

Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México

Laura Pérez-Guerrero, MC,⁽¹⁾ Feliciano Milián-Suazo, MVZ, MSc, PhD,⁽¹⁾ Camila Arriaga-Díaz, Q, MSc, PhD,⁽²⁾
Cecilia Romero-Torres, MVZ,⁽²⁾ Minerva Escartín-Chávez, MC.⁽³⁾

Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C,
Romero-Torres C, Escartín-Chávez M.
Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina
y humana en una zona endémica de Querétaro, México.
Salud Publica Mex 2008;50:286-291.

Resumen

Objetivo. Determinar el papel de la tuberculosis bovina en la tuberculosis humana. **Material y métodos.** Se analizaron 255 muestras de pacientes sintomáticos, sembradas en medios de Stonebrink y Löwenstein-Jensen y analizadas por PCRMPB70 anidada y luego por *spoligotyping*. **Resultados.** De las 255 muestras, 74 fueron positivas a la PCR y 20 al aislamiento: de las primeras, 58 (78%) mostraron espigotipo de *M. tuberculosis* y 5 (6.7%) de *M. bovis*; de las segundas, 8 (47%) revelaron espigotipo de *M. tuberculosis* y 8 (47%) de *M. bovis*. De las 94 muestras positivas al aislamiento o PCR, 66 (70%) correspondieron a *M. tuberculosis* y 13 (13.8%) a *M. bovis*. Los patrones moleculares de cuatro muestras de *M. bovis* de seres humanos fueron idénticos a los de las cepas de *M. bovis* de ganado. **Conclusiones.** Se demuestra que *M. bovis* juega un papel importante en la epidemiología de la tuberculosis humana y representa un riesgo para la salud pública.

Palabras clave: tuberculosis; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; epidemiología molecular; México

Pérez-Guerrero L, Milián-Suazo F, Arriaga-Díaz C,
Romero-Torres C, Escartín-Chávez M.
Molecular epidemiology of cattle
and human tuberculosis in Mexico.
Salud Publica Mex 2008;50:286-291.

Abstract

Objective. The purpose of the study was to determine the role of bovine TB in cases of human TB. **Material and Methods.** Two-hundred and fifty-five samples from symptomatic patients were included in the study. All samples were cultured in Stonebrink and Löwenstein-Jensen media and analyzed using a nested PCRMPB70. The molecular analysis was performed by *spoligotyping*. **Results.** From 255 samples, 74 were PCR-positive and 20 were culture-positive. From 94 samples positive to PCR or to isolation, 66 (70%) showed a *spoligotype* compatible with *M. tuberculosis*, and 13 (13.8%) with *M. bovis*. Four fingerprints of *M. bovis* from humans were identical to the fingerprints of *M. bovis* from cattle in the same region. **Conclusions.** Our study shows that *M. bovis* plays an important role in the epidemiology of TB in humans and that TB in cattle represents a risk to public health.

Key words: tuberculosis; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium tuberculosis*; molecular epidemiology; Mexico

La tuberculosis (TB) humana es todavía la enfermedad más importante como causa única de morbilidad y mortalidad en muchos países.¹ Las infecciones con el virus del sida² y la presencia de enfermedades concurrentes, como la diabetes mellitus,³ la desnutrición, la

sobrepoblación y la falta de recursos para enfrentar la enfermedad, hacen difícil la solución de este problema. De acuerdo con cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS),⁴ en 1990 existían 8 millones de casos activos en el mundo, de los cuales 7.6 millones se hallaban

(1) Programa Nacional de Epidemiología-CENID-FA, INIFAP, Querétaro, México.

(2) CENID-Microbiología, INIFAP, México.

(3) Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro, México.

Fecha de recibido: 23 de agosto de 2007 • Fecha de aprobado: 17 de enero de 2008

Solicitud de sobretiros: PhD. Feliciano Milián Suazo. Programa Nacional de Epidemiología-CENID-FA, INIFAP, Cerro de Acambay 110, Colinas del Cimatario. 76090 Querétaro, Qro. México.
Correo electrónico: milian.feliciano@inifap.gob.mx

en países en desarrollo y sólo 400 mil en países industrializados.² En ese mismo año, las muertes por tuberculosis representaron casi 2.9 millones de personas, la mayoría de ellas radicadas en países del tercer mundo.

La tuberculosis en el ser humano se debe a *M. tuberculosis*, pero también puede ser efecto de otras micobacterias, como *M. bovis*, la segunda causa más común de tuberculosis en las personas. En realidad, existe una relación cruzada de infección: TB en seres humanos secundaria a *M. tuberculosis*, TB en personas por *M. bovis*, TB en bovinos consecutiva a *M. tuberculosis* y TB en bovinos por *M. bovis*.⁵ Sin embargo, es más frecuente encontrar *M. bovis* en seres humanos que *M. tuberculosis* en animales bovinos.

El riesgo de transmitir la TB de los bovinos al ser humano se ha reconocido desde hace mucho tiempo⁶ y, en consecuencia, se ha instituido la práctica sistemática de pasteurizar la leche para eliminar el agente etiológico. El nexo entre las actividades relacionadas con la manipulación del ganado y la infección está bien documentado.⁷ En México, el riesgo se explica por la elevada prevalencia de la enfermedad en el ganado lechero ($\approx 16\%$), la falta de participación de los establos lecheros en campañas de erradicación y el hecho de que 30 a 40% de la leche que se produce se vende en la forma de leche bronca.

Se ha notificado de forma repetida que la TB en seres humanos por *M. bovis* en países en desarrollo es relevante;⁸ empero, dichas cifras rara vez están sustentadas. Estudios realizados en la frontera sur de Estados Unidos de América señalan que casi 70% de los casos se debe a *M. bovis* y que la mayor parte de ellos tiene su origen en la población mexicana.⁹ Aunque relevante, la información se basa en métodos microbiológicos para la diferenciación de especie, lo que puede ser una desventaja en comparación con el uso de los métodos moleculares disponibles en la actualidad.

Existen hoy día técnicas basadas en la biología molecular que han demostrado su eficacia en la caracterización molecular de cepas, tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis*;^{10,11} una de estas técnicas (*spoligotyping*¹²⁻¹⁴) se basa en la amplificación por PCR de la región DR, un locus único y altamente polimórfico presente en el cromosoma de las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. Esta región contiene múltiples secuencias repetidas de 36 pares de bases (pb) separados por espacios intersecuenciales de una longitud de 35 a 41 pb. Al producto de la PCR de cada aislado individual se le permite hibridarse a 37 secuencias espaciadoras de *M. tuberculosis* H37Rv y seis secuencias espaciadoras de *M. bovis* BCG P3.¹² Después de la hibridación y la detección pueden identificarse las secuencias espaciadoras que son comunes al aislado y el conjunto de los oligonu-

cleótidos espaciadores. Por lo tanto, la técnica establece el diagnóstico de la presencia del agente etiológico y también determina la diferenciación de la especie (*M. tuberculosis* / *M. bovis*) y la diferenciación de cepas dentro de cada especie. Por consiguiente, el objetivo del presente estudio fue evaluar el papel de la tuberculosis bovina en la presentación de casos de tuberculosis humana a través del análisis molecular de cepas de las dos especies en poblaciones de una misma región.

Material y métodos

Muestras de seres humanos. Se incluyeron en el estudio todas las muestras (en particular esputo, orina y jugo gástrico) enviadas al laboratorio de diagnóstico del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) entre enero del 2006 y febrero del 2007 por pacientes con síntomas de tuberculosis. Con cada grupo de tres muestras –número enviado al laboratorio por cada individuo– se formó una sola. A continuación, todas estas muestras se sometieron, por separado y de manera simultánea, a las siguientes pruebas: BAAR, cultivo en medios de Lowenstein-Jensen con glicerol y Stonebrink con piruvato para estimular el crecimiento de *M. tuberculosis* y *M. bovis* y una prueba de PCR anidada (gen MPB70) para reconocer la presencia de ADN de micobacterias del complejo *M. tuberculosis*. A los aislados obtenidos por cultivo se les extrajo el ADN mediante un método convencional¹⁵ y se los sometió a un análisis molecular por *spoligotyping*, tal y como se efectuó con los tejidos de las muestras positivas a la PCR anidada. Los patrones genéticos obtenidos por *spoligotyping* (espiligotipos o *fingerprints*) se compararon, a través de un análisis de *clusters*, con los patrones obtenidos de muestras de tejido de ganado en la misma región con la finalidad de determinar la transmisión entre especies. Antes de la realización del proyecto se contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro y el consentimiento informado de los participantes, previa explicación de los objetivos y procedimientos del proyecto.

Muestras de animales. Estas muestras se obtuvieron de tejidos con lesiones sospechosas de tuberculosis, en canales de animales sacrificados en el rastro local de una zona con alta densidad de ganado lechero, con una prevalencia de tuberculosis de 17 por ciento. Las muestras se sembraron en medios de cultivo Stonebrink y Lowenstein-Jensen con glicerol y a los aislados obtenidos se les obtuvo el ADN, sometido después a la técnica de *spoligotyping* para precisar los patrones moleculares. Las muestras de animales se colectaron como parte de otro proyecto y en el presente trabajo sólo se usaron los espiligotipos disponibles en una base de datos.

Análisis estadísticos. Con la presencia (1) o ausencia (0) de las secuencias espaciadoras de los patrones moleculares de todas las muestras, incluidas las del ganado, se elaboró una matriz para efectuar la comparación pareada de aislados. Con el método de Nei y Li (1979) se obtuvo una matriz de distancia genética basada en la comparación pareada de espigotipos individuales, la cual se sometió a un análisis de *clusters* con el método UPGMA (*Unweighted Pairwise Group Method Averages*) en SPSS 10 y al final se elaboró el dendrograma para la determinación de grupos y delinear la similitud genética de las cepas.

Resultados

De un total de 255 muestras (174 de esputo, 63 de orina, 8 de jugo gástrico y 10 de tejidos varios), 46 fueron positivas a la presencia de bacilos resistentes al ácido-alcohol (BAAR), 20 resultaron positivas al aislamiento (7 en medio de Löwenstein-Jensen y 13 en medio de Stonebrink) y 74 a la presencia de micobacterias del complejo *M. tuberculosis* por PCR anidada; no siempre se identificó una coincidencia del diagnóstico entre pruebas para la misma muestra (cuadro I).

De un total de 94 muestras positivas al aislamiento o PCR, 66 (70%) mostraron un patrón molecular consistente con *M. tuberculosis* y 13 (13.8%) con *M. bovis*. De estas últimas, la mayoría resultó positiva a dos o más de las pruebas diagnósticas utilizadas (cuadro I); dos se obtuvieron a partir de jugo gástrico, seis de orina y cinco de esputo. En ocho de estas muestras se utilizó el aislado del *M. bovis* para obtener el ADN para el análisis molecular y en cinco se obtuvo directamente del tejido de la muestra; no se observó diferencia en relación con el género de los pacientes. Infortunadamente, en virtud de los registros incompletos, no fue posible obtener la edad ni otro tipo de información epidemiológica de todos los pacientes.

A pesar de que se enviaron al laboratorio muestras de los pacientes con síntomas evidentes de tuberculosis, de un total de 174 muestras de esputo sólo 22 (12.6%) fueron positivas a BAAR, único método diagnóstico en muchos laboratorios del país, 13 (7.5%) resultaron positivas al aislamiento y 48 (27.5%) a la PCR anidada, lo que subraya la dificultad para establecer el diagnóstico. De las 63 muestras de orina, 24 (38%) fueron positivas a BAAR, 5 (8%) resultaron positivas al aislamiento y 22 (35%) a la PCR anidada. Ninguna de las ocho muestras de jugo gástrico fue positiva a BAAR, 2 (25%) fueron positivas al aislamiento y 4 (50%) a la PCR anidada (cuadro II).

En la figura 1 se presenta un dendrograma con 25 espigotipos de *M. bovis*, 13 de tejido humano y 12

Cuadro I

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DEL DIAGNÓSTICO Y EL ANÁLISIS MOLECULAR DE 255 MUESTRAS DE PACIENTES CON SÍNTOMAS DE TUBERCULOSIS RECOLECTADAS ENTRE ENERO DE 2006 Y FEBRERO DE 2007 EN UNA ZONA ENDÉMICA DE QUERÉTARO, MÉXICO

Tipo de muestra	Total	BAAR+	Aislamiento+		No. de espigotipos	PCR+	No. de espigotipos
			L-J	S-B			
Esputo	174	22	6	7	7 Mtb 4 Mb	48	43 Mtb
Orina	63	24	1	4	1 Mtb 2 Mb	22	12 Mtb 4 Mb
Jugo gástrico	8	0	0	2	0 Mtb 2 Mb	4	3 Mtb 1 Mb
Otras	10	0	0	0	0	0	0
Totales	255	46	7	13	8	74	5

BAAR: presencia de bacilos resistentes al ácido-alcohol; L-J: crecimiento en medio de Löwenstein-Jensen; S-B: medio de Stonebrink; PCR: PCR anidada aplicada directamente en el tejido; Mtb: espigotipos consistentes con *M. tuberculosis*; Mb: espigotipos consistentes con *M. bovis*. Las muestras faltantes para el total de PCR positivas mostraron patrones indefinidos

Cuadro II

RESULTADOS DE LAS 13 MUESTRAS DE PACIENTES SINTOMÁTICOS QUE REVELARON ESPIGOTIPO CONSISTENTE CON *M. BOVIS* A LAS DIFERENTES PRUEBAS DIAGNÓSTICAS, DE UN TOTAL DE 255 RECOLECTADAS ENTRE ENERO DE 2006 Y FEBRERO DE 2007 EN UNA ZONA ENDÉMICA DE TUBERCULOSIS DE QUERÉTARO, MÉXICO

ID	BAAR	L-J	STN	PCR	Tejido	Tipo	Sexo	Edad
62	+	-	+	+	esputo	aislado	m	23
180	-	-	+	+	jugo gást	aislado	m	nd
197	+	-	+	+	orina	aislado	m	nd
343	++	-	+	+	esputo	aislado	h	nd
392	-	-	+	+	jugo gást	aislado	m	nd
401	++	+	+	+	esputo	aislado	h	nd
459	++	-	+	+	esputo	aislado	m	nd
482	-	-	+	+	orina	aislado	m	34
362	+	-	-	+	orina	muestra	h	nd
370	-	-	-	+	orina	muestra	h	23
394	-	-	-	+	orina	muestra	h	nd
424	+	-	-	+	esputo	muestra	m	nd
434	++	+	-	+	orina	muestra	h	30

BAAR: bacilo resistente al ácido-alcohol; L-J: crecimiento en medio de Löwenstein-Jensen; STN: crecimiento en medio de Stonebrink; PCR: prueba de PCR anidada; TIPO: muestra de la que se obtuvo el ADN; m: mujer; h: hombre; nd: no disponible

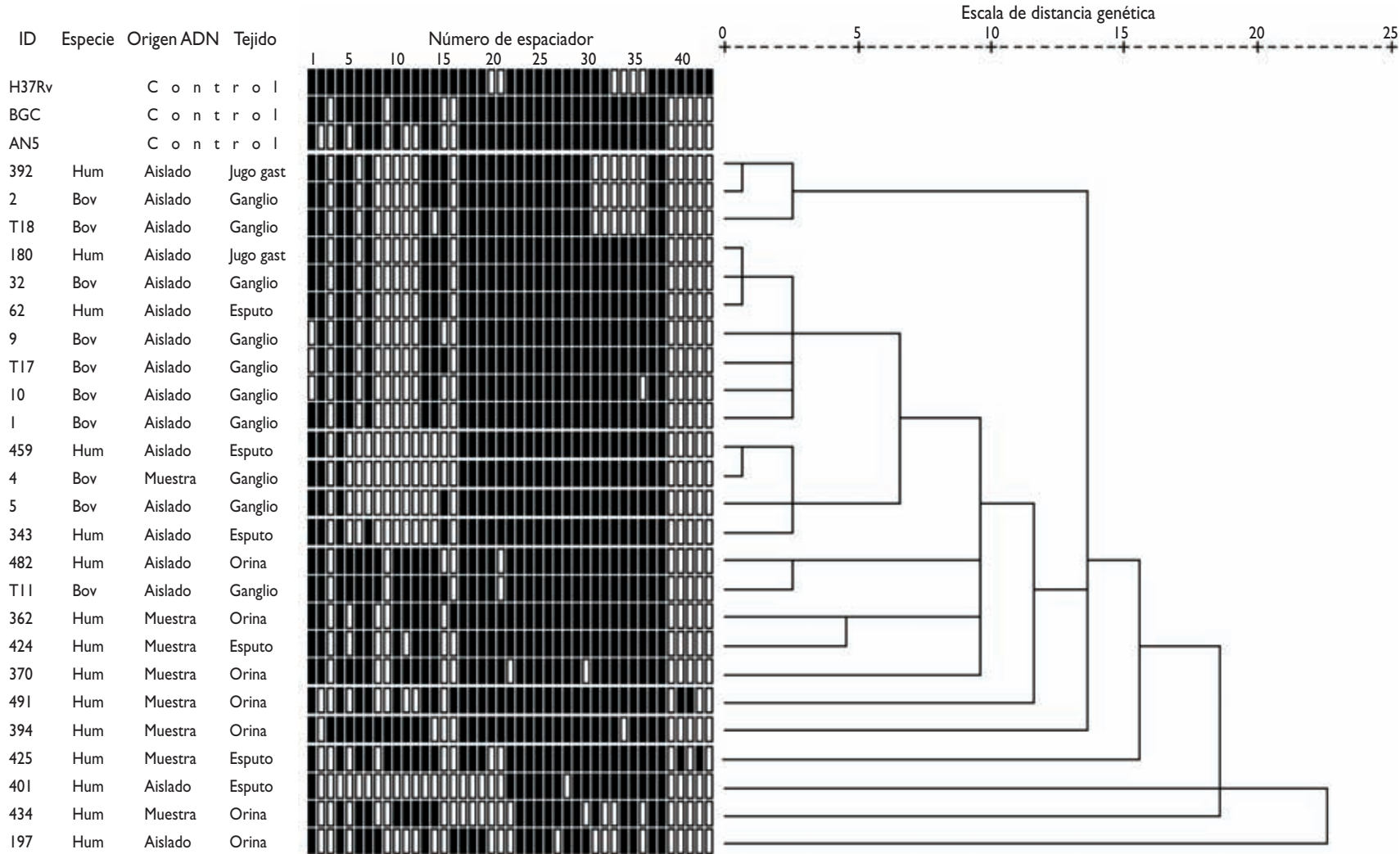


FIGURA 1. DENDROGRAMA Y PATRONES MOLECULARES (ESPOLIGOTIPOS) DE CEPAS DE *M. BOVIS* DE PACIENTES CON SÍNTOMAS DE TUBERCULOSIS RECOLECTADAS ENTRE ENERO DE 2006 Y FEBRERO DE 2007, MARCADAS EN NEGRITAS, Y DE GANADO (BOV) EN EL ESTADO DE QUERÉTARO, MÉXICO. LAS CEPAS 392, 180, 62 Y 459, DE ORIGEN HUMANO, MUESTRAN PATRONES IDÉNTICOS A LOS DE LAS CEPAS DEL GANADO EN LA MISMA REGIÓN

de tejido bovino, todos del estado de Querétaro. Las primeras cuatro columnas proporcionan información sobre el origen de la muestra y el tipo de tejido del cual se obtuvieron. En la parte superior del dendrograma se muestran los espilogotipos de tres cepas de referencia, H37Rv para *M. tuberculosis* y BCG y AN5 para *M. bovis*. El diagrama anexo proporciona los espilogotipos de cada una de las cepas de *M. bovis*; los espacios en blanco representan la ausencia del espaciador específico y en el primer renglón del esquema se numera cada uno de los espaciadores. A la derecha del esquema de los espilogotipos se anexa el dendrograma resultado del análisis estadístico de *clusters* y la escala de la parte superior indica la distancia genética entre las cepas (las cepas con el mismo espilogotipo tienen la misma distancia genética).

Cuatro de los espilogotipos de muestras humanas (392, 180, 62, y 459) son idénticos a los espilogotipos del ganado (2, T18, 32 y 4) y otros dos sólo difieren en un espaciador de otros dos espilogotipos del ganado, todos de la misma región, lo que sugiere la transmisión de la enfermedad del ganado al ser humano. El resto de los espilogotipos de personas son únicos y no tienen similitud con espilogotipos del ganado, aunque algunos de ellos difieren entre sí en sólo uno o dos espaciadores.

Dos de las muestras de seres humano cuyos espilogotipos son idénticos a los espilogotipos del ganado (392 y 180) se obtuvieron del jugo gástrico, lo que indica una infección por vía digestiva, que es la ruta más probable de infección con el bacilo del ganado por la ingestión de leche o queso fresco contaminados. En el caso de la muestra 62, se trató de un espécimen de esputo en un caso de tuberculosis meníngea identificada durante una hospitalización por causa diferente de la tuberculosis; de nueva cuenta, las infecciones con el bacilo del ganado son más probables en la tuberculosis de tipo extrapulmonar. La otra muestra con espilogotipo idéntico a un espilogotipo de ganado procedió del esputo de una mujer de la cual no se pudo obtener ningún tipo de información epidemiológica. De las nueve muestras restantes de ser humano con espilogotipos idénticos a los del ganado, seis se obtuvieron de orina y tres de esputo, de las cuales no fue posible obtener información epidemiológica adicional.

Discusión

Se ha determinado con anterioridad que los miembros del complejo *M. tuberculosis* no intercambian material genético entre sí⁸⁻¹¹ y que la escasa variabilidad genética observada es más bien consecuencia de una expansión clonal, un hecho confirmado por la regionalización de

algunos genotipos. Esto apoya la conclusión de que los genotipos (espilogotipos) de *M. bovis* obtenidos de seres humanos en el presente estudio son consecuencia de infecciones obtenidas del ganado localizado en la misma región, lo cual se sustenta por la similitud de algunos de los patrones observados entre ambas especies.

La mayor parte de los informes sobre cálculos de infección con *M. bovis* en personas se efectúa con base en el número de aislamientos; en este estudio de 20 aislados, ocho mostraron un patrón consistente con *M. bovis*, lo que sugiere que alrededor de 40% de los casos de TB podría atribuirse a la micobacteria del ganado; estudios previos han notificado hallazgos similares, en los cuales la presencia de *M. bovis* en pacientes con problemas respiratorios crónicos fue de 31% para la misma región,¹⁶ además de que se detectaron tres casos de infección concurrente de *M. bovis* y *M. tuberculosis*. En países con alta prevalencia de *M. bovis* en ganado se han obtenido resultados similares; en Malaui, un análisis de cultivos de muestras humanas de esputo reveló 42.8% de cepas de *M. bovis*;¹⁷ en Egipto, 9 (45%) de 20 pacientes seleccionados al azar con peritonitis estuvieron infectados con *M. bovis*.¹⁸

En México, los informes oficiales indican que cerca de 30% de la leche que se produce en el país se vende en la forma de leche cruda, una parte de la cual se destina a la producción de queso fresco, el cual se expende en mercados populares.¹⁹ Este producto se ha relacionado con un brote de TB en niños de origen mexicano en Nueva York²⁰ y se ha confirmado el aislamiento de *M. bovis* a partir de dicho producto.²¹ De igual manera, estudios conducidos en el sur de Estados Unidos de América han encontrado que la mayor parte de los casos de tuberculosis por *M. bovis* ocurre en personas de origen hispano, sobre todo de procedencia mexicana, y señalan el contacto con explotaciones animales y la ingestión de leche cruda y queso fresco como los factores causantes.⁹ Una situación similar se reconoció en un estudio en Denver, Colorado.²² Los resultados del presente protocolo, aunados a estos informes, son una clara indicación del elevado riesgo que la tuberculosis bovina representa para la salud pública, por lo que es necesario que se destinen mayores recursos y se hagan los esfuerzos necesarios para que se erradique la tuberculosis del ganado en México.

Agradecimientos

Los autores agradecen la intervención del doctor Guillermo Moreno (IMSS) y la química Nohemí Arellano, del laboratorio de diagnóstico del IMSS, por su apoyo en la recolección de muestras y su cultivo. Reconoci-

miento merece también el doctor Wenceslao A. Martínez Medina (SESEQ) por el apoyo suministrado para el seguimiento epidemiológico de los casos.

Este proyecto fue financiado parcialmente por Fondos Sectoriales SALUD-CONACYT, proyecto No. 14472.

Referencias

1. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi MC. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *Bull World Health Organ* 1994;172:211-220.
2. Daborn CJ, Grange JM. HIV/AIDS and its implications for the control of animal tuberculosis. *Br Vet J* 1993;149:403.
3. Chávez A, Chávez MM, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG. La nutrición en México y la transición epidemiológica. División de Nutrición en Comunidad. México: INNSZ, 1993.
4. World Health Organization. Tuberculosis, fact sheet number 104. 2004. Disponible en: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>.
5. Committee in Bovine Tuberculosis, Board of Agriculture. Washington, DC: National Academy Press, 1994.
6. Ellner JJ, Hinman AR, Dooley SW. Tuberculosis symposium: emerging problems and promise. *J Infect Dis* 1993;168:537-551.
7. Van Soolingen D, de Haas PEW, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM. Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994;32:2425-2433.
8. Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis* 1998;4:59-70.
9. Dankner WM, Waecker NJ, Essey MA. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicepidemiologic study of 73 patients and historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)* 1993;72(1):11-37.
10. Van Embden JD, Cave D, Crawford JT, Dale JW, Eisenach D, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-409.
11. Romano MI, Alito A, Fisanotti JC, Bigi F, Kantor Y. Comparison of different genetic markers for molecular epidemiology of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 1996;50:59-71.
12. Kemerbeek J, Schouls M, van Agterveld M, Kolk A. Simultaneous strain detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-914.
13. Cousins D, Williams S, Liebana E. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1998;36(1):168-178.
14. Aranaz A, Liebana E, Mateos A, Dominguez L. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1996;34(11):2734-2740.
15. Bunschoten A, Molhuizen H, Schouls L, van Soolingen D, van Embden J. Spoligotyping: a method to detect and type *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. Bilthoven, The Netherlands: Research Laboratories for Infectious Diseases. National Institute of Public Health and Environment, 1996.
16. Ordóñez TP, Milian SF, Santillán FMA, Ramírez CIC. Aislamiento e identificación de *Mycobacterium bovis* a partir de muestras de expectoración de pacientes humanos con problemas respiratorios crónicos. *Vet Mex* 1999;30(3):227-229.
17. Wedlock DN. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect* 2002;4:471-480.
18. Nafeh MA. Tuberculosis peritonitis in Egypt: the value of laparoscopy in diagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:470-477.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*): I.
20. Center for Disease Control and Prevention. Human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*-New York City, 2001-2004. *Morb Mortal Wkly Rep* 54:605-608.
21. Harris NB, Payeur J, Bravo D, Osorio R, Stuber T, Farrel D, et al. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating from Mexico. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(3):1025-1028.
22. Young J, O'Connor ME. Risk factors associated with latent tuberculosis infection in Mexican American children. *Pediatrics* 2005;115:647-653.