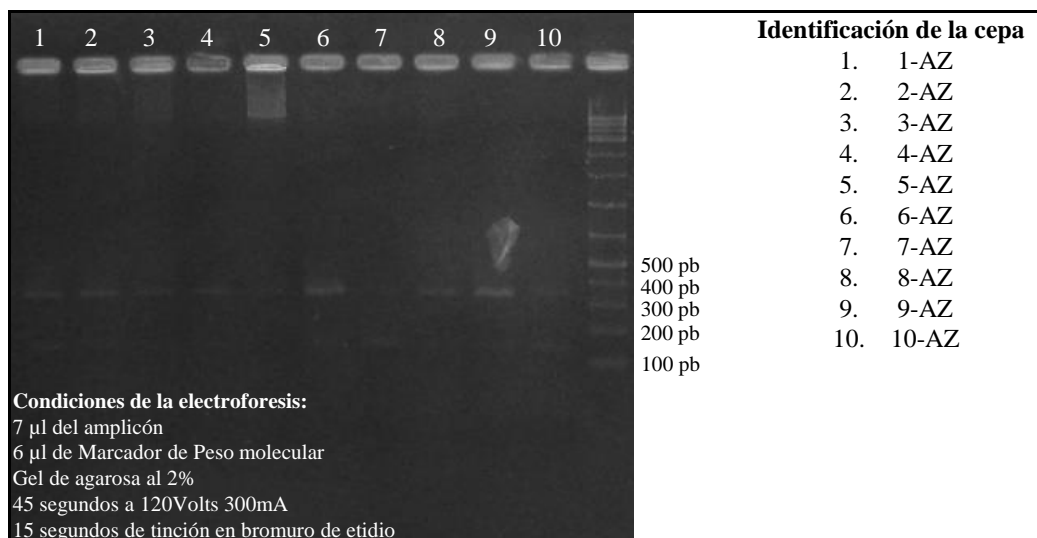


Figura 12. Amplificación del marcador filogenético en las cepas aisladas de bovinos.

A las 13 cepas que amplificaron el inserto específico en el gen rRNA 23S, se les amplificó el gen rRNA 16S (Figura 13).

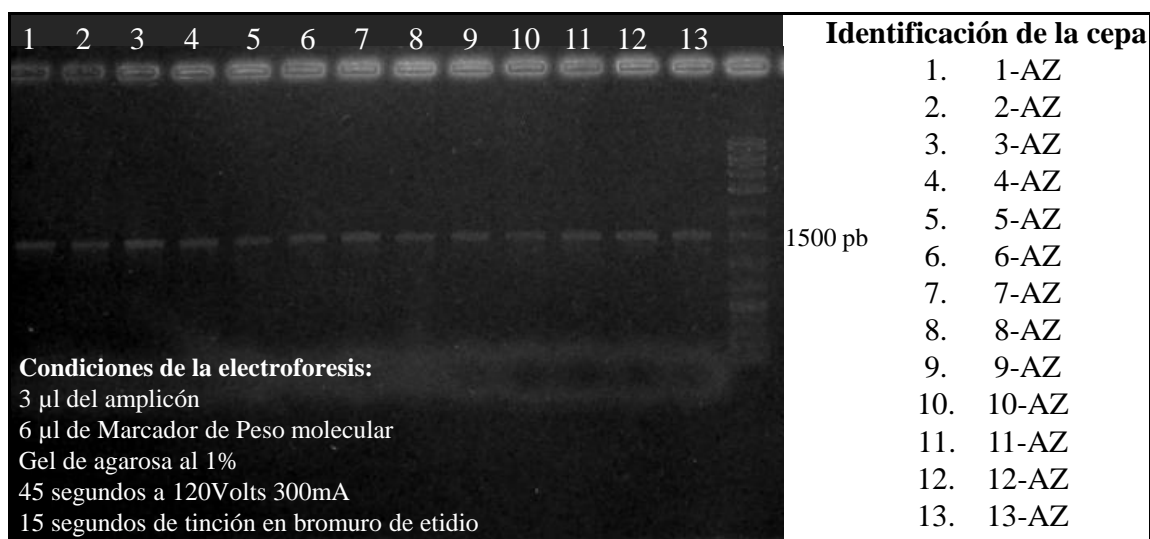


Figura 13. Amplificación del gen rRNA 16S de las cepas aisladas de bovinos.

Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del Gen Bank utilizando el programa Blast y Eztaxon. Se identificaron cuatro especies del género *Mycobacterium*, seis cepas tienen una semejanza del 98 y 99% con *M. neoaurum*, cuatro tienen una semejanza del 99% con *M. parafortuitum*, dos tienen una semejanza del 98% con *M. moriokaense* y la restante un 99% de semejanza con *M. confluentis* (Tabla 15).

Tabla 15. Comparación de secuencias de las cepas aisladas de bovinos con las cepas depositadas en Gen Bank, utilizando BLAST y Eztaxon.

ID Cepa	Hato origen	Medio de aislamiento	Semejanza Blast	%	Semejanza Eztaxon	%
1-AZ	2	Middlebrook	<i>M. neoaurum</i>	98	<i>M. neoaurum</i>	98.31
2-AZ	2	Stonebrink	<i>M. neoaurum</i>	99	<i>M. neoaurum</i>	99.14
3-AZ	2	Stonebrink	<i>M. neoaurum</i>	98	<i>M. neoaurum</i>	98.24
5-AZ	3	Stonebrink	<i>M. neoaurum</i>	99	<i>M. neoaurum</i>	99.15
8-AZ	4	Middlebrook	<i>M. neoaurum</i>	99	<i>M. neoaurum</i>	99.01
12-AZ	2	Middlebrook	<i>M. neoaurum</i>	99	<i>M. neoaurum</i>	99.43
4-AZ	4	Middlebrook-P	<i>M. parafortuitum</i>	99	<i>M. parafortuitum</i>	98.24
9-AZ	3	Middlebrook	<i>M. parafortuitum</i>	99	<i>M. parafortuitum</i>	98.94
10-AZ	4	Stonebrink	<i>M. parafortuitum</i>	99	<i>M. parafortuitum</i>	98.36
11-AZ	3	Stonebrink	<i>M. parafortuitum</i>	99	<i>M. parafortuitum</i>	98.23
6-AZ	2	Stonebrink	<i>M. moriokaense</i>	99	<i>M. moriokaense</i>	98.23
13-AZ	4	Stonebrink	<i>M. moriokaense</i>	98	<i>M. moriokaense</i>	98.16
7-AZ	2	Middlebrook-P	<i>M. confluentis</i>	99	<i>M. confluentis</i>	99.08

7.3.4.2.4. Análisis filogenético.

El árbol filogenético se formó con un género *Mycobacterium* y cuatro especies, el árbol permitió observar las relaciones filogenéticas entre las cepas de colección del género y especies con las cepas aisladas en el presente trabajo. Los valores de bootstrap se obtuvieron de 1000 repeticiones, para formar la raíz del árbol se utilizó una secuencia de *Pantoea agglomerans* (Figura 14).

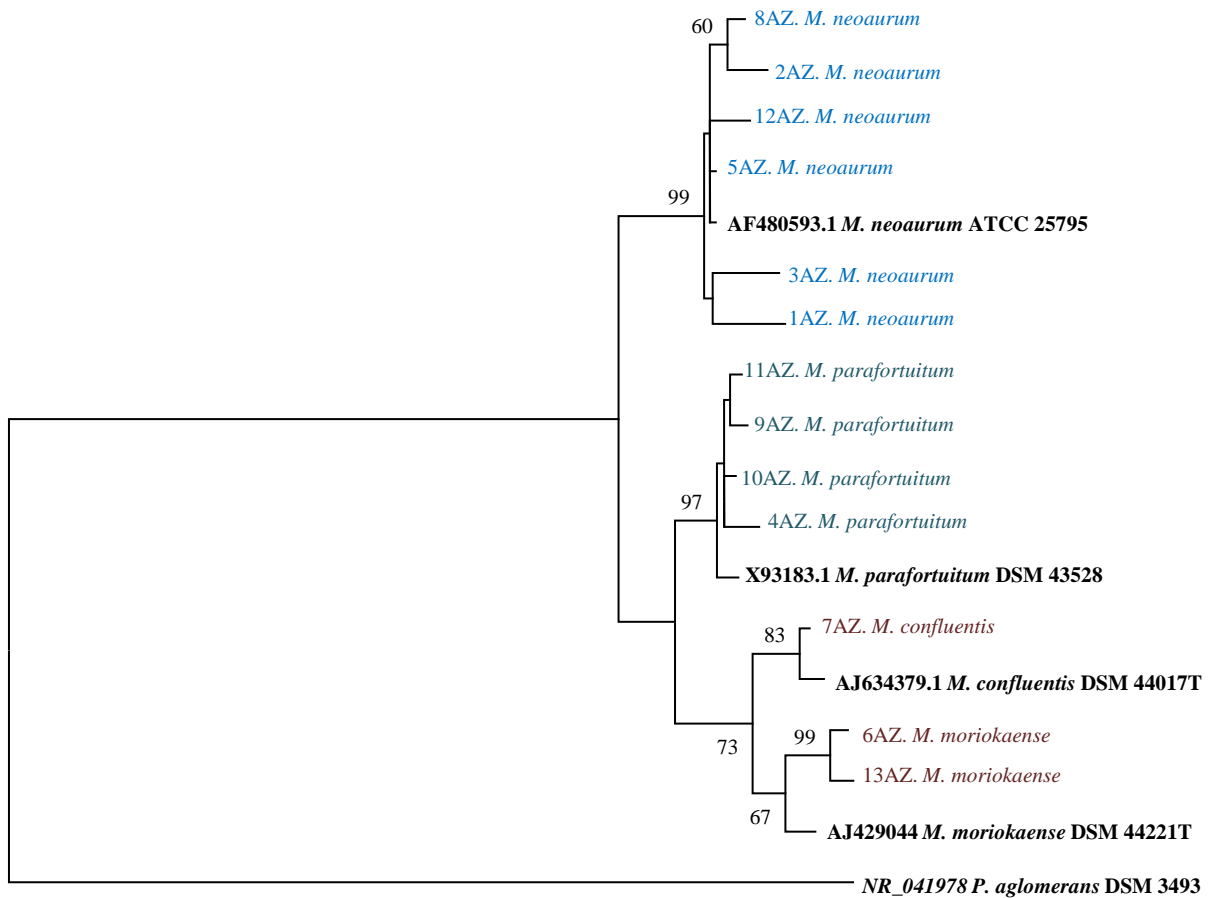


Figura 14. Árbol filogenético construido con secuencias del gen rRNA 16S de las cepas aisladas y cepas de colección.

8. DISCUSIÓN.

Tuberculosis humana (TB).

La tuberculosis es una enfermedad que ha afectado a la población humana por muchos años, en la actualidad el número de casos de tuberculosis es alto en: pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (81), pacientes que reciben terapias de inmunosupresión o inmunodepresión (82, 83), pacientes diabéticos (84) y pacientes con desnutrición (85). Estos factores han favorecido la aparición de infecciones por micobacterias atípicas, entre las que destacan *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* y *M. chelonae* (86).

Los resultados obtenidos en este estudio utilizando los SIG y el estadístico SCAN, nos indican que la tuberculosis en el Estado de México no se encuentra distribuida de forma aleatoria ya que se identificaron seis clústers de TB ($P \leq 0.05$). Al respecto estudios realizados por Nava y col. 2006 (87) para identificar la distribución espacial de la tuberculosis humana en Acapulco, México, utilizando un análisis de cuadrantes con el módulo QUADRAT del software Idrisi Taiga, no lograron la identificación de clústeres TB, a diferencia de los resultado que se obtuvieron en esta investigación en la que se utilizó el estadístico SCAN.

La aplicación de la ventana de búsqueda del 25% para detectar la presencia de pequeños clústers, no mostro diferencias en la identificación de estos al ser detectados con la ventana del 50%, resultados que coinciden con Tiwari y col. 2006 (63) en su análisis para identificar la distribución espacial de la TB en el Distrito de Almora en la India utilizando las dos ventanas de búsqueda (50% y 25%) con el estadístico SCAN.

Los seis clústers de TB se ubicaron en zonas aledañas al Distrito Federal, ciudad más grande de la República Mexicana, al respecto Barr y col. 2001 (88) en su estudio observaron que la mayor tasa de incidencia de TB se encontraba en las cercanía a las áreas urbanas de la ciudades de Nueva York, Estados Unidos, otros autores como Moonan y col. 2004 (62) han

reportado la asociación en la transmisión e incidencia de la TB con la distancia al centro de las áreas urbanas en el condado de Tarrant en Estados Unidos.

En la presente investigación se tomaron como referencia los resultados obtenidos con los SIG para seleccionar las zonas de captación de muestras de pacientes con baciloscopía positiva, se solicitaron muestras de esputo de pacientes que habitan en las zonas geográficas donde se ubicaron los clústers de tuberculosis.

Se colectaron 31 muestras de esputo de las cuales se aislaron 10 cepas de bacilos ácido alcohol resistentes, 5 de las cuales fueron recuperadas únicamente en el medio Lowenstein-Jensen, 4 en Stonebrink y una cepa en ambos medios, por lo que la utilización de diferentes medios para la recuperación de micobacterias resulto ser adecuada, ya que los requerimientos nutricionales son diferentes entre especies de acuerdo a lo publicado por Sepúlveda y col. 2001 (25), en su evaluación del medio Stonebrink para la recuperación de micobacterias.

Con la amplificación del marcador filogenético, se confirmó que las cepas pertenecen al grupo de las bacterias Gram positivas con HGC como las micobacterias. El marcador filogenético se utilizó también como un criterio para observar si el ADN de las cepas aisladas correspondía al de una bacteria Gram-positivas con HGC o estaba contaminado con una eubacteria siguiendo la metodología descrita por Ramírez y col. 2006 (31).

Los resultados de la identificación de las cepas aisladas muestran que 9 de las 10 cepas pertenecen al complejo tuberculosis con una semejanza del 100%, una desventaja del análisis y comparación de secuencias del gen rRNA 16S es que no permite discriminar entre las especies que conforman el complejo tuberculosis, al respecto Böddinghaus y col. 1990 (89) realizaron una comparación de las secuencias del gene rRNA 16S de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. africanum* en la que describen que no hay diferencias entre las secuencias de estas especies, por lo que es necesario aplicar otras metodologías en estas 9 cepas, como RFLP-IS61 (90) o Spotigotyping (3) para identificar a que especie de los integrantes del complejo tuberculosis pertenecen.

El análisis y comparación de las secuencias del gen rRNA 16S para identificar micobacterias atípicas ha tenido buenos resultados, Rogall y col. 1990 (91) identificaron especies atípicas como *Mycobacterium malmoense*, *M. szulgai* y *M. flavescens*, analizando el gen rRNA 16S, situación que observamos en nuestro estudio ya que por medio de la secuencia de este gen identificamos una cepa que tuvo una semejanza del 99.982% con *Mycobacterium conceptionense*.

La especie *M. conceptionense* fue aislada por primera vez en Francia en el año 2006 por Adékambi y col., se aislaron tres cepas a partir de tres muestras distintas (líquido, piel y biopsia de hueso) a partir de una lesión postraumática en la tibia de una mujer de 31 años de edad, quien había sufrido una fractura expuesta en la tibia durante un su estadía en la isla de Reunion ubicada en el Océano Índico. Las tres cepas fueron identificadas por el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S (92).

En el año 2011 se reportó el primer caso de infección pulmonar y extrapulmonar por *M. conceptionense* en Irán. *M. conceptionense* fue aislado de tres pacientes, en el primero de ellos se aisló de sangre periférica, el paciente tenía 38 años de edad y era VIH positivo; en el segundo paciente se aisló de tres muestras de esputo, el paciente tenía 58 años de edad, cursaba por enfisema pulmonar y enfermedad obstructiva crónica; en el tercer paciente se aisló de una muestra de orina, la paciente tenía 70 años de edad e ingreso al hospital por una infección urinaria. Las cepas aisladas en este reporte fueron identificadas como *M. conceptionense* por el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S (93).

En el año 2012 se publicó el aislamiento de *Mycobacterium conceptionense* en muestras de esputo de cuatro pacientes con lesiones nodulares en pulmón en Corea del sur; la primer paciente tenía 69 años de edad e ingresó al hospital por dolor en el pecho, tos y fiebre recurrente; el segundo paciente tenía 70 años de edad y la enfermedad de Parkinson; el tercer paciente tenía 70 años de edad y cáncer de lengua; el cuarto paciente tenía 53 años de edad con diabetes mellitus, el paciente recibió tratamiento con isoniazida, rifampicina, y etambutol por seis meses tiempo en el cual resultó negativo a las baciloscopias, sin embargo después de

año y medio en una revisión de rutina se le aisló nuevamente *Mycobacterium conceptionense* (94).

La cepa identificada como *Mycobacterium conceptionense* con el 99.982% en nuestra investigación se recuperó de una paciente de 42 años de edad, con un Índice de Masa Corporal (IMC) de 34.17, con fibrosis pulmonar, diabetes, con diagnóstico positivo a tuberculosis pulmonar por baciloscopía y sin antecedentes de aislamiento por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Tuberculosis bovina TBb.

La tuberculosis bovina es una enfermedad de distribución mundial y México no es la excepción. En el Estado de México los hatos positivos a TBb reportados por el CFPPEM se ubicaron en la zona sur del Estado, es importante mencionar que el Gobierno Federal a través de la SAGARPA y el Gobierno del Estado de México a través del CFPPEM, trabajan de forma activa para erradicar la TBb en la zona sur del Estado, actualmente declarada como zona de baja prevalencia de tuberculosis bovina.

Los resultados del estadístico SCAN, nos indican que la tuberculosis bovina en el sur del Estado de México no se encuentra distribuida aleatoriamente, ya que se logró la identificación de 3 clústers de TBb utilizando dos ventanas de búsqueda 25% y 50%.

El clúster 1 de TBb identificado con la ventana de búsqueda del 50%, engloba a los municipios de Amatepec, Luvianos, Sultepec, Tlatlaya y Tejupilco, en los cuales se concentra el mayor número de bovinos en el sur del Estado de México de acuerdo con el censo agropecuario del año 2007 (95), resultados que coinciden con las características del clúster de tuberculosis bovina identificado en Argentina por Pérez y col. 2002, ya que ellos observaron que su clúster abarcó los municipios con el mayor número de bovinos (67).

Los clústers 2 y 3 identificados con una ventana del 25% abarcan a los municipios (Tlatlaya y Zacazonapan) con el mayor número de hatos positivos a TBb, la función zootécnica que

predominó en estos clústers fue la producción mixta (carne y leche), en la cual los animales son sometidos a factores de riesgo para que se desarrolle la TBb, como el hacinamiento y estrés, como lo describe Zendejas y col. 2007 (51).

Los clústers identificados con una ventana del 25% permitieron observar con mayor claridad a los hatos que se aglomeran, a diferencia del clúster identificado con la ventana de búsqueda de 50%, que abarcó la mayoría de los municipios donde se lleva a cabo la campaña de erradicación de la TBb.

El modelo de predicción utilizando la distancia de Mahalanobis, permitió ubicar geográficamente otras zonas del sur del Estado de México con condiciones similares, en donde se están presentando casos de TBb y se está aislando el agente causal, sin embargo el modelo no fue capaz de identificar zonas geográficas con alta probabilidad en el resto del Estado, ya que existe una importante variación climatológica y demográfica en el Estado de México (Figura 10).

El modelo de predicción identificó zonas con alta probabilidad de que existan casos de TBb, en los Municipio de Ixtapan del Oro y Valle Bravo de los cuales no se recibió información de hatos positivos a TBb, debido a que estos municipios no están contemplados por la campaña de erradicación de la TBb en el Estado de México.

Un hallazgo importante fue que los resultados del modelo de predicción y del estadístico SCAN coinciden, los tres clústers identificados abarcan las zonas con mayor probabilidad de que existan casos de TBb, el cual podría tomarse como comparación en el estudio de distribución espacial ya que autores como Ward y col. 2000 recomiendan la utilización de más de un método para estudios de distribución espacial en epidemiología veterinaria (96, 97).

Uno de los principales problemas con los que se enfrentan los programas de erradicación es el diagnóstico, la prueba oficial para diagnosticar la tuberculosis bovina a nivel de campo es la tuberculina, la cual no cuenta con una buena sensibilidad y especificidad, sus resultados se ven afectados por diversos factores, como repetidas aplicaciones de la tuberculina, tiempo de

infección, aplicación de fármacos y principalmente por la exposición a micobacterias atípicas (98-100).

Los resultados de la identificación de especies del genero *Mycobacterium* indican que están presentes 4 especies, *M. neoaurum*, *M. parafortuitum*, *M. moriokaense* y *M. confluens*, en los hatos muestreados en el sur del Estado de México, especies que pueden interferir en el diagnóstico de la tuberculosis bovina de acuerdo a lo mencionado anteriormente.

Por otra parte las especies *M. neoaurum*, *M. moriokaense* y *M. confluens* han sido reportadas en casos de infecciones en humanos.

En 1988 Davison y col. 1988 (101) reportaron un caso de una paciente con cáncer ovárico y catéter Hickman, a la cual se le aisló *Mycobacterium neoaurum* de muestras de sangre y del catéter Hickman.

Morimoto y col. 2007 (83) reportaron un caso de infección pulmonar por *M. neoaurum* en una paciente de 67 años de edad, con asma y tratamiento a base de corticoesteroides.

Lai y col. 2001, reportaron el aislamiento de *M. neoaurum* en un paciente con falla renal el cual fue sometido a hemodiálisis, por su parte Zanetto y col. 2001 reportaron el caso de un paciente el cual ingreso a hospitalización por una infección urinaria y a partir de una muestra de orina se le aisló *M. neoaurum* (102, 103).

Por su parte *M. moriokaense* fue aislada en 1986 por Tsukamura y col., esta especie fue aislada de una muestra de esputo de un paciente con tuberculosis pulmonar (104).

M. confluens fue aislada por primera vez en 1992 por Kirschner y col., esta especie fue aislada de una muestra de esputo (105).

Debido a lo anteriormente mencionado las personas que están al cuidado de los bovinos en donde se aislaron estas cepas pueden contraer una infección con estas micobacterias, ya que

estas han sido encontradas en humanos, principalmente *M. neoaurum* quien ha sido reportada en un número mayor de casos. En la presente investigación seis cepas fueron identificadas como *M. neoaurum* con un 99% de semejanza.

La amplificación del gen rRNA 16S nos permitió identificar 13 cepas a nivel de especie, las cuales habían amplificado el marcador filogenético presente en el gen rRNA 23S, por lo que la combinación de estas dos metodologías permitió obtener excelentes resultados en la identificación de especies de *Mycobacterium* sp.

9. CONCLUSIONES GENERALES.

9.1. Conclusiones.

Tuberculosis humana.

La tuberculosis humana en el Estado de México no se encuentra distribuida aleatoriamente.

Los clústers de TB se ubicaron en municipios aledaños al Distrito Federal.

Las cepas aisladas en esta tesis tuvieron semejanza del 100% con los integrantes del complejo tuberculosis (9 de 10), solo una cepa tuvo una semejanza del 99.982% con *Mycobacterium conceptionense*.

La cepa identificada como *Mycobacterium conceptionense* en esta investigación, fue aislada de una paciente de 42 años de edad, con un Índice de Masa Corporal de 34.17, con fibrosis pulmonar y diabetes.

Tuberculosis bovina.

La tuberculosis bovina en el Estado de México no se encuentra distribuida aleatoriamente

Los clústers de TBb se ubicaron en los municipios de Zacazonapan, Otzoloapan, Santo Tomas de los Plátanos, Temascaltepec, Luvianos, Tlatlaya y Amatepec del Estado de México.

Las cepas aisladas en esta tesis tuvieron semejanza con *Mycobacterium neoaurum* (6 de 10 cepas), con *Mycobacterium parafortuitum* (4 de 10), con *Mycobacterium morikaense* (2 de 10) y con *Mycobacterium confluentis* (1 de 10)

Conclusión general.

La metodología utilizada en esta tesis en cuanto a la distribución espacial y temporal de la tuberculosis humana y bovina en el Estado de México, así como la identificación de especies de *Mycobacterium*, resultó ser de gran utilidad. Esta metodología incluye: la aplicación de los Sistemas de Información Geográfica, amplificación del marcador filogenético para bacterias Gram positivas con alto contenido de guanina-citosina y el análisis comparativo de la secuencia del gen rRNA 16S para la identificación de especies del género *Mycobacterium*.

9.2. Limitaciones.

Tuberculosis humana.

La mayor limitación fue la obtención de las muestras de esputo, ya que se requiere un proceso para su autorización por parte de las instituciones de salud y pacientes, situación que nos tomó demasiado tiempo y se vio reflejado en el número de muestras colectadas.

Tuberculosis bovina.

Los propietarios de los hatos de bovinos no siempre están de acuerdo en participar en este tipo de estudios ya que han estado participando en la campaña de erradicación de la tuberculosis bovina y por motivos de la campaña se han sacrificado a los animales que resultan positivos a tuberculosis bovina.

9.3. Recomendaciones.

Tuberculosis humana.

Realizar un muestreo dirigido a los municipios que están aglomerando la tuberculosis y que en esta investigación no se tuvo la oportunidad de captar muestras de esputo.

Tuberculosis bovina.

Realizar un muestro en el clúster 3 identificado con la ventana de búsqueda del 25% para identificar las especies del genero *Mycobacterium* de esa zona geográfica y compararlas con las identificadas en esta investigación.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Lawn SD, Zumia AI. Tuberculosis. Lancet. 2011; 378(9785):57-72.
2. Kaneene BJ, Thoen OC. Tuberculosis. Vet Med Today. 2004; 224(5):685-91.
3. Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: A taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Evol Microbiol. 1999; 49(3):1263-73.
4. Karlson AG, Lessel EF. *Mycobacterium bovis* nom. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 1970; 20(3):273-82.
5. Abalos P, Retamal P. Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente? Rev Sci Tech Off Int Epiz. 2004; 23(2):583-94.
6. Rehren G, Walters S, Fontan P, Smith I, Zárraga AM. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis. 2007; 87(4):347-59.
7. Rojas EO, Lovik M. *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* infection in domestic and wild animals. Rev Scie Tech. 2001; 20(1):219-51.
8. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the Origin of Leprosy. Science. 2005; 308(5724):1040-2.
9. Chris AG, Pharm D. Atypical micobacteria. Pharmacy. 2005, College of Clinical Pharmacy.
10. Camarena JJ, González PR. Micobacterias atípicas y su implicación en patología infecciosa pulmonar. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011; 29, Supplement 5(0):66-75.
11. Sandoval T, Serrano JA. Identificación y diagnóstico de Actinimicetales patógenos. Merida, Venezuela: Universidad de Los Andes; 2005.
12. Organización Panamericana de la Salud. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte II Cultivo; 2008.
13. Organización Panamericana de la Salud para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte I Basiloscoopia; 2008.

14. Gorocica P, Jiménez MMdC, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. 2005; 18(2):142-53.
15. Acosta SR, Estrada CC, Milián SF. Tipificación de cepas de *Mycobacterium bovis*. Téc Pecu Méx. 2009; 47(4):389-412.
16. Holt J, Krieg N, Sneath P, Stale J, Williams S. The mycobacteria, Bergey's Manual of Determinative bacteriology.1994; p. 597-603.
17. Valerga M, Viola C, Thwaites A, Bases O, Ambroggi M, Poggi S, et al. Tuberculosis por *Mycobacterium bovis* en una mujer con SIDA. Revi Argen Microbiol. 2005; 37(1):96-8.
18. Barron H; M Monteghirfo NR. Diagnóstico molecular de *Myobaterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. An Fac Med Lima. 2006; 67(1):11-8.
19. Russell D. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. Mol Cell Biol. 2001; 2:1-9.
20. Phillips CJC, Foster CRW, Morris PA, Teverson R. The transmission of *Mycobacterium bovis* infection to cattle. Res Vet Sc. 2003; 74(1):1-15.
21. Farreras P, Foz A, Suro J, Suryniach R, Froutehman F. Enfermedades Infecciosas, intoxicaciones enfermedades profesionales y por agentes físicos, enfermedades alergenicass. Tratado de Patología y clínica Medica. Barcelona: Salvat Editores; 1975. p. 451-61.
22. Morris RS, Pfeiffer DU, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet Microbiol. 1994; 40(1-2):153-77.
23. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Código Sanitario para los Animales Terrestres. 2005.
24. Ponce de León A. Revolución en el control de la tuberculosis. Salud Pública Méx. 2007; 49:208-10.
25. Sepúlveda A, García-Martos P, Rodríguez MJ, Márquez A, Puerto JL, A. S. Evaluación del medio de Stonebrink para la recuperación de micobacterias. Rev Diag Biol. 2001; 0(4).

26. Naveen G, Basavaraj VP. Comparison of the Lowenstein-Jensen Medium, the Middlebrook 7H10 Medium and MB/BacT for the Isolation of *Mycobacterium Tuberculosis* (MTB) from Clinical Specimens. *J Clin Diag Res.* 2012; 6(10):1704-9.
27. Rastogi N, Goh KS, David HL. Drug susceptibility testing in tuberculosis: A comparison of the proportion methods using Lowenstein-Jensen, middlebrook 7H10 and 7H11 agar media and a radiometric method. *Res Microbio.* 1989;140(5):405-17.
28. Burgos M, Mendez JC, Ribón W. Molecular epidemiology of tuberculosis: Methodology and applications. *Biomedica.* 2004; 24(1):188-201.
29. Manterola MJM. Nuevas aportaciones al diagnóstico de las enfermedades causadas por las micobacterias. Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona; Tesis de doctorado, 2004.
30. Roller C, Ludwig W, Schleifer K. Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes. *J Gen Microbiol.* 1992; 138:1167-75.
31. Ramírez-Durán N, Ramírez-Saad H, Melgoza-Contreras LM, Sandoval H. Amplification of the specific insertion in the rRNA 23S gene, as a criterion of purity in preparation of actinomycetes DNA. *J Med Mycol.* 2006; 16(1):26-9.
32. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Revs.* 2004; 17(4):840-62.
33. Holt J, Krieg N, Sneath P, Stale J, Williams S. *Bergey's Manual of Determinative bacteriology.* Wilkins; Michigan United State of Bacteriology. 1994.
34. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173: 697-703.
35. Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol.* 2004; 186:2629- 35.
36. Altschul SF; TL Madden AS, J Zhang, Z Zhang, W Miller, DJ Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 1997; 25:3389-402.

37. Opperdoes FR. Phylogenetic analysis using protein sequences. Vandamme AM, editor. The Phylogenetic Handbook: Cambridge University; 2009. p. 313–41.
38. World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Control, Geneva Switzerland. 2010.
39. Rodríguez J, Avelar F, Márquez F, Barrera A. Panorama epidemiológico de la tuberculosis en Aguascaliente. Investigación y Ciencia. 2008; 16(040):38-41.
40. Dirección General Adjunta del Programas Preventivos del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades (CENAVECE). <http://www.cenave.gov.mx/tuberculosis/PRESENTACION/cifras%20oficiales>. 2010.
41. Secretaría de Salud. Programa de acción específico 2007-2012. Tuberculosis. 2008.
42. Instituto de Salud del Estado de México. Tuberculosis en el Estado de México. Geografía y tendencias; 2005.
43. Boletín epidemiológico. <http://salud.edomexico.gob.mx/html/>. 2010.
44. Organización Mundial de Salud Animal (OIE). Medidas comerciales, procedimientos de importación, exportación y certificación veterinaria. Terrestrial Animal Health Code. 22 ed, 2012.
45. Thoen C, LoBue P, de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. Vet Microbiol. 2006; 112(2–4):339-45.
46. Amanfu W. The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. Tuberculosis. 2006; 86(3–4):330-5.
47. Toledo P, Milán F, Santillan M, Ramírez I. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. Vet Méx. 1999; 30:227-9.
48. Pérez GL, Milian F, Arriaga C, Romero C, Escarín C. Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México Salud Pública Méx. 2008; 50:286-91.
49. Srivastava KD, Guapta H, Singh V, Sharma V, Yandav S, Thakral J, et al. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north Indian- Possible relevance in human health. Indian J Med Res. 2008; 128:26-31.

50. González SD, Díaz OF, Jaramillo ML, Pérez GR, Padilla UJ, Santillán FMA, et al. Evaluación de diferentes inmunogenos contra la tuberculosis bovina mediante la presencia de lesiones a la necropsia. *Vet Méx.* 2007; 38:271-84.
51. Zendejas HM, Milián SF, García LC, Cruz GB, Escaleraa AMA, Márquez GH. La utilidad de los sistemas de información geográfica en la predicción de la distribución regional de la tuberculosis bovina. *Téc Pec Méx.* 2007; 45(3):279-87.
52. Milian-Suazo F, Harris B, Díaz CA, Romero Torres C, Stuber T, Ojeda GA. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*: Usefulness in international trade. *Prev Vet Med.* 2008; 87(3-4):261-71.
53. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentacion (SAGARPA). Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-045-1995 Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina (*M. bovis*). *Diario Oficial de la Federación.* 1996:12-32.
54. Situación Actual de la tuberculosis bovina. <http://www.senasica.gob.mx/?id=1396>. 2012.
55. Avilés W, Ortega O, Guillermina K, Coloma J, Harris E. Integration of Information Technologies in Clinical Studies in Nicaragua. *PlosMedicine.* 2007; 4(10):1-6.
56. Martínez R, Vidaurre M, Nájera P, Loyola E, Castillo SC. SIGEpi: Sistema de Información Geográfica en Epidemiología y Salud Pública. *Boletín Epidemiológico.* 2001; 22(3):1-8.
57. Elliot P, Wakefield J, Best N, Briggs D. *Spatial epidemiology methods and applications.* Oxford. New York, USA 2000.
58. Berke O. Exploratory disease mapping: kriging the spatial risk function from regional count data. *Int J Health Geogr.* 2004; 3(1):18.
59. Kulldorff M, Mostashari F, Duczmal L, Yih K, Kleinman K, Platt R. Multivariate Scan Statistics for Disease Surveillance. *Stat Med.* 2007; 26:1824-33.
60. Kulldorff M, Nagarwalla, N. Spatial disease clusters detection and inference. *Stat Med.* 1995; 14:799-810.
61. Kulldorff M, Heffernan R, Hartman J, Assuncao R, Mostashari F. A Space-Time Permutation Scan Statistic for Disease Outbreak Detection. *PLOS Med.* 2005; 2(3):216-24.

62. Moonan P, Bayona M, Quitugua T, Oppong J, Dunbar D, Jost K, et al. Using GIS technology to identify areas of tuberculosis transmission and incidence. *Int J Health Geogr.* 2004; 3(1):23.
63. Tiwari N, Adhikari C, Tewari A, Kandpal V. Investigation of geo-spatial hotspots for the occurrence of tuberculosis in Almora district, India, using GIS and spatial scan statistic. *Int J Health Geogr.* 2006; 5(1):33.
64. Nunes C. Tuberculosis incidence in Portugal: spatiotemporal clustering. *Int J Health Geogr.* 2007; 6(1):30.
65. Sabel C, Wilson J, Kingham S, Tisch C, Epton M. Spatial implications of covariate adjustment on patterns of risk: Respiratory hospital admissions in Christchurch, New Zealand. *Social Sci Med.* 2007; 65:43-59.
66. Miller R, Kaneene JB, Schmitt SM, Lusch DP, Fitzgerald SD. Spatial analysis of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Michigan, USA. *Prev Vet Med.* 2007; 82(1-2):111-22.
67. Perez AM, Ward MP, Torres P, Ritacco V. Use of spatial statistics and monitoring data to identify clustering of bovine tuberculosis in Argentina. *Prev Vet Med.* 2002; 56(1):63-74.
68. Roco M. Uso de sistemas de información geográfica y estadística espacial para identificar patrones de distribución de Tuberculosis bovina detectada en un frigorífico de exportación de la Región de Los Lagos, Chile. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile; Tesis de Magister, 2009.
69. Zaragoza BA. Identificación de patrones espaciales de la tuberculosis bovina en el sur del Estado de México, México y su asociación con factores medio ambientales y demográficos del predio. Valdivia Chile: Universidad Austral de Chile; Tesis de Magister, 2009.
70. Ozdenerol E, Bialkowska-Jelinska E, Taff G. Locating suitable habitats for West Nile Virus-infected mosquitoes through association of environmental characteristics with infected mosquito locations: a case study in Shelby County, Tennessee. *Int J Health Geogr.* 2008; 7(1):12.
71. Índice de marginación a nivel localidad 2005 (base de datos). Comisión Nacional de Poblacion (CONAPO) <http://www.conapo.gob.mx/index.php?option=com>. 2005.

72. Censo de Población y Vivienda 2005. http://www.inegi.org.mx/sistemas/consulta_resultados.
73. Nomenclátor de localidades del Estado de México. <http://igecem.edomex.gob.mx/descargasgeograficas.htm>. 2009.
74. Instituto de Información e investigación Geográfica, Estadística y Catastral del Estado de México. <http://igecem.edomex.gob.mx/descargasgeograficasDIVIPOLITICA.zip>. 2011.
75. Science for a Changing World. <http://earthexplorer.usgs.gov/>. 2012.
76. Hall TA. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999; 41(41):95-8.
77. Chun J, Lee J-H, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2007; 57: 2259-61.
78. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molr Biol Evol.* 2007; 24(8):1596-9.
79. INEGI. Archivos vectoriales para la cartografía topográfica digital escala 1: 20 000.: Instituto Nacional de Estadística y Geografía; 2012 [<http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/topografia/default.aspx>].
80. Servicio Meteorológico Nacional. <http://smn.cna.gob.mx>. 2012.
81. Lawn S, Dheda K, Kerkhoff A, Peter J, Dorman S, Boehme C, et al. Determine TB-LAM lateral flow urine antigen assay for HIV-associated tuberculosis: recommendations on the design and reporting of clinical studies. *BMC Infec Dis.* 2013; 13(1):407.
82. Hickey MD, Quan DJ, Chin-Hong PV, Roberts JP. Use of rifabutin for the treatment of a latent tuberculosis infection in a patient after solid organ transplantation. *J Liver Transplant.* 2013; 19(4):457-61.
83. Morimoto Y, Chan ED, Heifets L, Routes JM. Pulmonary infection with *Mycobacterium neoaurum* identified by 16S ribosomal DNA sequence. *J Infec.* 2007; 54(4):e227-e31.
84. Koo BK. Diabetes Mellitus and Tuberculosis. *Diabetes Metab J.* 2013; 37(4):249-51.

85. Miyata S, Tanaka M, Ihaku D. The prognostic significance of nutritional status using malnutrition universal screening tool in patients with pulmonary tuberculosis. *J Nutr.* 2013; 12(1):42.
86. Weiss CH, Glassroth J. Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Exp Rev Resp Med.* 2012; 6(6):597-613.
87. Nava E A, López YV, Harris E, Morales AP, Mitchell S, Flores MM, Villegas AA, Legorreta JS, Ledogar R, Andersson N. Clustering of *Mycobacterium tuberculosis* Cases in Acapulco: Spoligotyping and Risk Factors. *Clin Dev Immunol.* 2011; 1-12.
88. Barr RG, Diez AVR, Knirsch CA, Pablos AM. Neighborhood Poverty and the Resurgence of Tuberculosis in New York City, 1984-1992. *Am J Public Health.* 2001; 91(9):1487-93.
89. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(8):1751-9.
90. Cave MD, Eisenach KD, McDermott PF, Bates JH, Crawford JT. IS6110: Conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting. *Mol Cel Probes.* 1991; 5(1):73-80.
91. Rogall T, Flohr T, Böttger EC. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol.* 1990; 136(9):1915-20.
92. Adékambi T, Stein A, Carvajal J, Raoult D, Drancourt M. Description of *Mycobacterium conceptionense* sp. nov., a *Mycobacterium fortuitum* Group Organism Isolated from a Posttraumatic Osteitis Inflammation. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4):1268-73.
93. Shojaei H, Hashemi A, Heidarieh P, Ataei B, Naser AD. Pulmonary and extrapulmonary infection caused by *Mycobacterium conceptionense*: the first report from Iran. *JRSM Short Reports.* 2011; 2(4).
94. Kim SY, Kim MS, E CH, J-J Y, Lee J-H, H SS. Pulmonary infection caused by *Mycobacterium conceptionense*. *Emerg Infect Dis.* 2012; 8(1):174-6.
95. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2007 <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/Agro/ca2007>.

96. Ward MP, Carpenter TE. Analysis of time–space clustering in veterinary epidemiology. *Prev Vet Med.* 2000; 43(4):225-37.
97. Ward MP, Carpenter TE. Techniques for analysis of disease clustering in space and in time in veterinary epidemiology. *Prev Vet Med.* 2000; 45(3–4):257-84.
98. Corner LA, Pearson CW. Response of cattle of inoculation with atypical mycobacteria of bovine origin. *Aust Vet J.* 1978; 54(8):379-82.
99. Corner LA, Pearson CW. Response of cattle to inoculation with atypical mycobacterium isolated from soil. *Aust Vet J.* 1979; 55(1):6-9.
100. Llamazares ORG, Martín CBG, Nistal DA, Redondo VAdIP, Rodríguez LDn, Ferri EFRg. Field evaluation of the single intradermal cervical tuberculin test and the interferon- γ assay for detection and eradication of bovine tuberculosis in Spain. *Vet Microbiol.* 1999; 70(1–2):55-66.
101. Davison MB, McCormack JG, Blacklock ZM, Dawson DJ, Tilse MH, Crimmins FB. Bacteremia caused by *Mycobacterium neoaurum*. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(4):762-4.
102. Lai CC, Tan CK, Chen CC, Hsueh PR. *Mycobacterium neoaurum* infection in a patient with renal failure. *Int J Infect Dis.* 2009; 13(5).
103. Zanetti S, Faedda R, Fadda G, Dupre I, Molicotti P, Ortus S. Isolation and identification of *Mycobacterium neoaurum* from a patient with urinary infection. *New Microbiol.* 2001; 24:189-92.
104. Tsukamura. *Mycobacterium moriokaense* sp. nov., a rapidly growing, nonphotochromogenic *Mycobacterium*. *Int J Syst Bacteriol.* 1986; 36:333-8.
105. Kirschner P, Teske A, Schröder K-H, Kroppenstedt RM, Wolters J, Böttger EC. *Mycobacterium confluentis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1992; 42(2):257-62.

11. ANEXOS

11.1. ANEXO 1.

Consentimiento informado

Toluca México Marzo de 2012

Por medio de la presente nos dirigimos a usted, para solicitar su participación en el proyecto de investigación Doctoral titulado “**Distribución geográfica de tuberculosis humana y bovina e identificación de especies en el Estado de México**”, el cual se está realizando en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM).

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa que se caracteriza por una tos crónica con expectoración, que repercute en una disminución de la calidad de vida de las personas.

Es posible que de su participación en este estudio no obtenga un beneficio directo. Sin embargo la identificación de la especie bacteriana que este causando la enfermedad, podría beneficiar a otros pacientes que la padecen y contribuir a un mejor conocimiento y tratamiento de esta.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que usted precise y la relación con el equipo médico que le atiende no va a verse afectada.

Si usted decide participar se le realizara: Una historia clínica, se le aplicara un cuestionario breve, posteriormente se le solicitaran 3 muestras de esputo, que es una expectoración pulmonar, por medio de la cual la bacteria sale del cuerpo para infectar a otra persona.

Se le pedirá su consentimiento para que a la muestra de esputo se le realice una baciloscopía que es la técnica convencional para el Diagnostico de Tuberculosis, en la cual se buscan bacilos que resisten a la decoloración del alcohol-acido (BAAR), posteriormente la muestra se cultivara en 3 medios, Lowenstein Jensen, Stonebrink y Midlebrook. Se identificara la especie bacteriana, por medio de técnicas de Biología Molecular.

Después de lo anterior yo _____ declaro bajo mi responsabilidad que he leído la hoja de información sobre el estudio y acepto participar en este estudio, sé que se mantendrá en secreto mi identidad y soy libre de retirarme del estudio en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro.

Si en algún momento me surgiera una duda o pregunta me pondré en contacto con los investigadores **Dra. Ninfa Ramírez Durán** en el teléfono 722 3373619 y con el **M en C. Adrian Zaragoza Bastida** al 722 4566082.

Consiento en participar voluntariamente

Fecha

Firma del paciente

Fecha

Nombre y firma del investigador

11.2. ANEXO 2.

Hoja de captura.

Toluca México Marzo de 2012

Datos del paciente:

No. Clínica	
No. Identificación	
Dirección (Municipio, colonia)	
Edad	
Sexo	
Ocupación	
Peso	
Talla	
Fecha de inicio de enfermedad	
Fecha de diagnóstico de TB	
Antecedentes familiares de TB	
Tipo de muestra	
Fecha de toma de muestra	
Método de diagnóstico	
Cuadro clínico	
Fecha de inicio de tratamiento	
Enfermedades crónico degenerativas	
Es alcohólico	
Pérdida de peso (kilogramos/tiempo)	
Estado inmunológico	
Número de habitantes en su vivienda	

Nombre y firma del elaborador