



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat Autònoma de Barcelona

**FRECUENCIAS DE DETECCIÓN DE *BRUCELLA* SPP EN QUESOS FRESCOS
DE VACA Y CABRA ELABORADOS ARTESANALMENTE MEDIANTE LA
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PUNTO FINAL Y SU
RELACIÓN CON LA PREVALENCIA EN HUMANOS EN EL ESTADO DE
NUEVO LEÓN, MÉXICO**

TESIS DOCTORAL

**Para acceder al grado de doctor dentro del programa de
Doctorado en Ciencias de los Alimentos de la Universidad Autònoma de Barcelona**

JOSÉ LUIS LAZCANO VILLARREAL

Directores:

Dr. ARTUR XAVIER ROIG SAGUÉS
Facultat de Veterinària de la UAB



Dr. ALFREDO WONG GONZÁLEZ
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.A.N.L.



Programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària de la UAB
Bellaterra, septiembre 2018



Universidad Autónoma de Barcelona

FRECUENCIAS DE DETECCIÓN DE *BRUCELLA* SPP EN QUESOS FRESCOS DE VACA Y CABRA ELABORADOS ARTESANALMENTE MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PUNTO FINAL Y SU RELACIÓN CON LA PREVALENCIA EN HUMANOS EN EL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO

TESIS DOCTORAL

Para acceder al grado de doctor dentro del programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona

JOSÉ LUIS LAZCANO VILLARREAL

Director: **DR. ARTUR XAVIER ROIG SAGUÉS**
Profesor Titular del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria de la UAB.



Director: **DR. ALFREDO WONG GONZÁLEZ**
Profesor Investigador del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.



Tutora: **Dra. MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO**
Profesora Titular del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria de la UAB .



Programa de Doctorado en Ciencias de los Alimentos
Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària de la UAB.
Bellaterra, septiembre 2018

DEDICATORIAS

A mí esposa Andrea, mis hijos José Luis, Pamela y Andrea por el apoyo incondicional, a quienes agradezco mucho, mis nietos Regina y Maximiliano y a mis padres Félix Lazcano Lazcano Q.E.P.D. y María del Socorro Villarreal Villarreal, dedico con mucho amor este trabajo.

¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme dado la oportunidad de una nueva experiencia en la vida con esta investigación y a mi familia por su apoyo.

A los profesores que contribuyeron en mi formación profesional, muchas gracias.

Aprecio y agradezco mucho al Dr. Artur Xavier Roig Sagués por haberme aceptado como alumno y por todo el apoyo brindado en la realización de este trabajo de investigación, por sus valiosos comentarios y su amistad, gracias.

Dr. Alfredo Wong González, le agradezco mucho por haberme aceptado como alumno y por todo el apoyo brindado en la realización de esta investigación, por sus consejos, valiosos comentarios, paciencia y su amistad, gracias.

Dr. Ignacio de Blas Giral, por su amistad y su apoyo brindado para el análisis estadístico de la información, mil gracias.

Dr. Juan José Zárate Ramos, le agradezco mucho por su amistad, consejos valiosos, revisión y el apoyo económico para la realización de este trabajo, ya que sin él posiblemente no hubiera podido realizar esta investigación.

Dra. Blanca Edelia González Martínez. Gracias por su apoyo, amistad y consejos valiosos, gracias

QBP. Stephany Castillo, Cinthia Padrón, Laura Galván, Dra. Sibilina Cedillo, Dr. Uziel Castillo, Dra. Rosa María Sánchez, Dr. Fimbres. Dr. Rogelio Ledezma Por su amistad, y todo el apoyo que me brindo durante el presente trabajo, así como sus valiosos consejos muchas gracias.

A mis compañeros futuros Doctores Lety, Arnoldo, Gustavo, Rodrigo y a los recientes doctores Tere, Paty, Marco Antonio, Mirna, Lulú, Bety, gracias por su amistad, apoyo y los momentos que pasamos juntos en las clases, defensas de nuestros trabajos y reuniones, muchas gracias.

Al Dr. Sergio Maltos Uro y al Dr. Rafael Hernández, Jefe de Regulación Sanitaria y Secretario Técnico respectivamente, por su apoyo a través de la Secretaria de Salud del Estado de Nuevo León, al facilitarnos un buen número de las muestras de quesos recolectadas; así como los datos de la frecuencia en humanos para la realización de este trabajo de investigación, gracias.

Gracias al programa de mejoramiento del profesorado (PROMEP) por la beca otorgada para la realización de este estudio e investigación de doctorado.

El Financiamiento de la investigación fue por parte de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, a través de proyecto (PIFI).

Aprecio y agradezco mucho al personal del laboratorio Sandra y Lesly.

INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA INVESTIGACIÓN

Nombre del director/es y tutor, y cargo. Dr. Alfredo Wong González, Coordinador del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Dr. Artur Xavier Roig Sagués Profesor Titular del Departament de Ciència Animal i de ls Aliments, Facultat de Veterinària de la UAB

INFORMA

Que el trabajo de investigación titulado: “FRECUENCIAS DE DETECCIÓN DE *BRUCELLA* SPP EN QUESOS FRESCOS DE VACA Y CABRA ELABORADOS ARTESANALMENTE MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PUNTO FINAL Y SU RELACIÓN CON LA PREVALENCIA EN HUMANOS, COLECTADOS EN NUEVO LEÓN, MÉXICO”, ha sido realizado bajo nuestra dirección o tutela por el Dr. Alfredo Wong González, Dr. Artur Xavier Roig Sagués, dentro del programa de doctorado de Ciències dels Aliments del Departament de Ciència Animal i de ls Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, septiembre 2018

Nombre y firma

José Luis Lazcano Villarreal

Dr. Alfredo Wong González

Dr. Artur Xavier Roig Sagués

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA INVESTIGACIÓN	iv
INDICE DE CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	3
1.2 Objetivos General y Particulares	3
1.3 Objetivo General.....	3
1.4 Objetivos Particulares.....	3
2. REVISIÓN LITERATURA.....	4
2.1 Sinonimias de Brucelosis.....	4
2.2 Historia de la Brucelosis	4
2.3 Taxonomía del género <i>Brucella</i>	7
2.4 Etiología	11
2.5 Distribución	13
2.6 Transmisión	14
2.7 Características de la enfermedad	18
2.7.1 En el ganado	18
2.7.2 En humanos	19
2.8 Diagnóstico.....	20
2.8.1 Métodos de Cultivo y Aislamiento	22
2.8.2 Medios Selectivos e Identificación	23
2.8.3 Medios Selectivos	23
2.8.4 Medios de Identificación.....	24
2.9 Métodos de Análisis Molecular (PCR).....	27
2.10 Pruebas Serológicas	31
2.11 Pruebas Complementarias	31
2.11.1 Prueba Cutánea de la Brucelina	31
2.11.2 Prueba de Aglutinación del Suero (SAT).....	32
2.11.3 Prueba del Anillo de Leche (Prueba de Bang)	32
2.12 Pruebas más utilizadas en el diagnóstico	33
2.13 Consecuencias de <i>Brucella</i> en la ganadería y la Salud Pública	35

2.13.1	En la ganadería.....	35
2.13.2	En la Salud Pública	37
2.14	Situación de la Brucelosis en México.....	40
2.15	Sistemas de Producción Bovina Lechera en México	46
2.16	Sistema de Producción Caprina en México	47
2.17	La Leche	49
2.18	El Queso	50
2.19	Producción de queso en México	50
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.1.1	Metodología	54
3.2	Descripción del área geográfica del estudio	54
3.3	Determinación del tamaño de muestra.....	55
3.4	Colección de las muestras.....	56
3.5	Procesamiento de las muestras	58
3.6	Método de extracción del ADN Genómico	59
3.7	Análisis y cuantificación del ADN	60
3.8	Cebadores utilizados.....	61
3.9	Optimización de las condiciones de amplificación estandarización de la técnica de PCR ...	61
3.10	Amplificación del ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	61
3.11	Especificidad de la técnica de PCR	62
3.12	Secuenciación de los productos amplificados de PCR	62
3.13	Análisis de datos obtenidos	62
4.	RESULTADOS	64
4.1	Determinación del tamaño de muestra y colección	64
4.2	Extracción y cuantificación del ADN Genómico	65
4.2.1	Cuantificación de ADN	65
4.3	Estandarización de la técnica de PCR para determinar la presencia de <i>Brucella</i> spp.....	66
4.3.1	Optimización de las condiciones de Amplificación de la PCR.....	66
4.4	Límite de detección por medio de la PCR Punto Final.....	67
4.4.1	Amplificación del ADN de <i>Brucella</i> spp por medio de la PCR	68
4.4.2	Especificidad de la técnica de PCR	68
4.4.3	Secuenciación de los productos amplificados de PCR.....	70
4.4.4	Frecuencias de <i>Brucella</i> spp en muestras de queso	71
4.4.5	Correlación de los casos e incidencia de brucelosis en humanos con las frecuencias de quesos artesanales positivos a brucelosis por municipio	79
5.	DISCUSIÓN	86
6.	CONCLUSIONES	92
7.	BIBLIOGRAFÍA	94
8.	ANEXO 1.....	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Supervivencia de <i>Brucella</i> spp. en el medio ambiente.....	15
Tabla 2. Encuesta elaborada al momento de coleccionar la muestra.....	57
Tabla 3. Procedencia de quesos coleccionados en Municipios y el área Metropolitana de Monterrey, N.L.	65
Tabla 4. Condiciones de amplificación	66
Tabla 5. Secuencias consenso obtenidas en el programa EditSeq	70
Tabla 6. Resultados de la homología de las secuencias del gen BSCP31 <i>Brucella</i> spp.....	71
Tabla 7. Frecuencias relativas obtenidas de los municipios muestreados y de muestras positivas a <i>Brucella</i> spp.	72
Tabla 8. Evolución de las frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en quesos artesanales en Nuevo León	73
Tabla 9 Frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en quesos	74
Tabla 10. Frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en quesos artesanales según estado de procedencia (ampliado).....	75
Tabla 11.Frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en leche para la elaboración de quesos artesanales según especie.....	75
Tabla 12.Evolución anual de las frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en quesos artesanales según especie.....	76
Tabla 13. Frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en quesos artesanales según municipio de venta.....	77
Tabla 14. Frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en quesos artesanales según municipio de venta (agrupado).	78
Tabla 15.Evolución anual de las frecuencias de detección de <i>Brucella</i> spp en quesos artesanales según municipio de venta (agrupado).	78
Tabla 16. Casos y tasa de incidencia de brucelosis en humanos por municipio y año.....	82
Tabla 17. Incidencia acumulada de brucelosis humana (X 100,000 habitantes) distribuida por municipios ajustada según censo estimado.	83

**Tabla 18. Incidencia acumulada de brucelosis humana (X 100,000 habitantes)
distribuida por años ajustada según censo estimado 84**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de México con las diferentes fases: Libre, erradicación y control de brucelosis en ganado.	42
Figura 2. Número de casos de brucelosis en humanos en México 2001-2015.	43
Figura 3. Incidencia anual de brucelosis en humanos en México durante el periodo 2001-2015.	44
Figura 4. Número de casos anuales de brucelosis en humanos en Nuevo León durante el periodo 2001-2015.	44
Figura 5. Incidencia anual de brucelosis en humanos en Nuevo León* durante el periodo 2001-2015. La cual varía de 1,82 a 10,92.	45
Figura 6. Número de defunciones anuales por brucelosis en humanos en México reportados y confirmados en el periodo 2001-2014.	45
Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología seguida.	54
Figura 8. Determinación del tamaño de muestra a través del programa Win Epi 2.	56
Figura 9. Fotografías de venta de queso en las explotaciones y/o puntos de venta (Mercados y vendedores ambulantes)	58
Figura 10. Nano Drop ND 1000	60
Figura 11. Localización geográfica de los municipios muestreados y total de muestras	64
Figura 12. Bandas de los ADN en geles de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio	66
Figura 13. Productos amplificados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio, donde fragmento esperado es 223pb.	67
Figura 14. Límite de detección ADN de <i>Brucella</i> spp.	67
Figura 15. Amplificación de ADN de <i>Brucella</i> spp a partir de Muestras	68
Figura 16. Amplificación de ADN de <i>Brucella</i> spp a partir de Muestras	68
Figura 17. Especificidad de la Técnica de PCR	69
Figura 18. Productos amplificados que se enviaron a secuenciar	69
Figura 19. Quesos negativos y positivos por municipio	73

Figura 20. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en Nuevo León 2009	79
Figura 21. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en Nuevo León 2010	80
Figura 22. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en ... Nuevo León 2011	80
Figura 23. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en ... Nuevo León 2012	81
Figura 24. Correlación entre la incidencia acumulada de brucelosis humana y la frecuencia de detección de <i>Brucella</i> spp.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

C-: Control Negativo

C+: Control Positivo

dNTP's: Deoxinucleótidos Trifosfatados

M: Marcador de Peso Molecular

KDa: Dalton

Fig.: Figura

Nº: Número

min.: minuto (s)

S.: segundo(s)

ml: mililitro

µl.: microlitro

mg.: miligramos

g.: gravedades

g.: gramos

µg.: microgramos

ng: nanogramo

pg.: picogramo

fg.: femtogramo

PCR.: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

DGIS: Dirección General de Información en Salud

DGE: Dirección General de Epidemiología

SSA: Secretaría de Salubridad y Asistencia

OIE: Organización Mundial de Sanidad Animal

PBS: Buffer de Fosfatos

Pb.: Pares de bases

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

GLM.: Modelo lineal generalizado

UV: Ultra Violeta

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron detectar la presencia de *Brucella* spp y determinar la frecuencia en quesos artesanales y su relación con la prevalencia de brucelosis en humanos, durante los años 2009-2012 en 26 municipios del estado de Nuevo León, México, donde se colectaron 386 muestras de queso fresco. Se estandarizó la técnica de PCR utilizando los cebadores B4 / B5 que corresponden a 223 pares de bases (pb) de un fragmento del gen que codifica la proteína de la membrana externa, que amplifican la secuencia de 31 kDa (BCSP31) de *Brucella* spp. Se determinó el límite de detección que fue de 100 pg. Las secuencias consenso de los productos amplificados positivos se compararon en la base de datos del Gen Bank, resultando 100% de homología a *Brucella* spp. En 16 de los municipios muestreados, se logró detectar 111 quesos positivos a *Brucella* spp que representan el 28,76% (111/386) del total. De la evolución de las frecuencias de detección de *Brucella* spp resultó una significación de $p < 0,001$ y de la incidencia acumulada de brucelosis humana por cada 100,000 habitantes por municipios se obtuvo una significación de $p < 0,001$, y ésta a su vez tuvo una correlación significativa con la frecuencia de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales por PCR, resultando el coeficiente de correlación significativo ($< 0,001$) en los municipios muestreados. La presencia de brucelosis en los quesos artesanales y el nivel de control de *Brucella* spp en los quesos afecta la presentación de casos clínicos de *Brucella* spp en humanos.

ABSTRACT

The objectives of this study were to detect the presence of *Brucella* spp and determine the frequency of artisanal cheeses and its relationship with the prevalence of brucellosis in humans during the years 2009-2012 in 26 municipalities of the state of Nuevo León, Mexico. Where 386 samples of fresh cheese were collected. The PCR technique was standardized using primers B4 / B5 which correspond to 223 base pairs (bp) of a fragment of the gene encoding the outer membrane protein, which amplify the 31 kDa sequence (BCSP31) of *Brucella* spp. The detection limit that was 100 pg was determined. Consensus sequences of the positive amplified products were compared in the Gen Bank database resulting in 100% homology to *Brucella* spp. In 16 of the sampled municipalities it was possible to detect 111 positive cheeses to *Brucella* spp, which represents 28, 76% (111/386) of the total. The evolution of the detection frequencies of *Brucella* spp resulted in a significance of $p < 0,001$ and the cumulative incidence of human brucellosis per 100 000 inhabitants per municipality was obtained a significance of $p < 0,001$ and this in turn had a significant correlation with the detection frequency of *Brucella* spp in artisanal cheeses by PCR. Resulting the significant correlation coefficient of $p < 0,001$ of the sampled municipalities. The presence of brucellosis in artisan cheeses and the level of control of *Brucella* spp in cheeses affects the presentation of clinical cases of *Brucella* spp in humans.

1. INTRODUCCIÓN

Tradicionalmente las infecciones de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) se diagnostican mediante el cultivo de muestras de alimentos que se suponen contaminados y la identificación y detección de las bacterias se basa principalmente en el crecimiento de las bacterias en los medios de cultivo, y con base en criterios morfológicos y fisiológicos que quizá dependan de factores ambientales o genéticos. Por otro lado, se ha demostrado que algunas células bacterianas pueden entrar en un estado viable pero no cultivable, debido al procesamiento al que se sujeta el alimento, lo que imposibilita el uso de los métodos de cultivo como herramienta de diagnóstico. Además, la obtención de resultados puede demorar días o semanas y un alto porcentaje de los casos de ETA no puede asociarse con algún alimento en particular o no es posible identificar al patógeno responsable debido, fundamentalmente, a que los resultados de los análisis bacteriológicos demoran mucho tiempo o que el alimento implicado ya no se encuentra disponible para su análisis, lo que sugiere la necesidad de establecer métodos rápidos y eficientes de detección del agente causal (Probert *et al* 2004; Flores y Herrera, 2005).

Mederos y col, (1981) y OIE, (2016) mencionan que las ETA han sido reconocidas como el principal problema de salud pública en el mundo actual y dentro de éstas se encuentra la brucelosis, que es una zoonosis de reporte obligatorio y se encuentra en la lista única del código sanitario para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2016); en el caso particular de *Brucella* el diagnóstico se basa principalmente en el aislamiento del agente y se le ha asociado con un incremento en el riesgo de infecciones del personal que labora o manipula al agente en los laboratorios, al mismo tiempo que presenta graves repercusiones económicas y/o sanitarias y una potencial barrera para el comercio internacional en la importación y exportación de animales y sus productos lácteos y cárnicos.

Algunos investigadores mencionan que los quesos artesanales fueron los precursores de los industrializados, aunque actualmente se les considera con cierto menosprecio por carecer de la homogeneidad y apariencia, además de ser muchos de ellos elaborados con leche cruda (leche no pasteurizada) de difusión local y regional. Villegas (2004) y Ramírez (2011) mencionan que en México se elaboran más de 30 tipos de quesos, la

mayor parte de ellos son del tipo artesanal, y de estos quesos el más comercializado es el queso fresco (Villegas y Cervantes, 2011).

González y col. (2004) definen al queso fresco artesanal como aquel producto que es blanco, blando, con alta humedad, sabor tenue a leche y salado, mientras que Ramírez (2011) menciona que la elaboración de queso artesanal en México, en muchas ocasiones, no incluye la pasteurización de la leche, lo que lo hace un producto altamente perecedero; haciéndolo un excelente substrato para microorganismos patógenos, entre los que se encuentra la *Brucella*, lo que representa un riesgo a la Salud Pública.

Las enfermedades infecciosas impactan negativamente en la productividad pecuaria de México. Dentro de estas enfermedades, destaca la brucelosis la cual ocasiona graves pérdidas por fallas reproductivas como también por las restricciones aplicadas tanto a los animales infectados como a los productos de éstos, al mismo tiempo repercute en la salud pública; costos tratamientos y pérdidas productivas. Cada año la Secretaría de Salud informa sobre los nuevos casos de brucelosis humana, que en promedio se presentan más de 2,000 casos. La mayoría de estos casos se registran en las personas no relacionadas con las actividades rurales, y casi 20 muertes por año que están directamente relacionadas con la enfermedad. Esta enfermedad es considerada la zoonosis bacteriana más importante en México (Luna y Mejía, 2002; Seleem *et al.*, 2010; Aguilar *et al.*, 2011).

Uno de los retos actuales en la tecnología de los alimentos, es la de implementar métodos rápidos y sensibles para el diagnóstico confiable de enfermedades que se pueden transmitir a través de los alimentos, siendo la brucelosis una de las más importantes zoonosis asociadas al consumo de productos y subproductos de origen animal (Castro *et al.*, 2005).

La búsqueda de metodologías rápidas puede asegurar una buena calidad de los productos y es una necesidad real. Por lo que la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es un método rápido y confiable y representa una buena opción para lograr la detección rápida y específica de las bacterias del género *Brucella*, ya que se basa en la detección (gen), mas no de su actividad, lo que nos demuestra que en ese momento el gen de interés está presente (Morales *et al.*, 2004; Flores y Herrera, 2005; Aguirre *et al.*, 2008).

1.1 Hipótesis

Los quesos artesanales que se expenden en el estado de Nuevo León están contaminados con *Brucella* spp y considerando que esta región del país tiene un alto consumo de quesos artesanales, lo cual conlleva la posibilidad de transmisión de brucelosis a través del consumo de quesos contaminados al humano.

1.2 Objetivos General y Particulares

1.3 Objetivo General

Detectar la presencia de *Brucella* spp a partir de muestras de quesos frescos, elaborados artesanalmente a partir de leche de vaca y cabra, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Punto final, colectadas en los municipios del estado de Nuevo León, México.

1.4 Objetivos Particulares

- 1.- Estandarizar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Punto Final, para determinar la presencia de *Brucella* spp en queso fresco elaborado artesanalmente.
- 2.-Detectar *Brucella* spp por medio de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Punto final en queso fresco de vaca y cabra elaborados artesanalmente colectados en el estado de Nuevo León, México.
- 3.-Determinar la frecuencia de detección de ADN de *Brucella* spp, en los quesos analizados, según la especie.
- 4.-Determinar la evolución anual de las frecuencias de detección de *Brucella* spp, en quesos frescos de vaca y cabra elaborados artesanalmente, colectados en el estado de Nuevo León, México.
- 5.-Relacionar las frecuencias de casos clínicos de brucelosis en humanos y la presencia de *Brucella* spp en quesos artesanales.

2. REVISIÓN LITERATURA

2.1 Sinonimias de Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial donde cuenta con diferentes sinónimos entre los cuales se pueden mencionar en el hombre: fiebre napolitana o melitococia, melitococcosis, fiebre Malta, fiebre del Mediterráneo, fiebre de Gibraltar; esto de acuerdo con el orden seguido a las regiones donde se descubrió por primera vez. Se le conoce también como fiebre ondulante, debido a las temperaturas oscilantes que se presentan en los pacientes. En animales las sinonimias son: aborto contagioso, aborto infeccioso, aborto epizoótico, aborto enzoótico, enfermedad de Bang en bovinos, mientras que en equinos: brucelosis equina, enfermedad de la cruz, fistula de la cruz, mal de la nuca, mal de la cruz, ulcera de la nuca, discoespondilitis y enfermedad de Talpa. Sin embargo, las siguientes sinonimias se aplican en general para designar la brucelosis tanto en humanos como en bovinos y en caprinos: fiebre del Mediterráneo, fiebre de Malta, fiebre ondulante, fiebre del Río Grande, brucelosis y septicemia de Bruce en reconocimiento a David Bruce (1855-1931), pionero en estudios de la enfermedad en bovinos (Díaz *et al.*, 2000; Acha y Szyfres, 2001; Luna y Mejía, 2002; Martínez y Martínez, 2002; Fernández y Gómez, 2009; Swai y Schoonman, 2009; Lawinsky *et al.*, 2010; Scholz y Vergnaud, 2013; Woldemeskel, 2013; García *et al.*, 2014; Álvarez 2015a)

2.2 Historia de la Brucelosis

La brucelosis es una enfermedad que se definió a partir del aislamiento del agente causal; sin embargo patrones compatibles a la enfermedad ya habían sido descritos por Hipócrates en el año 400-450 a.C. y de acuerdo con los estudios realizados en huesos en antiguo Egipto que datan del año 750 a.C., los cuales mostraron evidencias de artritis y otras lesiones osteoarticulares comunes a las de brucelosis. Así mismo se le asocia a la quinta plaga de Egipto alrededor del año 1600 a.C. Sin embargo, las primeras descripciones de la brucelosis fueron las realizadas por Cleghorn en 1751, posteriormente durante la guerra de Crimea en los años de 1854 a 1856 se presentaron casos de fiebres prolongadas donde el mayor número de estos casos se presentaron en la Isla de Malta, los cuales eran diferentes a las enfermedades conocidas en la época, lo que sugirió la presencia de una nueva enfermedad. Posteriormente, Jeffrey Allen Marston en el año de

1859 realizó estudios clínicos y patológicos de la fiebre del Mediterráneo o fiebre remitente gástrica del Mediterráneo y en 1863 realizó una descripción detallada de la enfermedad, a partir de los síntomas diferenciándola de otras enfermedades de la época. En los años de 1878 a 1880 Brawer y Lehnent determinaron el carácter infeccioso de los abortos en bovinos y posteriormente, en el año de 1886 el médico inglés David Bruce, al realizar estudios a partir del bazo de cuatro soldados británicos que murieron de fiebre Malta, logró aislar por primera vez el agente etiológico de la brucelosis al cual denominó en ese tiempo como *Micrococcus melitensis*, y a partir de las observaciones realizadas publicó un trabajo en 1887. Tiempo después, inoculó a monos y pudo reproducir la enfermedad a la cual le dio el nombre de fiebre Malta y al agente etiológico lo llamó *Micrococcus melitensis* (Beeson, 1956; Díaz *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2005; Seleem *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2015a; Guzmán *et al.*, 2016).

En el año de 1896, Bang y Stribolt comprobaron que el aborto infeccioso en las vacas, lo causaba una bacteria a la cual le denominaron *Bacillus infectiosi*. En ese mismo año en Dinamarca el Dr. Bernhard Lauritz F. Bang, logró aislar el agente etiológico del aborto infeccioso de los bovinos, al cual le dio el nombre de bacilo de Bang. Posteriormente en el año 1897, Wright y Smith realizaron un importante descubrimiento en el diagnóstico serológico de la enfermedad, a través de las propiedades aglutinantes específicas en sueros sanguíneos de los enfermos. En 1897, Matthew Louis Hughes (1867-1899) describió la enfermedad en una monografía publicada en Londres, con el título de *Mediterranean Malta or Undulant Fever*. En el año de 1904 en Inglaterra se nombró la Comisión de la Fiebre del Mediterráneo, presidida por Bruce, para investigar la forma de transmisión de la brucelosis al humano, y un año más tarde Temístocles Zammit informó que la brucelosis se transmitía al hombre a partir del consumo de la leche cruda de las cabras infectadas, lo cual dio origen al concepto de zoonosis. El Dr. Horrocks, en el mismo año, aisló el agente causal de la fiebre del Mediterráneo a partir de leche y orina de cabras; y estos estudios permitieron establecer la importancia epidemiológica que tienen los animales (en este caso las cabras), en la transmisión de la brucelosis y permitieron establecer las primeras medidas de control de la enfermedad, las cuales consistieron en prohibir el consumo de leche cruda entre las fuerzas Inglesas; lo cual disminuyó la presentación de nuevos casos y el número de defunciones por esta causa. Posteriormente la población civil adoptó las medidas propuestas por la armada inglesa, la

cual repercutió disminuyendo la mortalidad en los seres humanos (Rodríguez *et al.*, 2005; Seleem *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2015a; Guzmán *et al.*, 2016).

Los investigadores MacNel y Kerr en el año de 1910 confirmaron la presencia de la enfermedad, que causaba abortos en el ganado en Estados Unidos. Posteriormente en 1911 los doctores Schroeder, Cotton, Mohler y Traum, aislaron a partir de leche de vaca y de amígdalas de niños que consumían de esta leche, el bacilo de Bang, estableciendo por primera vez el papel que juegan los bovinos en la transmisión de la enfermedad (Díaz *et al.*, 2000).

Jacob Traum en el año de 1914 al realizar estudios a partir de fetos abortados por cerdas, observó que existía una mayor similitud de este germen con el bacilo de Bang que el *Micococcus melitensis* y es así como descubrió la etiología del aborto epizoótico del cerdo (*Brucella suis*) (Rodríguez *et al.*, 2005; Seleem *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2015a).

Alicia Catherine Evans, bacterióloga estadounidense en 1918 descubre el parentesco íntimo entre el *Micococcus melitensis* y el *Bacillus abortus*, y estos resultados junto con los de Meyer y Shaw en 1920, permitieron agrupar a estos microorganismos en un solo género bacteriano *Brucella* y los denominaron *Brucella melitensis* y *Brucella abortus* (Rodríguez *et al.*, 2005; Seleem *et al.*, 2010; Alvares *et al.*, 2015a). Así mismo Evans relacionó la enfermedad en humanos con la ingestión de leche de vaca y comprobó la semejanza de los microorganismos aislados por Bruce, Bang y Trum y sugirió designar con el nombre de *Brucella* en honor, a David Bruce (Beeson, 1956; Alvares *et al.*, 2015a; Guzmán *et al.*, 2016).

Particularmente en México, a partir de 1905 se acepta la existencia de la brucelosis, aunque el primer intento de aislamiento del *Micococcus melitensis* a partir de pacientes con fiebres recurrentes fue el Dr. Carbajal, en el año de 1906, sin éxito. Posteriormente en Querétaro, en 1912, el Dr. Reséndiz relacionó la enfermedad con la importación en 1910 de cabras murcianas. Más tarde, el Dr. Tomas Perrin intentó aislar el *Micococcus melitensis* sin éxito. Finalmente en 1921, el Dr. Manuel Vergara fue el primero en aislarlo en México, lo que fue confirmado en 1923 por Placeres por estudios bacteriológicos y serológicos (Díaz *et al.*, 2000; Martínez y Martínez, 2002; Álvarez *et al.*, 2015a).

Cinco de las especies de *Brucella* han sido aisladas en México, y sólo *B. neotomae* y *B. marinum* no han sido aisladas. Estas incluyen *B. melitensis* biovares 1-3; *B. abortus* biovares 1, 2, 4-6; *B. suis* biovar 1, *B. canis* y *B. ovis*. Algunos de los aislamientos se han realizado en sectores no tradicionales de destino de especies animales, por ejemplo, una cepa de *B. suis* fue aislado de queso elaborado con leche procedente de una vaca lechera y algunas cepas de *B. melitensis* se han aislado de productos lácteos de leche de vaca (Luna y Mejía, 2002).

2.3 Taxonomía del género *Brucella*

De acuerdo a la clasificación taxonómica, las bacterias del género *Brucella* pertenecen al Reino Bacteria, Filum Proteobacterias, Clase Alphaproteobacterias subdivisión $\alpha 2$ (alfa), incluye organismos que son patógenos de mamíferos y plantas; entre los organismos de los mamíferos son los géneros *Bartonella*, *Rickettsia* y *Ehrlichia*, Orden Rhizobiales, Familia Brucellaceae, que incluye al género *Brucella*, *Mycoplasma* y *Ochrobacterium*. El género *Brucella* comprende a la *B. melitensis* (que afecta a los seres humanos y las cabras) y *B. abortus* como segunda especie (que afecta al ganado). Esta clasificación fue establecida por Meyer y Shaw en 1920, ya que en ese tiempo las técnicas moleculares no estaban disponibles y la clasificación de las especies se basó exclusivamente en los rasgos fenotípicos, como la preferencia de especie afectada, y diferenciándolas por las reacciones bioquímicas, comportamiento de crecimiento en diferentes medios de cultivo, y el crecimiento en la presencia de diferentes colorantes (Redkar *et al.*, 2001; Martínez y Martínez, 2002; Ficht, 2010; Scholz y Vergnaud, 2013; Coelho *et al.*, 2014).

En los años siguientes, fueron identificadas y añadidas al género de esta clasificación como nuevas especies, al igual que las dos primeras especies que se clasificaron y caracterizaron sobre su fenotipo y la preferencia de la especie afectada, las siguientes: en el año de 1914, Jacob Traum, a partir de un lechón abortado, logró aislar *B. suis*, la cual fue reconocida en 1929. En el año de 1956, a partir de ovejas, se logró aislar *B. ovis*. Posteriormente, en 1957, a partir de las ratas del desierto *B. neotomae* y en 1968 *B. canis* aislada de perros. La diferenciación de las diferentes especies y biovariedades ha tenido y sigue teniendo dificultades, debido a la existencia de cepas atípicas a reacciones bioquímicas que no se pueden incluir en las especies actuales (Scholz y Vergnaud, 2013).

Después de la adición de *B. canis* en 1968, el subcomité de taxonomía de *Brucella* reprobó en 1986 las seis especies clásicas reconocidas de *Brucella*, cada una de las cuales tiene un hospedador principal, del que recibieron el nombre: *B. abortus* (bovinos), *B. canis* (caninos), *B. melitensis* (caprinos), *B. neotomae* (rata del desierto), *B. ovis* (ovinos) y *B. suis* (porcinos); estas especies del género son muy similares ya que todas muestran un >95% de homología ADN-ADN mediante ensayos de hibridación (Ortega, 1997; Acha y Szyfres, 2001; López y Contreras, 2004; Lucero *et al.*, 2007; Probert *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006; Hinic *et al.*, 2008; Fernández y Gómez, 2009; Coelho *et al.*, 2014).

No se añadieron nuevas especies al género hasta el año 2007 (Scholz y Vergnaud, 2013); sin embargo, en los últimos años se han realizado importantes cambios en cuanto al reconocimiento de nuevos miembros del género *Brucella*. Bounaadja y col., en 2009; reconocen ocho especies por su especificidad de especie animal y peculiaridades patógenas. Posteriormente Guzmán y col. (2016), Seleem y col. (2010) y Woldemeskel (2013), mencionan que son nueve especies reconocidas, siete que afectan animales terrestres, que son: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* y *B. microti* y dos que afectan a los mamíferos marinos: *B. ceti* y *B. pinnipedialis*. A las tres primeras especies se les denomina *Brucellas* clásicas, y se les reconocen tres biovariedades para *B. abortus* y *B. melitensis*, y cinco para *B. suis*. Las especies restantes no se diferenciaron en biovariedades. (Bounaadja *et al.*, en 2009; Seleem *et al.*, 2010; Woldemeskel, 2013).

El descubrimiento de la *Brucella* en mamíferos marinos a principios de 1990, ha cambiado el concepto de que la brucelosis solamente afecta animales terrestres y las medidas de control de la enfermedad (Seleem *et al.*, 2010).

Scholz y Vergnaud (2013), Álvarez y col. (2015a) y Soares y col. (2015) mencionan que el género *Brucella* consta de diez especies denominadas *B. melitensis* (ovejas, cabras), *B. abortus* (bovinos y bufalinos), *B. suis* (porcinos, liebre, renos y roedores), *B. ovis* (ovejas), *B. neotomae* (roedores), *B. canis* (caninos), *B. ceti* (delfines, marsopas, ballenas), *B. pinnipedialis* (focas), *B. microti* (zorros rojos, roedores de campo) y *B. inopinata* (humanos).

Dentro de la descripción de las especies del género *Brucella*, se utilizaron por primera vez herramientas de caracterización molecular, en combinación con la clásica fenotipificación, que fueron de gran utilidad para la actual descripción de las especies *Brucella microti* y *Brucella inopinata*. Un enfoque similar al que se utilizó para describir *B. microti* como una nueva especie en 2008, que consistió en una batería fenotípica y de análisis moleculares. Esto fue seguido por la descripción de *B. inopinata*, aislado a partir de una infección endógena de un implante de mama de una mujer de 71 años de edad en 2010. *Brucella microti* y *B. inopinata* son fenotípicamente diferentes de las especies de *Brucella* clásicas y, por lo tanto, son a menudo indefinidas cuando se aplican exclusivamente métodos fenotípicos. Ambas especies se caracterizan por el rápido crecimiento y la alta actividad metabólica (Schmoock *et al.*, 2011; Scholz y Vergnaud, 2013; Guzmán *et al.*, 2016).

Ficht (2010) y Scholz y Vergnaud, (2013) refieren que la *Brucella* más recientemente identificada y reconocida es *B. inopinata* (BO1) que es muy distinta fenotípicamente y filogenéticamente con relación a las demás especies reconocidas y su reservorio no ha sido reconocido; Sin embargo, Soares y col. (2015) nombran como reservorio a los humanos. Jiménez y col. (2014) y Tiller y col. (2014), mencionan que recientemente una cepa inusual (BO2) se aisló a partir de una biopsia de pulmón de un paciente humano de 52 años en Australia que tenía Neumonía Crónica Destructiva, la cual muestra estrecha relación fenotípica de acuerdo con los análisis moleculares a *B. inopinata*, lo que quizás representa un posible linaje de *B. inopinata*. Tiller y col. (2014) también indican que los estudios bioquímicos estándar confirman que la cepa inusual (BO2) es miembro del género *Brucella* y la secuencia del gen del rRna16S de longitud completa es 100% idéntica a *B. inopinata* (cepa BO1T). El análisis secuencial adicional de los genes recA, omp2a y omp2b, y el análisis de secuencias de locus múltiples (MLSA) mostró que la cepa BO2 demostró similitud significativa con *B. inopinata* sp, comparado con otras especies de *Brucella*, lo que estableció que las cepas BO2 y BO1T formasen un grupo filogenético distinto, separado de las otras *Brucella* spp.

Por otra parte, siete cepas aisladas en 1964 de tres roedores nativos al norte de Australia, y que anteriormente se reportaron como *B. suis* biovar 3, se han vuelto a investigar para determinar su clasificación exacta, de acuerdo con análisis moleculares realizados a las

siete cepas, concluyendo que son únicas y distintas a las especies conocidas de *Brucella* y que están relacionadas con *B. inopinata* y BO2 (Ficht, 2010; Scholz y Vergnaud, 2013).

Soler y col. (2016) y Guzmán y col. (2016) refieren que la clasificación del género *Brucella* se basa en las características fenotípicas y la especificidad de especie y que recientemente el número de las especies del género *Brucella* ha aumentado, siendo actualmente son: *Brucella melitensis* (cabras), *Brucella suis* (cerdos), *Brucella abortus* (vaca), *Brucella ovis* (oveja), *Brucella canis* (caninos), *Brucella neotomae* (ratas de desierto), *Brucella ceti* (cetaceae), *Brucella pinnipedialis* (pinnípedos) y las especies más recientemente identificadas: *Brucella microti*, *Brucella inopinata* (una infección de implante mamario humano), *Brucella papionis* (mortinato en babuinos) y *Brucella vulpis* (zorros rojos). Al mismo tiempo se ampliaron los huéspedes susceptibles asociados a mamíferos, a los cuales se les adicionaron los anfibios (rana). Esto fue debido al reciente descubrimiento de la cepa B13-0095, aislada de una rana en un Hospital Veterinario en Texas, a la que se identificó erróneamente como *Ochrobactrum anthropi*, y al seguir realizando estudios se llegó a la conclusión que pertenece al grupo de brucelas divergentes dentro de las que se encuentra la cepa BO1 de *Brucella inopinata* y la cepa BO2, las cuales cuentan con características significativas en comparación con las especies de *Brucella* spp clásicas.

Dahouk y col. (2007) y Álvarez y col. (2015a) mencionan que cuatro de las seis especies clásicas son patógenas para los seres humanos, las cuales son: *B. abortus* (transmitida por bovinos y otros Bovidae), *B. melitensis* (de ovinos y caprinos), *B. suis* (principalmente de cerdos) y rara vez *B. canis* (perros).

Acha y Szyfres (2001) refieren que el hombre es susceptible a la infección por *B. melitensis*, *B. suis* (excepto por el biovar 2), *B. abortus* y *B. canis*, sin embargo, no se han comprobado casos humanos por *B. ovis* o *B. neotomae*. La especie más patógena e invasora para el hombre es *B. melitensis*, seguida en orden decreciente por *B. suis*, *B. abortus* y *B. canis*.

2.4 Etiología

La brucelosis es una zoonosis bacteriana de distribución mundial, que limita el desarrollo ganadero y ocasiona enormes pérdidas a la industria pecuaria, y que representa un verdadero riesgo ocupacional para las personas que trabajan o consumen productos crudos provenientes de animales infectados por bacterias del género *Brucella* spp, las cuales son coco-bacilos Gram-negativas, no esporuladas, acapsuladas, anaeróbicas, intracelulares facultativas, inmóviles, carentes de pilis o flagelos, no fermentan los azúcares, y son catalasa y oxidasa positivas. Las bacterias adquieren un color rojo cuando son teñidas por el método de Ziehl-Neelsen. Son resistentes a la desecación y en consecuencia tienen una sobrevivencia en el medio ambiente muy elevada, de 80 días en el suelo y hasta 8 meses en fetos abortados mantenidos en la sombra (Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006; Bounaadja *et al.*, 2009; Seleem *et al.*, 2010; Tae *et al.*, 2011; Coelho *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2015a; Álvarez *et al.*, 2015b).

Algunos investigadores mencionan que las bacterias pertenecientes al género *Brucella*, poseen una envoltura celular característica que consta de una membrana externa (ME), una membrana interna y un espacio periplásmico intermedio. En el periplasma hay proteínas y un gel glucopeptídico denominado peptidoglicano (PG) responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria (Estein, 2006; López y Contreras, 2006). El citoplasma es rico en ADN, ARN y proteínas citosólicas, importantes algunas de ellas desde el punto de vista del diagnóstico. Dentro de los antígenos de la ME de *Brucella* se encuentran las moléculas ya caracterizadas que corresponden a dos grupos: el de lipopolisacáridos (LPS) y el de las proteínas de la membrana externa (OMPs: del inglés “outer membrane proteins”).

Los LPS constan de una parte glucolipídica (lípidos A), que se inserta en la membrana externa y por lo tanto no está expuesta en la superficie, y otra polisacáridica dirigida hacia el exterior; esta última se divide en dos secciones: el núcleo más interno y la cadena O (polisacárido O: PSO), que es la estructura antigénica más expuesta de esta bacteria (Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006).

De acuerdo con el aspecto de las colonias en medio sólido, las especies de *Brucella* se clasifican en “lisas” (*smooth*, S), que siempre tienen la cadena O, dentro de las que se

encuentran las cepas de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae*, y las “rugosas” (*rough*, R), carentes de la cadena O, como son la *B. ovis* y *B. canis*. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de LPS expresado en mayor proporción en la superficie: LPS-S y LPS-R, respectivamente (Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006; Rivers *et al.*, 2006; López y Contreras, 2006).

Dentro de las proteínas de la membrana externa (OMPs) de *Brucella*, se han descrito proteínas de ubicación citoplasmática y proteínas de choque térmico. Las proteínas de la membrana externa han sido clasificadas en tres grupos: el Grupo I que se relaciona con la biosíntesis de la propia envoltura celular y tienen un peso molecular entre 88 a 94 kDa; las del Grupo II, que son equivalente a las porinas de otras bacterias Gram negativas, como Omp 2, OmpC y OmpF y tienen un peso molecular entre 35 a 40 kDa, y las del Grupo III, con peso molecular entre 25 a 27 y 31-34 kDa, estrechamente unidas al LPS por fuerzas hidrofóbicas, y que se encuentran expuestas en la membrana externa, pero son menos accesibles en las cepas lisas que en las rugosas debido al impedimento estérico, ocasionado por las cadenas O del LPS de las primeras (Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015a).

Así mismo, las OMPs de *Brucella* se clasifican en mayores y menores de acuerdo con su abundancia relativa, hallándose ambas intercaladas en la membrana y estrechamente unidas al LPS. Las OMPs mayores fueron identificadas por primera vez, en la década de los 80 en *B. abortus*, en una fracción insoluble en duodecilsulfato de sodio, extraída a partir de la envoltura celular (SDS-I). Dicha fracción contiene dos de las OMPs mayores: una de 25-27 kDa y otra de 36-38 kDa; ambas OMPs fueron identificadas y designadas como grupo 3 y grupo 2, respectivamente. Actualmente, estas proteínas se denominan Omp25 (grupo 3) y Omp2b (grupo 2). Cuando la fracción SDS-I se obtuvo a partir de *B. melitensis* se identificó adicionalmente una proteína de 31-34 kDa, hoy denominada Omp31 y ausente en *B. abortus*. Las OMPs menores son la Omp1 y las lipoproteínas Omp10, Omp16, Omp19 que, a diferencia de las mayores, no se encuentran asociadas al PG. Entre las proteínas minoritarias se ha descrito una lipoproteína de 8 kDa unida en forma covalente al peptidoglicano que posee epítomos comunes con la lipoproteína de especies de *E. coli* (Estein, 2006; Álvarez *et al.*, 2015a).

En las especies rugosas, las OMPs se encuentran bien expuestas mientras que en las lisas los anticuerpos (Ac) no pueden acceder a los epítomos específicos, posiblemente por el impedimento ocasionado por las largas y/o abundantes cadenas del PSO, que es el antígeno (Ag) inmunodominante de la superficie capaz de inducir una respuesta serológica en la mayoría de los animales en contacto con las especies lisas de *Brucella*, además de la estructura antigénica más expuesta y blanco de anticuerpos protectores (Díaz *et al.*, 2000; Estein, 2006).

Durante el crecimiento de las diferentes especies de *Brucella* en los medios de cultivo, pueden realizar mutaciones que afectan la expresión del LPS. Las cepas de *Brucella* lisas son las más patogénicas para su hospedador y su ultra- estructura es semejante a la de algunas enterobacterias (*Yersinia enterocolítica*, *Salmonella iandau*, *Pseudomonas maltophilia* y *Escherichia coli*), aunque presenta ciertas diferencias en las características de ME. La ME de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina a diferencia de la perteneciente a las enterobacterias relacionadas con ella, que es rica en fosfatidiletanolamina. Su componente más abundante y mejor estudiado es el LPS, que se conoce también con el nombre de endotoxina, así como las OMPs que se asocian con los LPS (Díaz *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2005; Estein, 2006).

La bacteria generalmente se localiza en los tejidos retículo endotelial, órganos reproductivos, articulaciones y huesos, donde ocasiona infecciones crónicas en el ganado, caracterizadas por bacteremias recurrentes o persistentes que culminan en el aborto en vacas, ovejas y cabras; además de infectar los órganos reproductivos del macho y causarles lesiones de consideración (Valdespino, 1994; Probert *et al.*, 2004).

2.5 Distribución

Díaz y col. (2000) mencionan que la brucelosis es una zoonosis de distribución mundial. Sin embargo, en algunos países sus programas de control y erradicación han permitido su eliminación total, como es el caso de Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia, o bien reducir su incidencia, como en Japón, Nueva Zelanda, Australia y Alemania.

Seleem y col. (2010) mencionan que la distribución geográfica de la brucelosis cambia constantemente, presentándose nuevos focos emergentes o reemergentes. La

epidemiología de la brucelosis humana ha cambiado en los últimos años debido a diversas razones sanitarias, socioeconómicas y políticas, así como al aumento de los viajes internacionales, lo que ha repercutido en la presentación de nuevos casos de brucelosis en humanos, los cuales se han presentado en particular en Asia Central. Mientras que la situación en algunos países de Oriente Medio está empeorando rápidamente.

En algunos países la brucelosis bovina (*B. abortus*) ha sido erradicada; esto se define como la ausencia de casos reportados durante al menos cinco años. Estos países son Australia, Canadá, Chipre, Dinamarca, Finlandia, Países Bajos, Nueva Zelanda, Noruega, Suecia, Reino Unido.

El Mediterráneo y los países de Europa del Norte, el Este de África, el Mediano Oriente, la India, Asia Central, México, Centro y Sud América, es una zoonosis frecuente ya que en estos países todavía no están libres de brucelosis (Álvarez *et al.*, 2015a; Navarro *et al.*, 2004).

2.6 Transmisión

La vía más importante de transmisión de la brucelosis en el animal es a través de la mucosa oronasal, por ingestión de alimentos contaminados (forrajes, pastos, agua, leche), por inhalación de polvo de las áreas ganaderas con microorganismos que se han contaminado a través de la leche, excreciones del aparato reproductor femenino (fetos, placenta, líquidos fetales o las descargas vaginales después del aborto o de un parto a término, las cuales contienen gran número de células de *Brucella*), que constituyen una fuente de contaminación e infección muy importante. Los rumiantes generalmente no presentan síntomas después de su primer aborto, pudiendo convertirse en portadores crónicos y continuar eliminando *Brucella* en la leche y en las descargas uterinas durante las preñeces posteriores. Los perros también pueden eliminar *B. canis* en las preñeces posteriores, con o sin síntomas. La mayoría de las especies de *Brucella* se encuentran también en el semen. La *Brucella* puede propagarse en fómites, como los alimentos y el agua contaminados. En condiciones de humedad alta, temperaturas bajas y de poca luz solar, estos organismos pueden permanecer viables durante varios meses en el agua, fetos abortados, estiércol, lana, heno, materiales de trabajo y la ropa. La *Brucella* puede

sobrevivir en el medio ambiente, lo que se puede observar en la Tabla 1, y es probable que la infección se transmita por aerosoles (Castro *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2014; Rodríguez, 2005; Rivers *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015a; Carrisoza *et al.*, 2014).

Tabla 1. Supervivencia de *Brucella* spp en el medio ambiente.

Fuentes: Castro *et al.*, 2005., Álvarez *et al.*, 2015 a.

Material	Tiempo de supervivencia
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones de verano	10-30 minutos
Agua a 37°C y pH 7.5	Menos de 1 día
Agua a 8°C y pH 6.5	Más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descargas vaginales mantenidas en hielo	7 meses
Manteca a 8°C	1 a 2 meses
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días

En áreas con alta tasa de *Brucella* en los bovinos es común encontrar caballos con altos títulos aglutinantes. Así mismo, se ha aislado *B. abortus* y *B. suis* en caballos, los cuales adquieren la infección de los bovinos y los porcinos. Sin embargo, se ha podido comprobar la transmisión de los caballos a los bovinos (Acha, y Szyfres, 2001).

Coelho y col. (2014) refieren que existen reportes de que del contenido del estómago de insectos hematófagos, como *Stomoxys calcitrans*, *Ornithodoros* y *Musca autumnalis* (mosca de los establos) han sido aisladas brúcelas; estos dípteros están en contacto con el ganado y las hembras de estas moscas depositan sus huevos en las heces y se alimentan de sangre, secreción lagrimal y secreciones placentarias. Se piensa que estos insectos, así como las garrapatas, contribuyen en la transmisión de la brucelosis.

Rodríguez y col. (2005) refieren la posibilidad de que la transmisión de la brucelosis del cerdo a los bovinos sea positiva, aunque hay algunos autores que la ponen en duda; así

mismo, mencionan que tampoco es imposible la infección de bovinos por los équidos. Un papel muy importante en la transmisión es la que desempeñan los pequeños roedores según diversos autores, por ejemplo, las ratas cuando ingieren placentas infectadas. Así mismo, en un estudio realizado con el objetivo de conocer la importancia del perro como posible vector en la propagación de la brucelosis, se aislaron *Brucella suis* del testículo de un perro, resaltando la importancia epizootiológica que reviste esta especie animal como posible transmisor de la brucelosis en las explotaciones pecuarias.

Navarro y col. (2004) mencionan que la *Brucella melitensis* es la especie más frecuentemente reportada en los casos humanos, y también la más aislada de animales en los países endémicos; se asocia a cabras y borregos, aunque otros animales pueden ser susceptibles, entre ellos perros, vacas y camellos. En algunos países, particularmente del Medio Oriente y en España, se han reportado brotes en ganado vacuno por *B. melitensis*. En este sentido, es importante tipificar la especie de *Brucella* causante de los brotes en animales para aplicar las medidas de control más adecuadas.

La transmisión de la brucelosis en el humano es a través del contacto directo con secreciones de animales infectados y por el consumo productos y subproductos de origen animal contaminados (queso y leche no pasteurizada, carne cruda y vísceras), lo cual fue reconocido en la primera reunión interamericana de brucelosis, donde se mencionó que la movilización de lácteos hacia zonas urbanas, como parte de la comercialización, ha contribuido en buena medida a la diseminación de la enfermedad, sin importar qué tan alejados están los sitios de las zonas endémicas. Así mismo, la transmisión puede ser también a través de transfusiones sanguíneas, donación de órganos, trasplante de tejidos, así como también por exposición ocupacional. Los trabajadores de actividades pecuarias y rastros, carniceros, laboratoristas y médicos veterinarios, y otros que están en contacto con animales vivos, cadáveres y subproductos, son la población de mayor riesgo (Fernández y Gómez, 2009; Flores Castro, 2010; López Merino *et al.*, 1992; Méndez *et al.*, 2015; Rivers *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2015a).

Seleem y col. (2010) y Fernández y Gómez (2009) mencionan que la transmisión de la brucelosis puede ser a través de las madres que amamantan a sus hijos y por vía sexual, así como por transfusión de sangre o trasplante de algún tejido (Martínez y Martínez, 2002; Álvarez *et al.*, 2015a).

Rivers y col. (2006), Fernández y Gómez (2009) y Seleem y col. (2010) refieren que la transición de persona a persona es inusual e incierta. Por su parte, Soares y col. (2015) refieren que es probable, de acuerdo con un reporte en el cual lograron aislar la bacteria de la esposa de un microbiólogo estadounidense infectado, la vía sexual como posible fuente de infección. Así mismo, en un estudio de caso en Israel, se demostró la transmisión entre humanos asociando a la contaminación del médico por el recién nacido durante una reanimación, en la que el profesional contrajo *B. melitensis* tras el contacto con el paciente, mientras que los demás miembros del equipo involucrados resultaron negativos a la serología de la bacteria.

Acha y Szyfres (2001) refieren algunos casos de transmisión de brucelosis interhumana; uno de ellos fue en Kuwait por la transmisión de *B. melitensis* a una niña de 30 días de nacida, mediante la leche materna. La madre había presentado un cuadro de fiebre, malestar y artralgias dos semanas antes de enfermarse la niña. Posteriormente de la sangre de la madre y de la niña se aisló *B. melitensis*, biovar 1. Otro caso se presentó en Estados Unidos en el laboratorio de un hospital donde ocho microbiólogos estuvieron expuestos a la dispersión accidental de un espécimen clínico en aerosol que contenía *Brucella*, y en cinco de ellos se aisló *B. melitensis* biovar 3. Así mismo, un caso en Israel en el que se presentó una probable transmisión durante el parto. La madre tuvo fiebre el primer día *postpartum* y se identificó *B. melitensis* biovar 3 en un cultivo de la región cervical. Los cultivos de la región cervical y los hemocultivos continuaron siendo positivos y, aunque la niña estaba asintomática, se obtuvo un hemocultivo positivo de la misma biovariedad, obteniéndose títulos aglutinantes de 1:100, y la esplenomegalia fue la única anormalidad que se encontró en la niña a los 13 días de nacida. También se ha descrito transmisión interhumana, por transfusión o trasplante de médula ósea.

Acha y Szyfres (2001) refieren que se han presentado casos en humanos por accidente con la vacuna *B. abortus* cepa 19 entre vacunadores y veterinarios, los cuales se han pinchado un dedo con la jeringa o han recibido aerosol en su ojo. Los mismos después de un periodo de incubación de 8 a 30 días, desarrollan la brucelosis, presentando un curso más corto y benigno que las cepas de campo. Sin embargo, existen casos que requieren hospitalización. Así mismo, existen reportes de infecciones en humanos por cepas vacúnales por *B. melitensis* (rev.1) en vacunadores: de seis que se inocularon

accidentalmente cuatro de ellos desarrollaron la enfermedad en forma similar y tras ser hospitalizados se recuperaron después del tratamiento.

Igualmente, Lawinsky y col., (2010) mencionan que Meyer y Eddie publicaron el resultado de una encuesta en 1941, donde se detectaron 74 casos de brucelosis asociado a la manipulación en el laboratorio mediante aerosol. Así mismo, refieren que se clasificó el género *Brucella* spp en la categoría B de acuerdo con los Centros para la Prevención y Control de Enfermedad de las siglas en inglés (CDC). Como segunda prioridad, como un agente potencial para el bioterrorismo (arma biológica). Esto debido a las dosis bajas necesarias para transmitir la enfermedad y a su prolongada patogenicidad.

La susceptibilidad de los humanos a la bacteria depende del estatus inmunológico, la ruta de infección, del tamaño del inóculo, y de la virulencia de la bacteria (Navarro *et al.*, 2004).

2.7 Características de la enfermedad

2.7.1 En el ganado

Las especies zootécnicas más afectadas por *Brucella* son bovinos, cabras y cerdos, en los que la expresión clínica puede ser breve y autolimitada, caracterizada por una fase de bacteremia aguda o grave y prolongada acompañada de toxemia, seguida por una fase crónica que puede durar años (Córdoba *et al.*, 2017).

La infección cruzada puede también generar otra problemática, debido a que se ha reportado que el ganado vacuno puede infectarse con *B. melitensis*; en ese caso, el manejo del ganado requiere un cuidado especial. La infección con *Brucella* en los machos genera inflamación de los testículos y la bacteria se almacena en sus vesículas seminales, el ámpula y el epidídimo. En el caso de las hembras preñadas, les provoca aborto debido a que la bacteria se localiza en la placenta, donde se produce una placentitis grave con infección del feto, ocasionando así el aborto. En el caso de las vacas lecheras, la producción de la leche se ve disminuida; además se ha demostrado que un gran porcentaje de vacas infectadas libera a la bacteria a través de la leche, ocasionando grandes pérdidas económicas en la ganadería, principalmente por los abortos, la retención placentaria, la

disminución de la producción lechera y el nacimiento de becerros débiles y con bajo peso al nacer (Guzmán *et al.*, 2016).

En el ganado, la *Brucella* coloniza las ubres y es expulsada con la leche; además, aunque en las gestaciones posteriores al primer aborto las hembras paren normalmente, siguen excretando bacterias al medio ambiente, las cuales pueden vivir durante varias semanas, en especial si es un lugar frío o húmedo; en tanto las pérdidas de productividad causadas por esta enfermedad pueden tener gran importancia, principalmente debido al descenso en la producción de leche a causa de los abortos de las vacas, repetición de servicios, que eleva los costos de la asistencia técnica y tratamientos infectivos, y por último porque puede producir en la mayoría de los casos la eliminación de toros y vacas infectados (García *et al.*, 2014; Ávila y Cruz, 2009).

2.7.2 En humanos

Soares y col. (2015) refieren que la brucelosis en los seres humanos es muy diversa, y que se puede presentar en tres formas: aguda, asintomática (o subclínica), producida por cepas de baja virulencia, la cual cursa con síntomas poco aparentes o muy leves acompañados de fatiga en general, que se resuelven sin ningún tratamiento, y posteriormente evoluciona a la forma crónica. Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en considerar solo las fases aguda y crónica. La aguda se caracteriza por temperatura normal hasta 40°C continua o intermitente, de duración variada, (la fiebre que se presenta en el 95 a 98% de los casos), escalofríos (69-85%), diaforesis nocturna (85-88%), fatiga, acompañada por malestar generalizado y en menor porcentaje, sudores profusos, cefalea, debilidad, dolores generalizados, anorexia constipación, estado de ánimo depresivo, pérdida de peso, además de trastornos reproductivos como orquitis y disfunción eréctil, impotencia sexual en los hombres, e infertilidad y abortos en las mujeres. Puede evolucionar a la forma crónica, la cual presentara complicaciones y puede comprometer cualquier órgano o tejido del cuerpo. Entre las lesiones más comunes están las osteoarticulares, gastrointestinales, hepatobiliares, respiratorias, genitourinarias, cardiovasculares, neurológicas, cutáneas y oftálmicas (Ortega, 1997; Probert y col., 2004; López y Contreras, 2006; Rivers y col., 2006). Swai y Schoonman (2009) mencionan que en ocasiones se observa esplenomegalia, hepatomegalia, tos y dolor de pecho de origen pleural y los síntomas de la presentación congénita son variables, nacen prematuros,

mientras que otros nacen a término y los síntomas frecuentes son bajo peso al nacer, fiebre, falla en el crecimiento, ictericia, hepatomegalia y esplenomegalia. Algunos niños recién nacidos que la padecen tienen dificultad respiratoria o compromiso respiratorio grave, hipotensión, vómito y otros signos de septicemia. Puede afectar a cualquier grupo de edad produciendo periodos de postración, elevados costos en los tratamientos de la brucelosis en humanos, lo cual tiene un gran impacto en la economía familiar y nacional, afectando primordialmente a la población económicamente activa, o sea el grupo de edades comprendido entre los 15 y 44 años, seguido por el grupo de 5 a 14 años, y la menor frecuencia corresponde a los menores de un año. La duración de la enfermedad puede variar desde pocas semanas o meses hasta años. Aunque los anticuerpos juegan un papel en la resistencia a la infección, el principal mecanismo de eliminación de la bacteria es a través de una respuesta inmunológica celular (Ruiz Castañeda, 1986; López y Merino, 1991; Leal-Klevezas *et al.*, 1999d; Acha y Szyfres, 2001; Navarro *et al.*, 2004; Martínez y Martínez, 2002).

Después de adquirir la infección por cualquier vía las bacterias de *Brucella*, si no son eliminadas, llegan por vía linfática a los ganglios linfáticos más cercanos a la vía de entrada, pudiendo de allí invadir el torrente sanguíneo donde son fagocitadas por los polimorfonucleares (PMN) y macrófagos circulantes, y transportados a diferentes órganos donde pueden sobrevivir y multiplicarse dentro de las vacuolas de los fagocitos circulantes o tisulares. Si las bacterias no son destruidas, pueden sobrevivir por largo tiempo en el interior de las células fagocíticas. Los ganglios linfáticos responden a la agresión por medio de una hiperplasia reticuloendotelial y linfática, que puede tardar varias semanas en producirse y persistir durante meses. Así mismo, en los fagosomas de los macrófagos, las *Brucellas* sobreviven y se multiplican, inhibiendo la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio. En células fagocíticas no profesionales, como fibroblastos y células del mesénquima, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y la activación de una serie de pequeñas GTPasas, tendiendo a localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Castro *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006).

2.8 Diagnóstico

Para el diagnóstico bacteriológico de *Brucella* a partir del animal vivo, las muestras más recomendables son las secreciones vaginales, la leche de las hembras o el espermatozoides de los machos. El momento óptimo del muestreo de las secreciones vaginales y de la leche es durante el parto o el aborto o poco después de estos, cuando el número mayor de bacterias excretadas suele ser máximo. El aislamiento también puede realizarse a partir de la placenta o de fetos abortados a partir de hígado, bazo, pulmón y contenido gástrico. En el caso de *B. ovis*, *B. suis* y *B. canis* puede aislarse a través de hisopos vaginales y de la leche (Díaz *et al.*, 2000).

En el animal sacrificado, los órganos más adecuados tras la necropsia para el diagnóstico bacteriológico son: los nódulos linfáticos (supra mamarios, iliacos, escapulares, pre femorales, parotídeos, submaxilares y retro faríngeos, así como del bazo, la glándula mamaria y el útero. En el caso de carneros, a partir de los nódulos linfáticos mencionados y también de los epidídimos y glándulas sexuales accesorias. Tras la necropsia estos órganos se homogenizan en solución salina fisiológica estéril (SFE 0,85% Na Cl). Para la detección de *Brucella* pueden utilizarse una serie de pruebas de laboratorio tanto presuntivas como confirmativas. La utilización de muestras correctamente tomadas y la existencia de medios selectivos permiten realizar con éxito el diagnóstico de la gran mayoría de los casos (Díaz *et al.*, 2000).

Castro y col. (2005) mencionan que no existe una prueba única que permita la identificación de *Brucella*, normalmente se necesita una combinación de las características de crecimiento, métodos serológicos y bacteriológicos, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico puede basarse en métodos serológicos. OIE (2004) y Rentería y col. (2005) recomiendan que no se deben de tomar en cuenta solamente los métodos serológicos, porque solamente aportan resultados presuntivos.

Debido a que la brucelosis humana presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas e inespecíficas, lo que dificulta diagnosticarla clínicamente y que pueda llegar a confundirse con otras enfermedades febriles; en tal caso el tratamiento será inadecuado, lo que repercutiría en complicaciones y recaídas con una alta tasa de letalidad. El diagnóstico preciso y rápido es muy importante, por lo que se considera el aislamiento del patógeno como la prueba de oro en el diagnóstico. Sin embargo, *Brucella* es un

microorganismo de lento crecimiento y el porcentaje de aislamiento varía entre 40 y 70%, por lo que las pruebas serológicas son las más usadas en el establecimiento del diagnóstico de brucelosis en humanos. En los últimos años, la reacción de polimerasa en cadena (PCR) también se ha utilizado en el diagnóstico de brucelosis en diferentes muestras clínicas, utilizando diferentes genes específicos para la identificación de *Brucella* a nivel de género y especie (Navarro *et al.*, 2004; Seleem *et al.*, 2010).

El aislamiento de *Brucella* a partir de muestras de médula ósea, sangre, ganglios linfáticos o líquido cefalorraquídeo sigue siendo la prueba de oro para el diagnóstico de la brucelosis en los seres humanos. Sin embargo, el cultivo no puede ser utilizado como una prueba única de detección. A pesar de su alta especificidad, el cultivo de *Brucella* tiene varios inconvenientes, tales como lento crecimiento y escasa sensibilidad. La baja sensibilidad para su aislamiento depende de muchos factores, incluyendo: las prácticas individuales del laboratorio, la cantidad de patógenos en las muestras clínicas, la etapa de la infección, el uso de antibióticos antes del diagnóstico. La sensibilidad de la detección varía de 15% a 70% de los pacientes con infección aguda y es incluso menor en los pacientes con infección crónica (Seleem *et al.*, 2010).

2.8.1 Métodos de Cultivo y Aislamiento

Las características de crecimiento de las bacterias del género *Brucella* son aeróbicas, aunque algunas cepas requieren una atmósfera que contenga entre un 5 y un 10% de dióxido de carbono para su crecimiento, generalmente en el primer aislado. El pH óptimo de crecimiento varía de 6,6 a 7,4, y la temperatura ideal entre 36-38°C Sin embargo pueden crecer en un rango de 20°C y los 40°C (Coelho., 2014).

Martínez y Martínez (2002) y la OIE (2004) mencionan que normalmente el aislamiento y cultivo de *Brucella* se realiza en medios que contienen peptonas o triptonas a los que se les adiciona extracto de levaduras, suero o sangre para favorecer el crecimiento. Existen medios comerciales en forma deshidratada con estas características (agar soya tripticasa (TSA), agar suero dextrosa (SDA) y el agar glicerol-dextrosa. El medio preferido para la observación de la morfología de las colonias es SDA. Las muestras de sangre, leche, médula ósea y líquido cefalorraquídeo y otros líquidos del cuerpo donde se aconseja un cultivo de enriquecimiento de preferencia se incuban en botellas con medio doble (Ruiz

Castañeda modificado) no selectivo, este medio se emplea porque *Brucella* tiende a disociarse e interfiere con la biotipificación. A las 24 horas de incubación se empieza a visualizar el crecimiento; se resiembra por duplicado en placas de agar sangre al 10%, en TSA con extracto de levaduras al 0,5% y en agar Mac Conkey. Una serie se incuba en CO₂ y la otra en atmósfera normal a 36°C. *Brucella* se desarrolla en el transcurso de 4 o 5 días, aunque en algunos casos el crecimiento es tardío, de hasta 6 semanas (OIE, 2004; Castro *et al.*, 2005).

2.8.2 Medios Selectivos e Identificación

2.8.3 Medios Selectivos

Martínez y col. (2009) mencionan que existe una gran variedad de medios selectivos que se utilizan para el aislamiento de *Brucella* spp; dentro de los más comúnmente utilizados se encuentran el medio de Farrell y Thayer-Martin.

Coelho y col. (2014), Díaz y col. (2000) y Martínez y col. (2009) mencionan que el medio de cultivo de Farrell es el medio selectivo más sensible y utilizado por su poder de selección y por su capacidad de asegurar el crecimiento de las cepas más exigentes. El medio de Farrell es transparente, lo que facilita la visualización de la morfología de las colonias tras iluminación oblicua. Sin embargo, debido a la concentración de bacitracina y ácido nalidixico que se encuentran en el medio, inhiben el crecimiento de algunas cepas de *B. melitensis*, *B. abortus*, y de *B. ovis*. Debido a lo anterior, se recomienda sembrar las muestras en otros medios como el Thayer Martin modificado o el TSA, los cuales son de menor sensibilidad y pueden ser menos tóxicos para algunas cepas de *Brucella* spp.

El medio Farrell es un medio base enriquecido con glucosa que se encuentra comercialmente con el nombre *Brucella* Médium base (Oxoid ref CM 169), al que se le agrega un 5% de suero estéril de caballo o ternera (SDA). Se le añaden seis antibióticos para evitar el crecimiento de organismos diferentes a *Brucella* en las siguientes cantidades de antibióticos por un litro y medio de agua: sulfato de ploimixina B (5,000 unidades = 5 mg); bacitracina (25,000 unidades = 25 mg); natamicina (50 mg); ácido nalidíxico (5 mg); nistatina (100,000 unidades); vancomicina (20 mg). También se pueden utilizar todos los

medios basales mencionados como TSA, agar glicerol-dextrosa y SDA, a los cuales se les añaden los antibióticos mencionados.

El medio Thayer Martin es un medio semiselectivo, ya que tiende a contaminarse con más frecuencia que el de Farrell. Es un medio no transparente (achocolatado) lo que dificulta la visualización de la morfología de las colonias características por medio de iluminación oblicua. Este medio permite el aislamiento de *B. ovis* y algunas *B. melitensis* que son inhibidas por el medio Farrell. El Thayer Martin modificado se prepara mezclando volúmenes iguales de medio de cultivo al doble de concentración y una solución de hemoglobina al 2% con los siguientes antibióticos en medio litro de medio: 3 mg vancomicina, 7,5 mg colistina, 100,000 UI. Nistatina, 10 mg nitrofurantoína; los tres antibióticos se pueden solubilizar en 20 ml de una mezcla 1:1 de metanol y agua (Martínez y Martínez, 2002; OIE., 2004.; Díaz et al., 2000; Martínez et al., 2009).

2.8.4 Medios de Identificación

La identificación de los microorganismos del género *Brucella* se puede realizar mediante una combinación de las siguientes pruebas: morfología celular y tinción de Gram o de Stamp, propiedades de crecimiento, pruebas de ureasa, oxidasa y catalasa, y la prueba de aglutinación en porta con un suero policlonal anti-*Brucella* (OIE, 2004).

Las bacterias del género *Brucella* cuentan con la siguiente morfología microscópica: son bacilos cortos pequeños (de 0,5 µm de ancho por 0,5-1,5 µm de longitud), Gram negativos. Con la tinción de Ziehl-Neelsen modificada se tiñen de color rojo y se observa la misma morfología, mientras que otras bacterias se verán verdes. En medio TSA, la morfología de las colonias de las cepas lisas (S) producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidos y de coloración ámbar. A la luz reflejada son brillantes, ligeramente opalescentes y de color gris azulado (Martínez y Martínez, 2002; OIE, 2004).

En medios de cultivo específicos, las colonias de *Brucella* pueden presentar variaciones durante el crecimiento, especialmente en los subcultivos son visibles en 48 horas. Transcurridos 4 días, las colonias son redondas, de 1 a 2 mm de diámetro, lisas (S) translúcidas de color pálido, o convexas y de color perla blanco. Posteriormente se

vuelven mayores y ligeramente más oscuras. Las formas rugosas (R) se presentan como colonias más grandes en forma de S, con una superficie más granulosa o viscosa. Cambian de color blanco mate o blanco amarillo a marrón, a la luz reflexiva o tramitada. La comprobación se realiza con tinción de cristal violeta, donde las colonias rugosas aparecen rojas y las lisas de color amarillo pálido (OIE, 2004; Coelho *et al.*, 2014; CFSPH, 2009). En gelosa sangre no se produce hemólisis y en agar Mac Conkey crecen poco y no fermentan la lactosa. Las cepas rugosas (R) en el medio de cultivo TSA producen colonias semejantes en la forma, pero varían considerablemente en tamaño, color, consistencia y textura. En las cajas con medio TSA se puede determinar la producción de catalasa y oxidasa, para las cuales las brúcelas son positivas. Inmediatamente se procede a aglutinar a las colonias sospechosas con suero polivalente anti *Brucella*. Se recomienda realizar la suspensión de brúcelas en solución salina fenolada al 1,0%, extremando las precauciones. Si hay aglutinación, muy probablemente se trate de bacterias del género *Brucella*. Para identificar la especie y el biovar se procede a efectuar las siguientes pruebas:

- Requerimiento de CO₂. Inmediatamente después del primer aislamiento, la cepa en estudio se siembra por triplicado en tubos con agar soya tripticasa y extracto de levaduras inclinados. Se incuban dos tubos en atmósfera de CO₂ y el otro en atmósfera normal, a 36°C por 48 h antes de que se desarrollen mutantes independientes de CO₂. Con el crecimiento de uno de los tubos, se prepara una suspensión de bacterias para inocular el resto de medios de cultivo:
- Con el Medio de Kligler. Ausencia de ácido y gas a partir de glucosa y lactosa.
- Con el Medio de urea de Christensen.- Se mide el tiempo en que cambia el medio a rojo, debido a la producción de ureasa. *Brucella suis* produce la mayor cantidad de ureasa y un tiempo muy corto comparada con las demás especies que producen menor cantidad.
- Con el tubo inclinado con agar soya tripticasa, con una tira de papel filtro impregnado con acetato de plomo sujetado por la contratapa o el tapón de algodón para observar la aparición de H₂S por el ennegrecimiento de la tira de papel filtro.
- Medio Citrato de Simmons (SIM). - No emplea este substrato como fuente de carbono, por lo que no se modifica el color verde y se observa la inmovilidad de las brúcelas y la ausencia de indol y H₂S.

- Susceptibilidad a bacteriófagos. Sobre una capa de *Brucella* sembrada en forma masiva, se coloca una gota pequeña de cada uno de los bacteriófagos Tbilisi (Tb), Weybridge (Wy) y Berkeley (Bk), se observa la existencia de lisis en los sitios en donde se colocaron las gotas.
- Aglutinación con sueros monoespecíficos. Se emplean el suero monovalente A y en monovalente M. El R se utiliza sólo cuando se sospecha de *B. canis* o de otra especie rugosa natural. Al realizar esta prueba es muy importante tomar en consideración lo siguiente: *B. abortus* puede contener antígeno A (biovar 1, 2, 3 y 6) o antígeno M (biovars 4, 5 y 9) en forma de antígenos dominantes o ambos antígenos A y M (biotipo 7) en forma igualmente dominante. *B. suis* puede tener antígeno A (biotipos 1,2 y 3) como antígeno dominante o ambos A y M (biotipo 4). *B. melitensis* puede tener antígeno M (biotipo 1) o antígeno A (biotipo 2) como antígenos dominantes o ambos A y M (biotipo 3). Por consiguiente, cualquier cepa que aglutine con suero mono específico M, no es necesariamente *B. melitensis*; éste es un error que frecuentemente se comete, por desconocer la composición antigénica de los diferentes biovars de *Brucella* (Martínez y Martínez, 2002).

2.9 Métodos de Análisis Molecular (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es una de las herramientas tecnológicas más innovadoras para el estudio de los ácidos nucleicos. Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo y fáciles de analizar. Es un método adicional para la detección e identificación de las especies del género *Brucella*. Las técnicas de PCR son Combinada, Tiempo Real, o Múltiple, las cuales consisten en detectar la presencia de Acido Desoxirribonucleico (ADN) brucélico de una muestra. Frente al diagnóstico serológico poseen las ventajas de ser más rápida, y de tener menor peligrosidad, mayor sensibilidad y mayor especificidad (Coelho *et al.*, 2014; OIE., 2004; Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Todas las bacterias del género *Brucella*, en su ADN, tienen un contenido de bases homogéneo de entre un 55% y un 58% de moles de guanina y citosina. En el genoma no existen plasmídeos ni flagelos y no se verifican evidencias de transferencia de material genético *in vivo*, pudiendo así mantener una amplia gama de plásmidos del hospedador (Coelho *et al.*, 2014).

La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si se utiliza como sustrato ADN genómico, entonces típicamente se habla de una PCR, pero sí se utiliza ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc. Este método fue copiado de los retrovirus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de ARN en ADN y duplicarse en millones de partículas virales (Mullis., 1990, Herschhom y Hizi, 2010). El ADNc se utiliza cuando se analiza la expresión del ARNm de algún gen de interés (Watson y Crick, 1953).

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, los oligonucleótidos o “cebadores”, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si la amplificación de la secuencia del blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones, son analizados en geles de agarosa para confirmar la amplificación (Asuar, 2007).

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación. Para entrar en contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está formada por tres componentes principales que varían en cantidad y orden o secuencia, dependiendo del tipo de organismo: un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada que puede ser adenina, timina, guanina o citosina y que son complementarias con la base de la otra cadena (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

La complementariedad entre las bases está dada por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, generando estabilidad a la doble hélice. La carga eléctrica del ADN es negativa y está dada por los grupos fosfatos. En la PCR, el templado consiste en la separación de las cadenas de ADN, que funcionan como molde para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés (Tamay de Dios, *et al.*, 2013; Watson y Crick, 1953).

El ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima utilizada con más frecuencia se llama Taq ADN polimerasa (Saiki y col., 1988). Fue descubierta de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus* (Taq), la cual se encuentra en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otros ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable. También hay otras enzimas que se

utilizan, como la (Tli) o también llamada (Vent), obtenida de la bacteria *Thermococcus litoralis* (Cariello y col., 1991). Casi todas las enzimas que se venden comercialmente son eficientes y generalmente cuando fallan lo hacen por una manipulación incorrecta del usuario (Bolívar, 2004).

Los cebadores son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser mayor del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas, existe la posibilidad de la formación de dímeros de cebadores, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercutiría en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de cebadores las que se utilizan en la PCR, una denominada «forward» o sentido y otra «reward» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'- 3' (como sucede endógenamente). Con la finalidad de garantizar la formación de un complejo estable entre el templado y los cebadores, hoy en día existen programas informáticos para diseñar cebadores con alta especificidad, por lo que se evita la formación de productos inesperados. Incluso, hay laboratorios de biología molecular que se dedican a diseñarlos, sintetizarlos y validarlos para garantizar su especificidad, facilitándole el trabajo al usuario que sólo elige el de su interés y los adquiere (Cortázar y Rincón, 2004).

Los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) son los ladrillos o bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que contribuyen a la especificidad de la reacción, por ello es importante que su concentración sea la adecuada ya que de lo contrario pueden afectar la función de la Taq polimerasa. Normalmente, se utilizan a una concentración que oscila entre 0,2 a 1,0 mM. El buffer es la solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCl (pH = 8) cuya concentración final de trabajo debe ser 1X (1%). También se usan otros buffers de composición distinta que son fácilmente comprados en el mercado (Velázquez *et al.*, 2014).

El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción, por eso se debe tener una concentración adecuada para que no afecte el rendimiento de la Taq

polimerasa; regularmente su concentración oscila entre 0,5 y 2,5 mM. En ocasiones ya viene incluido en el buffer, pero en otras se le tiene que agregar. El agua es el disolvente en la reacción y se usa en su forma destilada libre de nucleasas, enzimas que degradan a los ácidos nucleicos (Bolívar, 2004; Cortázar y Rincón, 2004).

Es necesario recordar que cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. La desnaturalización es la etapa, en que las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95°C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Además, depende de la velocidad en la que el termociclador aumenta la temperatura, esto varía de acuerdo con el modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que servirán como templado para el siguiente paso (Álvarez, 2015a).

En la hibridación, los cebadores se alinean al extremo 3' del templado previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria. Para que se forme el complejo templado cebadores, es importante que la temperatura de hibridación o temperatura melting (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60°C. Si el diseño de los cebadores es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente.

En la extensión, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-cebadores y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; se agregan dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador (Cabrera y Valladares, 2016).

La Electroforesis en Campo Pulsante es un método ideado por Schwartz y Cantor en 1984. En el que se utiliza corriente eléctrica con la finalidad de separar biomoléculas según su tamaño y la carga eléctrica. En este método, el ADN viaja a través de un gel de agarosa concentrado, bajo la influencia de dos campos eléctricos. Los dos ángulos de los campos

eléctricos se encuentran cerca a la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad de campo y cambian de manera alterna (pulsos). Lo que permite la diferenciación entre varias especies de *Brucella*. Hasta la fecha este método ha tenido una gran aceptación, así como una amplia gama de aplicaciones (Izquierdo, 2007; Ospina y Hernández, 2015).

2.10 Pruebas Serológicas

Ninguna prueba serológica aislada es adecuada en todas y cada una de las situaciones epidemiológicas, presentando limitaciones en el análisis de animales individuales. La prueba de suero aglutinación lenta en tubo (SAT) se considera inadecuada a efectos del comercio internacional. La prueba de fijación de complemento (FC) es más específica que la SAT para el diagnóstico y además posee un sistema estandarizado de unidades.

Las características diagnósticas de algunos inmuno ensayos (ELISAs) y la prueba de fluorescencia polarizada (FPA) son similares o superiores a la FC y, como son más fáciles de realizar técnicamente y más consistentes, es preferible su utilización. Para el control de la brucelosis a nivel nacional o local, son adecuadas para el análisis las pruebas con antígeno tamponado de *Brucella*, es decir, la prueba con rosa de bengala (RBT) y la prueba de aglutinación tamponada en placa (BPAT), así como ELISA y FPA. Las reacciones positivas deben volverse a probar utilizando una estrategia confirmativa adecuada (Swai y Schoonman, 2009).

2.11 Pruebas Complementarias

2.11.1 Prueba Cutánea de la Brucelina

Es una prueba en la que se utilizan los antígenos citoplasmáticos de *Brucella* spp (Brucelina) los cuales se utilizan para el diagnóstico de la brucelosis ovina y caprina. La brucelina más importante utilizada en la actualidad es "brucelina INRA", preparado a partir de la cepa B-115 de *B. melitensis*. Está formada por proteínas monosacáridos, y el alérgeno F (que consiste en un extracto celular de fracciones proteicas de bajo peso molecular, polipéptidos, aminoácidos y polisacáridos), desarrollado por el Instituto Veterinario Central de Praga (Coelho *et al.*, 2014).

Una prueba inmunológica alternativa es la prueba cutánea de la brucelina, que puede utilizarse para analizar rebaños no vacunados siempre que se emplee una preparación antigénica purificada (libre de LPS) y estandarizada (por ejemplo, brucelina INRA) Esta prueba tiene una alta especificidad, de modo que los animales sin vacunar que son serológicamente negativos y reaccionan positivamente a la prueba de la brucelina deben considerarse animales infectados (Poullot *et al.*, 1997; OIE, 2004; Coelho *et al.*, 2014).

2.11.2 Prueba de Aglutinación del Suero (SAT)

Aunque no se considera una prueba obligada o alternativa, la SAT se ha utilizado con eficacia durante muchos años en programas de vigilancia y control de la brucelosis bovina. Su especificidad mejora notablemente si se añade EDTA al antígeno. Se considera una prueba confiable por su simpleza y porque presenta un alto grado de correlación con la prueba Rosa de bengala (RB), y permite determinar la cantidad de aglutininas totales (IgM, IgG, e IgA) anti *Brucella* en suero, líquido cefalorraquídeo, y otros fluidos corporales (Poullot *et al.*, 1997; Martínez y Martínez, 2002).

2.11.3 Prueba del Anillo de Leche (Prueba de Bang)

Un medio eficaz para detectar la presencia de anticuerpos de vacas lecheras infectadas de *Brucella* consiste en probar la leche de los tanques de almacenamiento de leche colectada durante la ordeña. De estas fuentes se puede obtener leche de forma más barata y frecuente que las muestras de sangre, y habitualmente están disponibles en las centrales lecheras. Es una prueba muy sensible, donde el antígeno se une con el anticuerpo (si está presente) formando un complejo junto con los glóbulos de grasa que ascienden por efecto del calor y forman una capa de crema coloreada de azul oscuro (anillo de color azul). Es un método que no proporciona un diagnóstico definitivo, pero que puede brindar información general sobre la brucelosis en una determinada área. Cuando se obtiene un resultado positivo, todas las vacas que aportan leche deben probarse individualmente a partir de muestras de sangre (Díaz *et al.*, 2000; OIE, 2004).

2.12 Pruebas más utilizadas en el diagnóstico

Se considera que el método más confiable para el diagnóstico de una enfermedad infecciosa se basa en el aislamiento e identificación del agente etiológico. En el caso de *Brucella*, estos procedimientos son lentos (de una a cuatro semanas), tediosos, poco exitosos (Ruiz Castañeda, 1986; Probert y col., 2004) y por su contagiosidad, es de gran riesgo para la salud de los técnicos encargados del estudio. Por estas razones, el examen bacteriológico no siempre es practicable, lo que hace que el diagnóstico se realice generalmente por métodos serológicos rápidos y relativamente fáciles de aplicar (Ariza *et al.*, 1992).

Para la detección de *Brucella* se utilizan generalmente la prueba de Rosa de Bengala (RB), el método de fijación de complemento (FC), la aglutinación estándar en tubo, la prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol y la prueba de Coombs (Hess y Roepke, 1951; Byrd *et al.*, 1979; Huddleson y Abell, 1982; Alton *et al.*, 1998; Perry y Bundle, 1990; Ariza, 1992; Ariza *et al.*, 1992).

Los métodos serológicos, además de una insuficiente sensibilidad, también presentan problemas de especificidad, ya que con frecuencia ocurren reacciones cruzadas o aparecen falsos positivos, y es difícil detectar infecciones tempranas o latentes y prácticamente imposible diferenciar entre los anticuerpos de un animal enfermo y uno vacunado (Hess y Roepke, 1951; Ariza, 1992).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido incorporada en la detección de *Brucella* a nivel de género, con la utilización de diversas secuencias como blanco: entre ellos, el gen de la proteína de 43 kDa de membrana externa de *Brucella abortus* (Fekete y col., 1990) y el gen que codifica el ARN ribosomal 16S de *B. abortus* (Herman y de Ridder., 1992) También se ha utilizado la metodología desarrollada por Kulakov *et al.*, (1992).

Dos protocolos de PCR para *Brucella* fueron desarrollados con el empleo de la secuencia del gen omp2, que codifica una proteína de la membrana externa del patógeno (Martínez *et al.*, 1993; Leal-Klevezas *et al.*, 1995a).

Las técnicas empleadas en estos protocolos son las más sensibles que se han reportado para la detección de *Brucella* spp. Los análisis genéticos por PCR con la utilización de los cebadores mencionados, han permitido amplificar secuencias de *Brucella* a partir de muestras de sangre y/o de leche de caprinos (Leal-Klevezas *et al.*, 1995b), ovinos, bovinos y humanos (Leal-Klevezas *et al.*, 1995c).

La especificidad de la prueba de PCR es elevada, ya que estudios de especificidad realizados con anterioridad demostraron que no hay amplificación de los genomas de organismos relacionados filogenéticamente (Yanagi y Yamasoto., 1993).

En México, el diagnóstico oficial de la brucelosis bovina se realiza mediante las pruebas serológicas de tarjeta (PT), rivanol (RIV) y fijación de complemento (FC) de acuerdo a lo que marca la NOM-041-ZOO-1995 (<http://www.gob.mx/senasica>); sin embargo, durante el desarrollo de estas pruebas indirectas se pueden presentar reacciones cruzadas con otras bacterias tales como *Yersinia enterocolitica* serotipo O9, obteniéndose en consecuencia resultados falsos positivos (Mittal y Tizard, 1980; Mikolon *et al.*, 1998; Luna y Mejía, 2002).

El diagnóstico definitivo de la brucelosis se lleva a cabo con el aislamiento de *Brucella* spp a partir de tejidos, líquidos corporales y leche (Probert *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005; Rentería *et al.*, 2005).

La confirmación de la presencia de este microorganismo en cualquiera de las muestras significa que el animal es positivo, aún en ausencia de anticuerpos séricos (Mittal y Tizard, 1980; Rentería y col., 2005). Por desgracia, esta práctica no es común en México, además de que los procedimientos bacteriológicos no son siempre exitosos, son tardados y representan un gran riesgo de infección para los técnicos de laboratorio (Leal-Klevezas *et al.*, 1995a; Probert *et al.*, 2004; Rentería *et al.*, 2005).

Considerando las desventajas de los métodos de diagnóstico mencionados, en los últimos 10 años la PCR ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico y la diferenciación de *B. abortus* (biovar 1, 2 y 4), *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* (biovar 1) (Brinker y Halling., 1994). Además, se ha utilizado en la diferenciación de las cepas vacúnales de *B. abortus* S19 y RB51 (Betsy y Halling, 1995) y en la detección de *Brucella* spp, a partir de sangre

y cultivos obtenidos de leche de animales infectados (Leal Klevezas *et al.*, 1995a; Hamdy y Amin, 2002).

Los resultados de la detección específica de *Brucella* por PCR empleando iniciadores derivados de la secuencia 16S rRNA fueron publicados en 1995 por Romero y col., empleando los mismos iniciadores en muestras de leche de animales positivos. La sensibilidad del PCR fue del 87,5% al compararse con la bacteriología. También se llevó a cabo la detección de *Brucella* spp en leche de bovinos, ovinos, caprinos y camellos mediante el uso de iniciadores con la secuencia de la inserción IS711, con un índice satisfactorio de detección (Hamdy y Amin, 2002; Renteria *et al.*, 2005).

La amplificación de una región intergénica entre *eryC* y *eryD* que participan en el catabolismo del eritritol por *B. abortus*, ha sido empleada para la diferenciación de las cepas de *B. abortus* cepa 19 y *B. abortus* 2308 (Sangari *et al.*, 1994). La amplificación del gen *eryD*, el cual codifica para un regulador transcripcional negativo del catabolismo del eritritol (Félix *et al.*, 2000), fue utilizada para el diagnóstico de *Brucella* spp en aislados y leche inoculada (Organes, 2001).

La PCR utilizando cebadores para amplificar el gen *wboA*, el cual codifica para una glicosil-transferasa esencial en la biosíntesis del lipopolisacárido antigénico “O” ausente en la cepa RB51 (vacuna), ha sido empleado para distinguir la cepa vacunal de *B. abortus* RB51 de otras cepas de *Brucella* a partir de aislamientos (Vemulapalli *et al.*, 1999).

2.13 Consecuencias de *Brucella* en la ganadería y la Salud Pública

2.13.1 En la ganadería

La brucelosis del ganado bovino, ovino, caprino y de los porcinos son enfermedades que actualmente figuran en la lista única del código sanitario para los animales terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2014) donde deben ser notificadas de manera obligatoria.

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa que afecta a los animales domésticos como: bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, caninos, equinos, esporádicamente; búfalo,

yak, camello, dromedario, alpaca; y entre los animales silvestres a las ratas del desierto y otros múridos, liebre, caribú, zorro, hurón, antílope, bisonte americano, visón, y algunos mamíferos marinos (Díaz et al., 2000; Rodríguez et al., 2005; Martínez et al., 2006; Bounaadja et al., 2009)

La brucelosis es una enfermedad de importancia económica, ya que limita el desarrollo ganadero por las pérdidas económicas que ocasiona en la producción de leche y carne resultantes de la enfermedad clínica, causando epidemitis y orquitis que produce esterilidad en machos y aborto fetal, infecciones genitales, interfiriendo en los programas reproductivos y la muerte en el ganado, así como por las restricciones aplicadas al comercio de los animales infectados y de sus productos, ocasionando repercusiones a nivel nacional e internacional (Luna y Mejía, 2002; Probert et al., 2004; Rodríguez et al., 2005; Taboada et al., 2005; Rivers et al., 2006; Bounaadja et al., 2009).

Otros efectos negativos son las pérdidas económicas causadas por la brucelosis, debido a la restricción de movimiento territorial (entre entidades federativas o países), lo que dificulta la comercialización y el mejoramiento genético del ganado e incrementa los costos de operación de los mismos (Beal, 1984; Jawetz et al., 1985; Luna y Mejía, 2002).

Las enfermedades zoonóticas por su magnitud y su impacto a nivel mundial, la intensa actividad comercial y la movilización de personas, animales, productos y subproductos, propician la presentación de enfermedades emergentes y reemergente, y dentro de ellas se encuentra la brucelosis, que es una enfermedad extremadamente infecciosa, lo que representa un delicado problema de salud animal y salud pública por la aparición de nuevos casos en humanos (Mikolon *et al.*, 1998; Luna y Mejía, 2002; Rentería *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006; Bounaadja *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2010; Flores Castro 2010).

Esta enfermedad causa hasta 65% de los abortos en vacas, cerdos, ovejas y cabras, lo que hace que la producción de carne y leche merme considerablemente. Se estima que durante 1992 la brucelosis causó pérdidas superiores a 33 millones de dólares americanos en el ganado bovino, caprino y producción de leche y carne en México (Valdespino, 1994; Leal-Klevezas *et al.*, 1999 d).

Xolalpa y col. (2010) mencionan que las pérdidas económicas por brucelosis son cuantiosas en Argentina, donde se estiman pérdidas por 60 millones de dólares, mientras que en Centro América son de 25 millones de dólares americanos.

Soares col. (2015) refieren que, en Brasil, en la década de los setentas, se estimaron pérdidas por 32 millones de dólares tan solo por los abortos y las perdidas en la disminución de leche.

El control de la enfermedad en animales tiene un gran impacto en la reducción de la incidencia en humanos. La incidencia de brucelosis en la población humana de México es oscilatoria, con una variación temporal y dependiente de la entidad. Los estados de Nuevo León, Querétaro, Coahuila, Guanajuato, Zacatecas, Michoacán, San Luis Potosí y Chihuahua ocupan el primer lugar, con una incidencia de 1,2 a 25 casos por cada 100,000 habitantes (López y Merino, 1991).

2.13.2 En la Salud Pública

La brucelosis humana se ha atribuido a *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. canis*; dentro de estas, la *B. melitensis*, cuyo reservorio es el ganado caprino, es la especie que se considera más invasiva y patógena para los humanos (Ortega 1997; Mikolon *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2005; Taboada *et al.*, 2005; Estein., 2006; López y Contreras., 2006; Seleem *et al.*, 2010).

La brucelosis es una enfermedad zoonótica reemergente extremadamente infecciosa lo que representa un grave problema de salud pública, por la aparición de nuevos casos en humanos (Mikolon *et al.*, 1998; Luna y Mejía, 2002; Rentería *et al.*, 2005; Rivers *et al.*, 2006; Bounaadja *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2010).

En humanos se conocen más de 1,415 agentes patógenos, de los cuales 868 especies son zoonóticas (61%). El 80% de estos últimos tienen capacidad de afectar diferentes especies animales y dentro de estas enfermedades se encuentra la brucelosis, que se considera una antropozoonosis ya que la etiología de los animales hospedadores es transmitida al humano (Flores Castro, 2010).

La infección se considera accidental debido a que habitualmente todas las infecciones que se presentan en los seres humanos se adquieren al ingerir productos contaminados (derivados lácticos o cárnicos) provenientes de animales infectados, o al estar en contacto con los mismos (Taboada *et al.*, 2005; López y Contreras., 2006; Rivers *et al.*, 2006; Seleem *et al.*, 2010).

Michanie y col. (2001) mencionan que el análisis de un estudio realizado de las publicaciones realizadas en los últimos cinco años del siglo XX, reveló que durante 1973-1992 se reportaron 32 brotes asociados al consumo de queso, los cuales se presentaron en diversos países como Argentina, Canadá, Estados Unidos de América (EE.UU), Francia, Irán, Italia, Malta, Reino Unido y Suiza, donde la mayoría de los brotes obedeció al consumo de queso fresco, donde los agentes involucrados fueron 12 (38%) *Salmonella* 4 (13%), *Clostridium botulinum* 4 (13%), *Brucella melitensis* 3 (9%), *Listeria monocytogenes* 3 (9%), *Escherichia coli enterohemorrágica* 2 (6%), *Escherichia coli enterotoxica* 2 (6%), origen desconocido 1 (3%), *Staphylococcus aureus* 1 (3%), *Streptococcus equi*. En los Estados Unidos de América reveló que 11 de los 32 brotes se les atribuyó a contaminantes durante la manufactura antes de la distribución del queso, que causaron 1,278 enfermos, 170 hospitalizados, y 58 muertos. Cinco, de los 11 brotes se debieron al consumo de queso fresco llamado estilo mexicano, y otros 2 debido al consumo de queso Mozzarella.

Rivers y col. (2006) mencionan que la enfermedad puede ser adquirida por exposición de las personas que viajan a países donde la enfermedad es endémica. Méndez y col. (2015) mencionan que la transmisión al humano se da por contacto directo con secreciones de animales infectados, por el consumo de productos y subproductos de origen animal contaminados leche, y quesos no pasteurizados, carne cruda y por transfusiones sanguíneas. Así mismo, la Organización Internacional del Trabajo (OIT, 2005) cataloga a la brucelosis dentro de las enfermedades profesionales causadas por la exposición a agentes que resulten de las actividades ocupacionales. Trabajadores en actividades pecuarias, médicos veterinarios, matanceros, carniceros, personal de frigoríficos, de laboratorio y otros que están en contacto con animales vivos, cadáveres o subproductos, son la población de mayor riesgo ocupacional.

Olivera y col., (2009) refieren que a partir de los años 60, cuando se realizó el primer aislamiento de *B. canis* en perros, se han reportado 40 casos de brucelosis en humanos con personas con síntomas y sin síntomas, pero con historia clínica de que han tenido contacto con perros, los cuales, mediante métodos serológicos, arrojaron resultados positivos a *B. canis*, y a través del hemocultivo se logró el aislamiento de la bacteria.

Méndez y col. (2015) mencionan que la brucelosis es una de la zoonosis bacteriana más frecuente en todo el mundo y que su incidencia varía entre 1,3 y 70 casos por cada 100,000 habitantes, siendo esta variación debida a las características de cada nación. En los países desarrollados se ha logrado el control de esta enfermedad, pero en los países en desarrollo se calcula que cada año se infectan 500,000 personas, con una mortalidad del 5%. El impacto es principalmente económico y social, por los altos costos en el diagnóstico y tratamiento, así como por las incapacidades provocadas.

La brucelosis es una enfermedad de reporte obligatorio a las autoridades de salud y los casos reportados oficialmente solo constituyen una fracción de la verdadera incidencia de la enfermedad en humanos que es desconocida, aunque se estima entre $<0,03$ y >160 casos por 100,000 habitantes (Seleem *et al.*, 2010).

En España, Barroso y col. (2007) refieren que se identificaron 10 casos (9 en Vélez-Rubio y 1 en Alcalá de Guadaíra) en Andalucía, donde resultaron 8 probables (aglutinaciones positivas a *Brucella* spp) 2 confirmados (hemocultivo positivo o seroconversión), que pertenecían a 7 familias distintas. De esas familias se identificaron un total de 28 expuestos, donde se recogieron muestras clínicas de todos ellos, y se detectaron 3 personas asintomáticas con aglutinaciones positivas a *Brucella* spp. De acuerdo con la encuesta epidemiológica aplicada se pudo conocer que habían ingerido quesos frescos meses antes del brote, los cuales procedían de la venta ambulante y de elaboración casera, donde la persona que elaboraba los quesos también resultó afectada.

Así mismo, Flores Castro (2010) menciona que la brucelosis es una enfermedad que a pesar de ser de reporte obligatorio no siempre se notifica. Además, se encuentra desatendida principalmente en países subdesarrollados o en desarrollo, donde se explota la producción caprina y ovina de subsistencia, y esto hace notar una falta de interacción de los sectores de salud pública y veterinaria.

2.14 Situación de la Brucelosis en México

México es uno de los países con mayor incidencia de brucelosis humana en Latinoamérica. La enfermedad no sólo afecta a la población ocupacionalmente expuesta, sino también a personas con otras actividades laborales ajenas a las pecuarias (Méndez *et al.*, 2015).

Leal-Klevezas y col. (1999d) y Méndez y col. (2015) refieren que México es uno de los principales países ganaderos de América Latina, donde la brucelosis está catalogada como una de las zoonosis más importantes, por las pérdidas económicas que ocasiona en la ganadería nacional y su impacto en la salud pública. Así mismo, junto con López y col., (1992), mencionan que la mayor frecuencia se registra en aquellas entidades con gran concentración de cabras: Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Tamaulipas, Guanajuato, Michoacán, Estado de México, Querétaro y San Luis Potosí. Sin embargo, Luna y Mejía (2002) mencionan que han detectado pruebas positivas en rebaños bovinos con diferentes niveles de prevalencia en casi todos los estados, siendo los de mayor prevalencia Chihuahua, Hidalgo y Guanajuato en rebaños caprinos, y los de Coahuila, Chihuahua, Jalisco y Zacatecas los que presentaron los niveles más altos de positividad.

En México, se han aislado cinco de las especies conocidas de *Brucella*: *B. melitensis* biovares 1-3; *B. abortus* biovares 1, 2, 4 -6; *B. suis* biovar 1, *B. canis* y *B. ovis*; sólo *B. neotomae* y *B. marinum* no han sido aisladas. Algunos de los aislamientos se han realizado en sectores no tradicionales de destino de especies animales, como por ejemplo, una cepa de *B. suis* que fue aislada de queso de vaca lechera y algunas cepas de *B. melitensis* se han aislado de productos lácteos de leche de vaca (Luna y Mejía, 2002).

Cada año la Secretaría de Salud informa de los nuevos casos de brucelosis humana, que han promediado más de 2,000 casos en los últimos años. La mayoría de los casos se registran en las personas no relacionadas con las actividades rurales, y casi 20 muertes por año están directamente relacionados con la brucelosis Luna y Mejía, (2002). Entre 1990 y 1997 se registraron un promedio de 15,363 casos de brucelosis, el 94% de los cuales se asociaron a la ingesta de alimentos contaminados como queso, leche y otros derivados lácteos. De éstos, el 84% de los casos adquirió la enfermedad por el consumo

de alimentos no pasteurizados, de los que el 40% reportó el consumo de leche cruda, el 40% reportó haber consumido queso fresco y el 4% otros productos lácteos (Morales *et al.*, 2004).

En México, la brucelosis es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica y de notificación semanal. Entre los años 2007 al 2011 se registraron 12,214 casos de brucelosis en humanos con un promedio anual de 2,443 casos anuales en este periodo; en el año 2007 se registraron 1,874 casos, con una incidencia de 1,7 por 100,000 habitantes y en el año 2011 se registraron 3,436 casos, con una incidencia de 3,1 por cada 100,000 habitantes, lo que representa un incremento en la incidencia del 77% para el 2011 con respecto a 2007 (Anónimo, 2012).

La vía más común de adquirir la bacteria para las personas es por el consumo de derivados lácteos no pasteurizados como la leche cruda y quesos frescos sin pasteurizar, sobre todo de origen caprino y bovino. En México, al igual que en otros países, el consumo de queso fresco o leche cruda es una práctica común en varias regiones, donde se continúa reportándose en promedio 2,200 nuevos casos anualmente de brucelosis en humanos, en diferentes regiones del país. No existen datos sobre las especies de *Brucella* asociadas a los casos humanos, o sobre cómo se infectaron los pacientes. De los pocos estudios sobre casos de brucelosis en México se reportó que el consumo de quesos frescos de origen caprino contaminados con *B. melitensis biovar 1* fue el vehículo que ocasionó un brote de brucelosis en humanos en una de las comunidades rurales de Guanajuato (Guzmán *et al.*, 2016).

El gobierno mexicano, en 1995, implementó la campaña para el control y erradicación de la brucelosis en los animales. A pesar de esto, en el período de 2000 al 2011, se registró en todo el país un aumento en la incidencia de la brucelosis bovina, pasando de 1 a 15%; y en la del ganado caprino el aumento fue de 2 a 7% en este mismo período. El incremento de la brucelosis bovina se relacionaba con 15% de aumento en la incidencia de los nuevos casos de brucelosis humana. La brucelosis en caprinos está relacionada en un 33% con el aumento de los casos de humanos (Guzmán *et al.*, 2016).

La brucelosis es una enfermedad de notificación obligatoria para los médicos. De acuerdo con los reportes generados por la Dirección General de Epidemiología de la SSA, en el

año 2008 se presentaron un total de 1,950 casos confirmados de Brucelosis en humanos y en el año 2009 se contabilizaron 2,157 casos, siendo los estados de mayor incidencia: Guanajuato (544 casos), Jalisco (242 casos), Sonora (144 casos), Michoacán (141 casos) y Nuevo León (120 casos). Estos números, aunado a los casos no reportados y/o mal diagnosticados, sugieren la importancia de la enfermedad en nuestro país (Suárez, 2014).

La brucelosis es endémica en México y pocos estados se encuentran libres de la enfermedad (Yucatán y Sonora), o se encuentran en fase de erradicación como se observa en la Figura 1, que muestra el mapa de la República Mexicana en las diferentes fases de la campaña nacional contra la brucelosis de los animales y la situación en que se encontraban los estados en marzo del 2015, donde sólo un 8,14% fueron estados libres de brucelosis, mientras que un 27,66% se encontraban en fase de erradicación y un 72,34% en fase de control.



Figura 1. Mapa de México con las diferentes fases: Libre, erradicación y control de brucelosis en ganado.
Fuente SENASICA 2015.

En Nuevo León, México se analizaron muestras durante el período 2004-2005, para la detección de brucelosis por medio de serología en humanos, encontrándose un porcentaje de seropositividad del 42% (Anónimo, 2006).

El número de casos de brucelosis humana están directamente relacionados con el consumo de productos derivados de la leche no pasteurizados y productos conexos, que se movilizan hacia zonas urbanas y de esta manera contribuyen a la diseminación de la brucelosis. México se encuentra entre los países de América Latina con mayor incidencia de brucelosis principalmente en bovinos, ovinos y caprinos (Luna y Mejía, 2002).

En la Figura 2, se puede observar el número de casos reportados de brucelosis en humanos en México durante el periodo del 2001 al 2015, donde se registraron 38,914 casos de brucelosis con un promedio anual de 2,594 casos anuales. En el año 2001 se registraron 3,013 casos, con una incidencia de 2,98 por 100,000 habitantes y en el año 2015 se registraron 2,937 casos, con una incidencia de 2,43 por cada 100,000 habitantes. De lo anterior se concluye la persistencia de la brucelosis en humanos (Anónimo 2015).

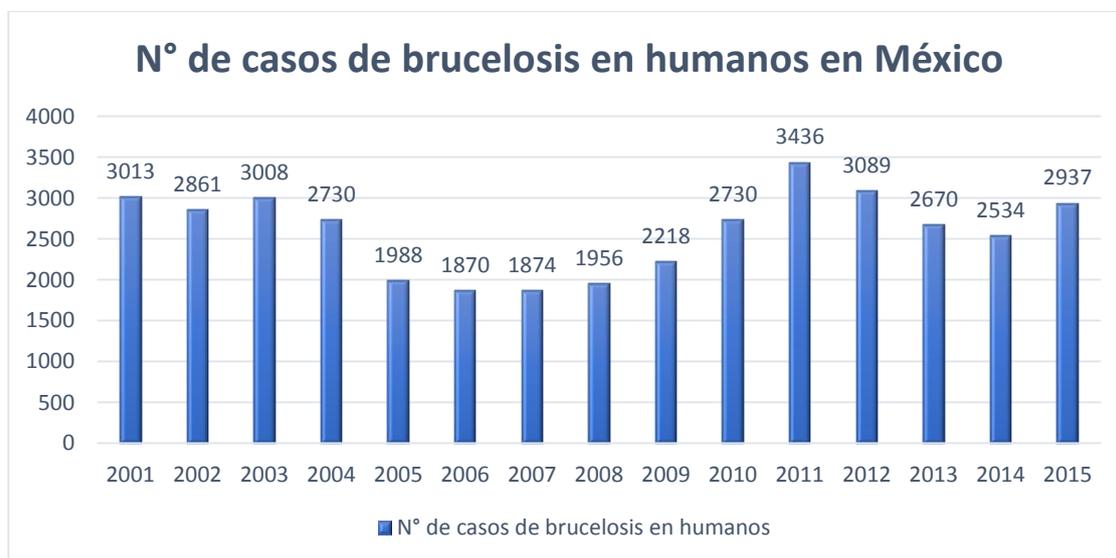


Figura 2. Número de casos de brucelosis en humanos en México 2001-2015.

Fuente. Elaboración propia en base Anónimo (2015). (Anuario de Información, Sistema Único de Información Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología /SSA).

En la Figura 3, se puede observar la incidencia anual en el periodo comprendido del 2001 al 2015 de brucelosis en humanos en México, la cual es muy fluctuante. Guzmán y col. (2016) Mencionan que en el año 2006, México ocupó el vigésimo primer lugar mundial

y el segundo del continente americano en brucelosis humana, con una incidencia de 1,74 casos por cada 100,000 habitantes.

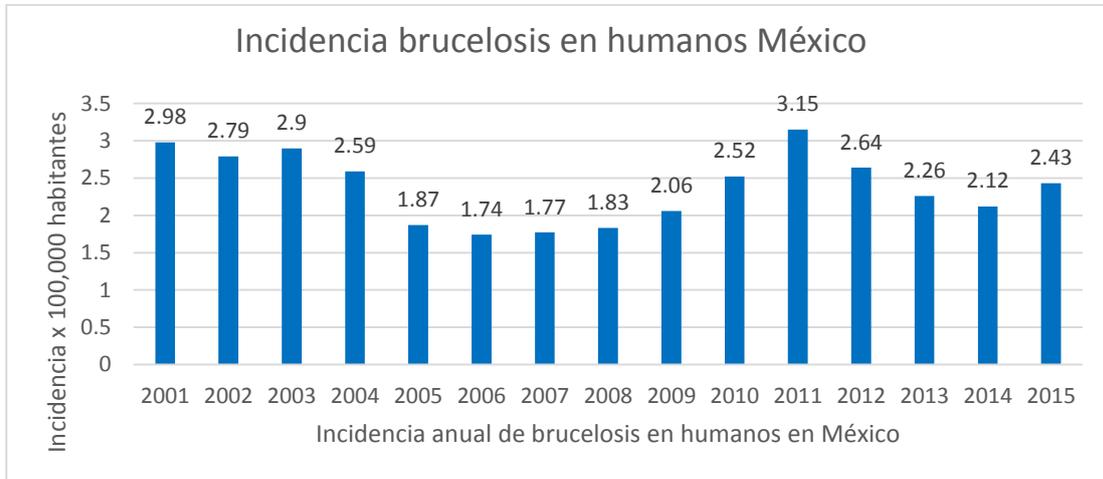


Figura 3. Incidencia anual de brucelosis en humanos en México durante el periodo 2001-2015.
Fuente. Elaboración propia en base Anónimo (2015). (Anuario de Información, Sistema Único de Información Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología /SSA).

El estado de Nuevo León es uno de los estados con un alto índice de casos clínicos e incidencia de brucelosis en humanos lo que se puede observar en la Figura 4 y 5.

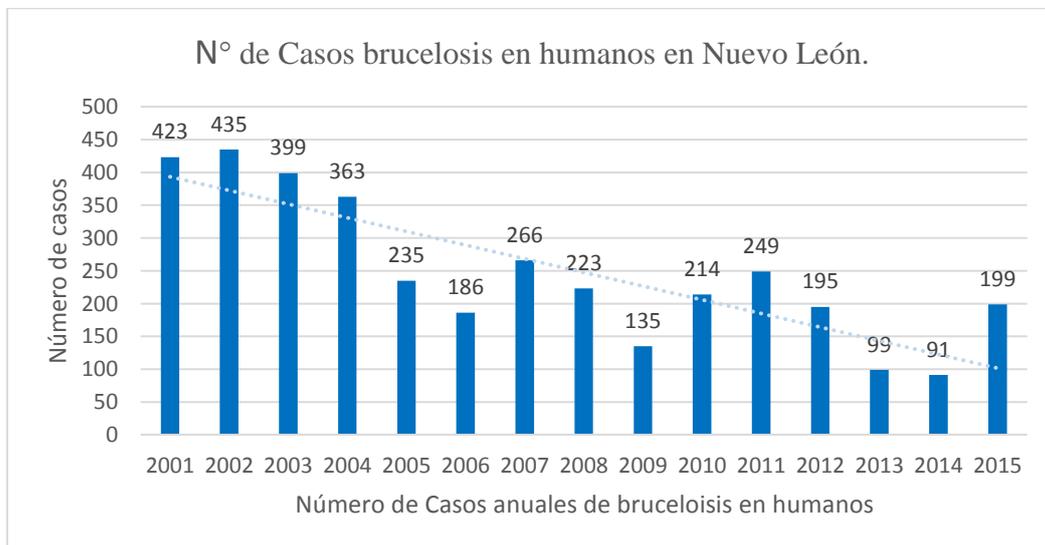


Figura 4. Número de casos anuales de brucelosis en humanos en Nuevo León durante el periodo 2001-2015.
Fuente. Elaboración propia en base Anónimo (2015). (Anuario de Información, Sistema Único de Información Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología /SSA).

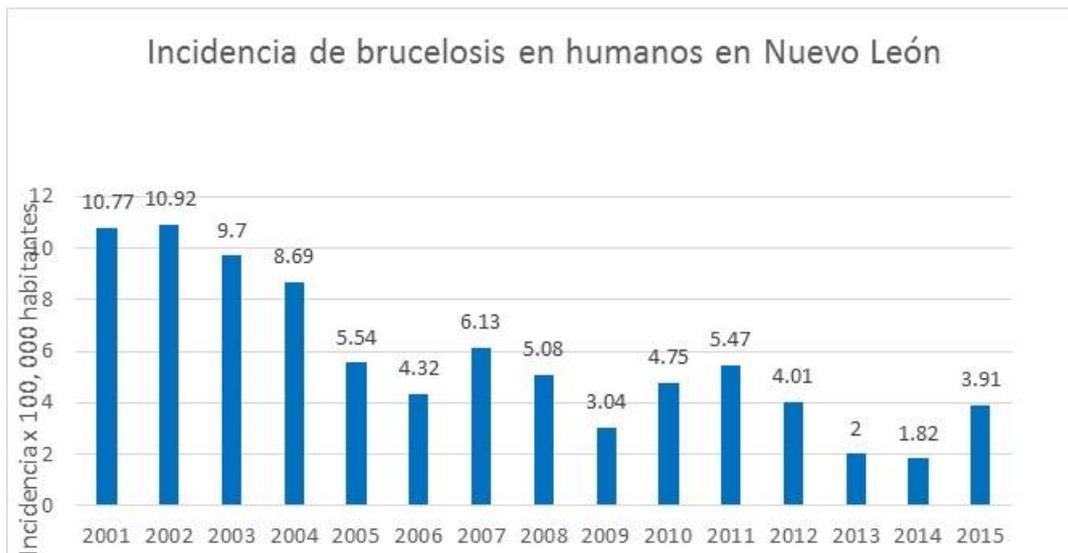


Figura 5. Incidencia anual de brucelosis en humanos en Nuevo León* durante el periodo 2001-2015. La cual varía de 1,82 a 10,92.

Fuente. Elaboración propia en base Anónimo (2015). (Anuario de Información, Sistema Único de Información Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología /SSA).

* Incidencia por cada 100,000 habitantes.

En la Figura 6, se pueden observar el número de defunciones anuales por casos brucelosis con seguimiento y confirmados en humanos en México, durante el periodo del 2001 al 2014 (DGIS, 2015).

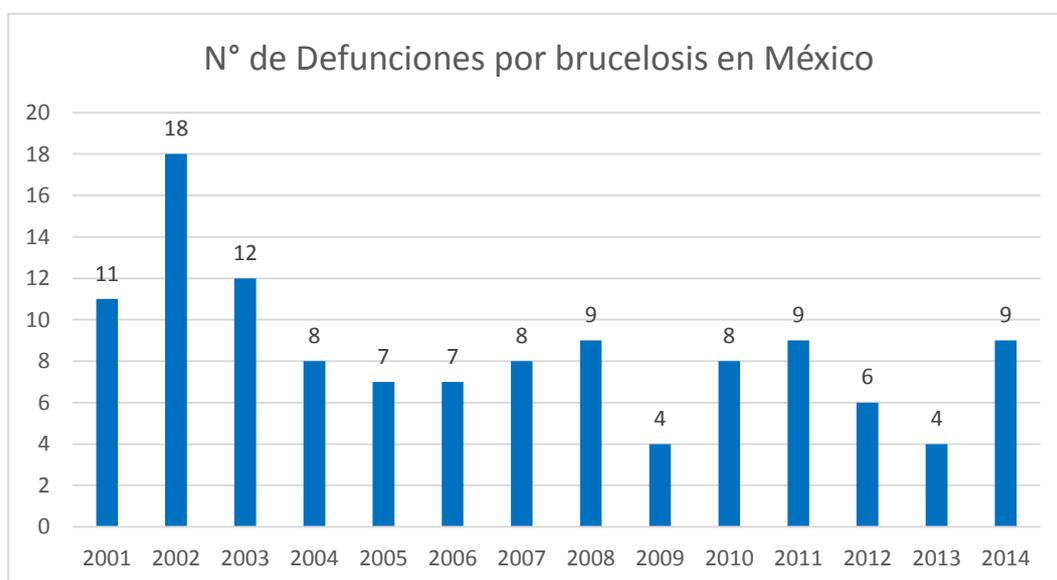


Figura 6. Número de defunciones anuales por brucelosis en humanos en México reportados y confirmados en el periodo 2001-2014.

Fuente. Elaboración propia en base a DGIS (2015). (Dirección General de Información en Salud.)

Estos datos nos confirman que la enfermedad persiste a pesar de que se han implementado campañas de control y erradicación de la enfermedad en ganado, lo cual debería repercutir

en una disminución en el número de casos en el ganado y, en consecuencia, en humanos por lo que la brucelosis sigue siendo un problema importante de salud pública (Anuario de información 2015).

2.15 Sistemas de Producción Bovina Lechera en México

Los sistemas de producción lechera en México no son homogéneos, es decir, las unidades productivas no son iguales, difiriendo en cuanto a tecnología, el número de vientres, procedimientos reproductivos, o la calidad de los forrajes utilizados para la alimentación de los animales. Existen unidades productivas grandes y modernas, en las cuales trabajan en forma intensiva y tecnificada, con gran número de vientres, sistemas de ordeño mecánico, y en que la alimentación se basa en forrajes de buena calidad y alimentos balanceados, así como también se encuentran unidades productivas de manera familiar, con menor o nulo desarrollo tecnológico, utilizando procedimientos productivos rudimentarios, como el ordeño manual y en el uso de forrajes de baja calidad e instalaciones rústicas (Vargas *et al.*, 2009; Ávila y Gutiérrez, 2014).

En México existen tres sistemas de producción de leche bien diferenciados, que son: el Intensivo (con sus dos variantes, especializado y semi-especializado); el Extensivo, también conocido como doble propósito, y por último el Familiar o de traspatio, cada uno con sus propias características tecnologías y socioeconómicas. En el año 2004 el 17% (352,668) de las cabezas de ganado se explotaban bajo el sistema de producción intensivo especializado, el 15% (311,178) en el semi especializado, el 60% (1; 244,710) pertenecían al sistema doble propósito y el 8% restante (165,962) al sistema familiar o de traspatio. El ganado especializado produjo el 51% del total de la producción del país (Vargas *et al.*, 2009; Ávila y Gutiérrez, 2014).

Sin embargo, el censo ganadero del 2011 fue de 31; 936, 334 cabezas, de las cuales 2, 382,443 es decir el 7% correspondían a bovinos productores de leche, siendo el sistema intensivo el principal productor con el 50,46%, mientras que el extensivo suponía el 19,50% y el familiar el 9,38% del volumen total de la producción de leche del país (Villegas., 2004; Vargas *et al.*, 2009).

El ganado explotado bajo el sistema intensivo se localiza en las principales cuencas lecheras del país, que son la Comarca Lagunera (los estados de Coahuila y Durango), los altos de Jalisco, Delicias y Cuauhtémoc (Chihuahua) y Aguascalientes, principalmente. Aporta la mayor parte de leche pasteurizada que se consume en los principales centros urbanos del país. La principal raza explotada es la Holstein. En este sistema participan aproximadamente 7,000 productores de leche, con explotaciones con un alto grado de tecnología. La alimentación es a base de forrajes de buena calidad y alimentos balanceados. Por otra parte, el sistema extensivo o de doble propósito (obtención de carne y leche), utiliza principalmente razas cebuinas, puras o cruza con razas europeas. La alimentación se realiza con pastoreo directo en praderas naturales o inducidas. Su productividad es baja, con problemas de calidad, conservación, colecta y comercialización de la leche. El tercer sistema familiar o de traspatio se localiza principalmente en los estados de Sonora, Coahuila, Nuevo León, Jalisco, Michoacán, Hidalgo, Estado de México y otros estados. El ganado empleado es resultado de cruza de raza Holstein, Pardo Suizo y Criollo, y su alimentación se basa en esquilmos agrícolas y alimentos balanceados. En este sistema de producción gran parte de los productores no cuenta con equipo de enfriamiento de leche y presenta deficiencias de control sanitario en la producción. Los productores que participan son más de 70,000 los cuales tienen acceso limitado a la tecnología (Villegas., 2004; Vargas *et al.*, 2009; Ávila y Gutiérrez, 2014).

En el mes de marzo del año 2014 la producción nacional de leche fue de 2595; 134, 000 litros de leche, esto es aproximadamente cerca de 29 millones por día. Donde se destacan cinco entidades federativas que aportaron alrededor de 57% de la leche total nacional, las cuales son: Jalisco, con 482,131 litros (18,6%), Coahuila, con 324,062 litros (12,5%), Durango, con 242,359 litros (9,3%), Chihuahua, con 236,375 litros (9,1%) y Guanajuato, con 183,439 litros (7,1%) (SAGARPA-SIAP, 2014).

2.16 Sistema de Producción Caprina en México

En los sistemas de producción de ganado caprino en México, se distinguen dos tipos: el sistema de producción extensivo y el intensivo o estabulado (Hernández *et al.*, 2011).

El 90% de los sistemas de producción caprina en México son extensivos, los cuales cuentan con pobres y deficientes programas de manejo (instalaciones, nutrición, reproducción y mejoramiento genético, salud y mercado). Generalmente se presentan en zonas con un clima semidesértico, donde pastorean en extensas llanuras o escarpadas montañas con vegetación predominantemente arbustiva y escasez de agua, explotando ganado criollo adaptado a las difíciles condiciones del medio. Su alimentación consiste en aprovechar los recursos naturales existentes, ya que en algunas explotaciones hay carencia de vías de comunicación. El sistema estabulado es similar al sistema de producción en bovinos, pero con leves diferencias; la mayoría de las explotaciones carece de adecuados esquemas de alimentación y se observan deficiencias en la salud e higiene de las cabras, fallas en las prácticas de manejo, falta de control de las enfermedades transmisibles al hombre y deficiente capacitación del personal del establo, entre otras causas. Aunado a lo anterior, la falta de conocimiento del consumidor de las ventajas nutritivas y de salud que representa el consumo de leche de cabra y leche de vaca, han hecho que la leche de cabra sea destinada principalmente para la elaboración de dulces y derivados (Cervantes *et al.*, 2001).

Díaz y col. (2015) mencionan que los sistemas de producción intensiva de leche de cabra se desarrollan en áreas de riego, donde el 71% de la producción láctea del país corresponde a los estados de Coahuila, Durango y Guanajuato, en donde las explotaciones pueden manejarse de dos formas: a) intensiva de manejo estabulado sin pastoreo o intensiva de tipo pastoril, y b) extensivo de manejo del rebaño en residuos de cosechas de cultivos irrigados. En el sistema intensivo estabulado se manejan cabras de raza Saanen, Alpino Francesa y/o Toggenburg, con altas producciones y utilizando raciones completas, corrales para grupos de producción, salas de ordeña automatizadas, así como registros y controles sanitarios y de reproducción. Los rebaños varían de 60 hasta 1000 hembras en producción.

El sistema intensivo de tipo pastoril se asocia con praderas irrigadas donde el productor requiere de conocimiento sobre rotación de potreros y manejo de carga animal. Se requiere de recursos económicos, suelo y agua donde establecer las praderas, así como de un mínimo de infraestructura para irrigación, fertilización de praderas, cercos, comederos, aguajes, sombras etc.

En el sistema de producción de leche extensivo, los productores no cuentan con recursos forrajeros propios, por lo que algunos autores como Valencia (2002) y Nagel y col. (2006) denominan a este sistema de producción “sedentario”. Los animales pastorean en vegetación nativa y residuos de cosechas de cultivos irrigados; no son proveídos de suplementación alimenticia de forma regular ni tienen asistencia técnica. Los propios productores desparasitan interna y externamente a los animales, sin que estas prácticas sean constantes a través de los años. Los animales son encastados con razas productoras de leche y de doble propósito, como Alpino Francés, Saanen, Toggenbur, Anglo Nubia y Granadina. Con esta mezcla de razas que conserva la rusticidad y una producción de leche aceptable, el productor percibe el 79% de sus ingresos por la venta de leche y el 21% por la venta de cabritos. Los costos de este sistema de producción son bajos, lo que ha representado retornos económicos a los productores, en especial cuando el precio de la leche que ha estado alto (Díaz *et al.*, 2015).

La brucelosis ocasiona grandes pérdidas económicas en el sector caprino, asociadas a una disminución en las tasas de concepción y de pariciones que repercuten en una reducción en la producción de leche, en la pérdida de cabritos y en bajos pesos al destete, así como en restricciones para el transporte y comercialización de los animales infectados y sus productos, como la leche y la carne (Díaz, 2013; Singh *et al.*, 2015).

2.17 La Leche

El hombre ha aprovechado la leche para su alimentación, empleándola directamente y transformándola para la obtención de productos como el queso, yogurt y mantequilla entre otros. Su industrialización se ha desarrollado en todas las latitudes, permitiendo que cada día se obtenga una cantidad mayor de productos que son ideales para la nutrición humana. La leche cruda contiene un gran número de microorganismos por mililitro esto es lo que se denomina carga microbiana, y están involucrados en la conservación de la leche fluida, cruda o pasteurizada, y los productos derivados de ella y esto determina la vida de anaquel. Asimismo, los microorganismos están involucrados en la generación o transmisión de enfermedades en los consumidores, incrementándose si la leche es cruda y la impartición de características sensoriales deseables en los productos derivados (leches, quesos, cremas, etc.). Es por ello la microbiota láctea tiene importancia social, tecnológica y económica. Entre los grupos de microorganismos de la leche, se encuentran

los existentes en la naturaleza, solamente las bacterias, levaduras y los mohos desempeñan una función relevante en la tecnología de la leche. La carga bacteriana de la leche cruda depende de las condiciones de manejo higiénico con que se obtienen el producto. En México está en función del sistema de producción lechera, la leche cruda o bronca presenta una cuenta total (mesófilo- aeróbica) que se halla entre 20 mil ufc/ml y más de dos millones de ufc/ml (Villegas., 2004).

2.18 El Queso

A nivel mundial se producen cientos de variedades de quesos, algunos autores mencionan que hay entre 400 y 1,000 variedades de queso. Sin embargo, existen diversos parámetros empleados para poder clasificar a los quesos, tales como: el tipo de leche (vaca, oveja, cabra, entre otras) o diversas mezclas de éstas, el tipo de coagulación (enzimática, láctica o mixta), su textura, el contenido de humedad, la cantidad de extracto seco, la materia grasa, el tipo de microorganismo empleado, la zona geográfica de elaboración o lugar de procedencia, así como el tipo de tecnología usada durante su fabricación (González y Franco, 2015).

Rodríguez Jerez (2012) menciona que el queso fresco se caracteriza por ser un producto con alto contenido de humedad, ligeramente ácido (pH alrededor de 5,3), con un bajo contenido de sal (menor al 3%) y poco fermentado, estas características permiten el desarrollo de microorganismos propios de la leche y de la contaminación ambiental, sí existen microorganismos patógenos entre los que podríamos encontrar *Brucella*, *Mycobacterium*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, entre otros, los cuales se multiplican, aumentando el riesgo sanitario. Por este motivo es esencial que se realice la pasteurización previa de la leche, lo que lo convierte en un producto seguro pero perecedero, que requiere refrigeración.

2.19 Producción de queso en México

México posee un valioso patrimonio gastronómico y cultural, constituido en parte por sus quesos genuinos, artesanales e industriales, que constituyen un recurso para el desarrollo

socioeconómico de las regiones donde se producen. En México se elaboran más de treinta tipos de quesos diferentes, la mayor parte artesanales y de distribución regional; dentro de éstos, siete ocupan los de mayor venta: Fresco, Chihuahua, Oaxaca, Panela, Tipo Manchego, Doble crema y Amarillo. Debido a que la producción de leche es fluctuante, influenciada por la estacionalidad (alimentación y estrés ante el cambio del tiempo), la producción de queso se enfrenta al problema de volúmenes variables durante el año, con períodos de escasez y excedentes (Villegas, 2004).

Hoy en día, la producción quesera en México se realiza por medio de dos tipos de industria: la gran industria quesera y la pequeña o artesanal. En la primera, la producción se realiza a gran escala, en donde se controla la calidad de la leche, se estandariza su contenido en grasa, se controla el proceso de elaboración, y se obtienen productos bien presentados y estandarizados en composición, dentro de las normas legales sanitarias vigentes. La industria artesanal está constituida de numerosas queserías familiares a pequeña escala, situadas en los pueblos o rancherías en todo el territorio nacional. En la mayoría de ellas se realizan los procesos rústicamente, empleando leche cruda en la que se desconoce su calidad, por lo que se enfrentan a problemas de conservación, presentación y sanidad de forma constante, lo que dificulta la comercialización del producto (Villegas, 2004; Ramírez, 2011; Cesín-Vargas, 2014).

En México en el año 2008 se encontraban registradas oficialmente 1,500 queserías que emplean a unas 20 mil personas. Sin embargo, no todas las queserías se registran. Por ejemplo, en el estado de Chiapas se estimó que existían aproximadamente 600 queserías, pero solamente 109 se encuentran registradas, lo que significa que la mayor parte de esa producción no se controla. La elaboración de queso constituye una oportunidad económica para pequeños y medianos productores de leche ante la baja rentabilidad, por los altos costos de los insumos para la producción y los bajos niveles de utilidad. Sin embargo, la quesería artesanal reviste gran importancia no solamente por la elaboración de un producto reconocido por sus bondades nutricionales y gustativas, sino por su capacidad de generar y mantener el empleo rural (Villegas y Cervantes, 2011).

Los quesos artesanales se elaboran tradicionalmente con leche cruda (sin pasteurizar), por lo general de vacas criollas, con fermentación espontánea y corta maduración, utilizando metodologías muy rudimentarias. Esta leche cuenta con un mayor número de

microorganismos patógenos para el ser humano, como *Brucella* entre muchas otras, al momento de ser comercializado, las cuales permanecen en el producto durante la venta y vida de anaquel. Por esta razón, se asocian con mayor frecuencia con brotes de intoxicación alimentaria. Estos quesos son generalmente de circulación local o regional (Méndez *et al.*, 2007; Villegas y Cervantes, 2011; Ramírez, 2011 Reséndiz *et al.*, 2012).

La elaboración de quesos en México está regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, (<http://dof.gob.mx>), la cual establece que la leche como materia prima debe someterse a un tratamiento térmico que garantice la inocuidad del producto, a excepción de la leche utilizada en la elaboración de quesos y que por sus características no pueda ser sometida a dicho tratamiento térmico. Así mismo, se establece que, en estos casos, la empresa procesadora debe tener implementado un sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés), conforme a lo establecido al Apéndice A de la NOM-251-SSA1-2009, (<http://dof.gob.mx>). Donde se menciona que uno de los aspectos más importantes a considerar es la calidad sanitaria de la materia prima, algo que resulta difícil de asegurar, pues en México enfermedades como tuberculosis y brucelosis, las cuales aún no han logrado ser erradicadas, al ser enfermedades de tipo zoonóticas, constituyen un grave peligro a la salud del consumidor (Ramírez, 2011).

Además, la Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, (<http://www.salud.gob.mx>) establece que el queso fresco debe ser elaborado a partir de leche pasteurizada, así como las condiciones de microorganismos permitidos y no permitidos durante su producción y comercialización. La vigilancia del cumplimiento de esta norma le corresponde a la Secretaría de Salud.

La producción nacional de queso pasó de 127,000 toneladas en 1998 a 132,000 en 2005, lo que significó un pequeño crecimiento de 3,9% para el periodo. En el mismo lapso, el consumo nacional aparente de queso se incrementó en un 40% (al pasar de 155,000 toneladas en 1998 a 217,000 en 2005). Este aumento fue posible debido a que se triplicaron las importaciones de este alimento, que se incrementaron de 28,000 toneladas en 1998 a 85,000 en 2005. Así, el 60,8% del queso que se consumió aparentemente en el país durante el año 2005 correspondió a la producción nacional, y el 39,2% restante a

productos importados; la disponibilidad *per cápita* de queso, para ese año, fue de 2,106 kg (Cesín *et al.*, 2007).

En el año 2011, se produjeron 275,413 toneladas de queso en México, entre el que destaca el “queso fresco”, el de mayor producción y consumo en México y América Latina. La característica principal de estos quesos es que se producen utilizando leche sin pasteurizar, y se elaboran con deficientes prácticas de higiene, poca o nula verificación de la calidad de la materia prima, un proceso de fabricación no tecnificado, transporte inadecuado, así como deficiencias al momento de su expendio (González y Franco., 2015).

En México, la incidencia de brucelosis en humanos alcanzó un promedio de 5,363 casos nuevos anuales durante el periodo de 1990 a 1997; de éstos, hasta un 94,3% adquirió la infección como consecuencia de consumo de alimentos contaminados, especialmente leche cruda y quesos elaborados con leche no pasteurizada. En dos estudios realizados en México (García y col., 2008; García y col., 2014) se llegó a la conclusión de que la principal forma de contagio de la población estudiada fue a través del consumo de productos lácteos sin pasteurizar y el queso fresco. La leche cruda y los quesos frescos sin pasteurizar, sobre todo de origen caprino y bovino, son por tanto la vía más común por la que se puede adquirir la brucelosis en la población (Guzmán *et al.*, 2016).

En los últimos años se han notificado un promedio de alrededor de 3,000 casos anuales de brucelosis en humanos en México, aunque se considera que hay una sub notificación y un sub registro de consideración. Alrededor del 80% de los casos humanos tiene por origen el consumo de leche cruda y quesos artesanales, así como de otros lacticios elaborados con leche infectada. Se presenta con mayor frecuencia en mujeres en edad productiva, de 20 a 40 años, seguida de empleados y estudiantes, Esta información refleja que la brucelosis humana es un problema de salud pública (Merino, 2015).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Metodología

La planificación seguida de la fase experimental se puede observar en el diagrama de flujo presentado en la Figura 7.

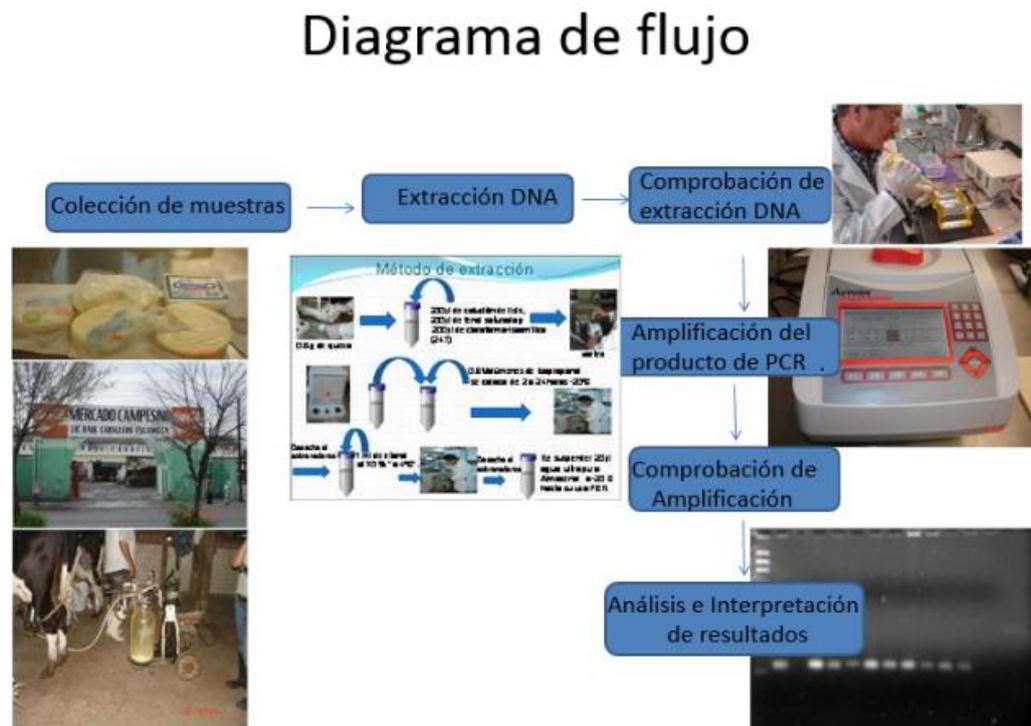


Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología seguida.

3.2 Descripción del área geográfica del estudio

El estado de Nuevo León está situado en el extremo noreste de México. El territorio comprende 64,220 kilómetros cuadrados y representa 3,27% de la superficie del país; colinda al Sur con San Luis Potosí y Tamaulipas, al Este con Tamaulipas, al Norte con Coahuila, Tamaulipas y con el estado de Texas, en los Estados Unidos de Norte América; al Oeste con Zacatecas, Coahuila y San Luis Potosí. Cuenta con 51 municipios y su capital es Monterrey, Nuevo León. Las coordenadas geográficas al Norte 27° 47', al Sur 23° 10' de latitud Norte al Este 98° 24' y al Oeste 101° 12' de longitud Oeste.

El 68% del estado presenta clima seco y semiseco, el 20% cálido subhúmedo se encuentra en la región perteneciente a la llanura costera del Golfo Norte, el 7% es templado subhúmedo y se localiza en las partes altas de las sierras y el restante 5% presenta clima muy seco hacia la sierra madre occidental. La temperatura media anual es alrededor de 20°C, la temperatura máxima promedio es de 32°C y se presenta en los meses de mayo a agosto, la temperatura mínima promedio es de 5°C y se presenta en el mes de enero.

La precipitación media estatal es de 650 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de agosto y septiembre.

En el año 2015 la población era de 5; 119,504 habitantes, la cual se encuentra distribuida en un 95% urbana y un 5% rural (INEGI, 2016).

Nuevo León, cuenta con 9,770 unidades de producción, con una población de 358,357 caprinos, los cuales se encuentran concentrados la mayor parte (57%) en Galeana, Dr. Arroyo, Aramberri, Iturbide y Zaragoza, municipios del sur del estado (INEGI, 2010, Anónimo, 2014).

3.3 Determinación del tamaño de muestra.

Para calcular el tamaño de muestra se utilizó el programa Win Epi 2.0 tomando en cuenta el cálculo para determinar solamente si hay o no *Brucella* spp y establecer una proporción (prevalencia). En este caso el tamaño de la muestra depende del error aceptado y del nivel de confianza deseado o probabilidad de obtener una respuesta correcta, así como de la prevalencia esperada (De Blas *et al.*, 2008).

En el programa Win Epi 2.0, se tomó en cuenta un Error aceptado (E) del 4%, con una prevalencia esperada del 20% y un Nivel de Confianza (NC) del 95%.

Se consideró una proporción próxima al 20%, con un nivel de confianza del 95% y un margen de error de 4,0%, en una población de tamaño desconocido. El programa realizó el cálculo dando por resultado que el tamaño de la muestra de quesos resultante es de 385, lo que se puede observar en la Figura 8.

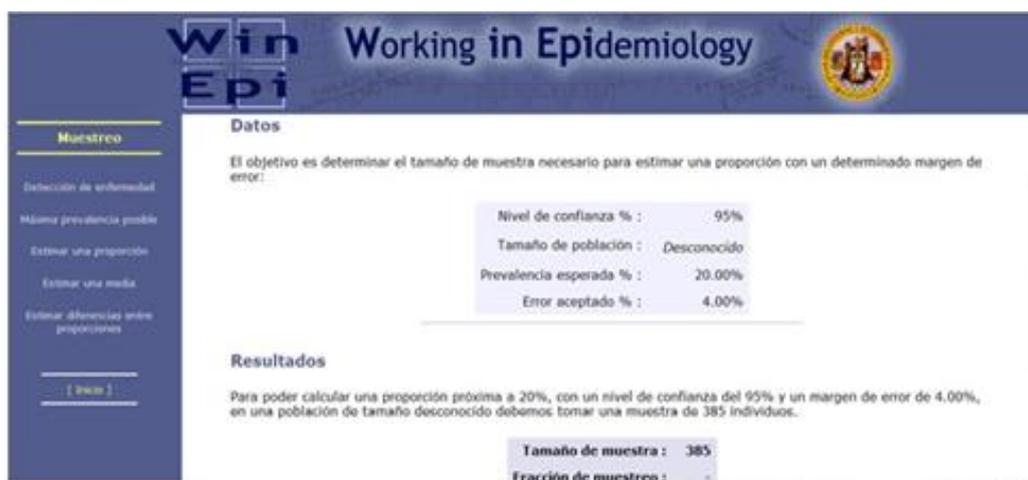


Figura 8. Determinación del tamaño de muestra a través del programa Win Epi 2

El método de muestreo fue de acuerdo al resultado del programa Win Epi 2. Cabe señalar que la mayor concentración de ganado caprino se localiza en los municipios del sur del estado de Nuevo León, como son: Dr. Arroyo, Aramberri, Galeana, Mier y Noriega, Iturbide y Zaragoza, y en el caso del ganado bovino lechero, este se localizan principalmente en los municipios cercanos al área metropolitana de Monterrey, como son: General Escobedo, Zuazua, Apodaca y Ciénega de Flores.

3.4 Colección de las muestras

El criterio utilizado para el muestreo se basó en que los sistemas de producción agropecuaria en estado de Nuevo León se desarrollan en el medio rural, y muchos de ellos son de traspatio con pastoreo en tierras comunales o ejidales, con poca tecnificación y deficiencias zoonositarias. Los municipios del sur y al norte de Apodaca es donde se concentran el mayor número de queserías y/o explotaciones en el estado, en los cuales, en su mayoría, son directamente los ganaderos los que elaboran el producto con leche cruda (sin pasteurizar) y con procesos tradicionales.

Se colectaron 386 muestras de queso artesanal de cabra y/o vaca para este estudio, el cual se realizó durante los años 2009 al 2012 en diferentes explotaciones y/o puntos de venta (mercados y vendedores ambulantes) en 26 de los 51 municipios totales que componen el estado de Nuevo León, ya que en el resto de los municipios es casi nula la producción.

A la par de la obtención de muestras, se obtuvieron las respuestas de una encuesta en la cual se asentó la fecha de la colección, y se preguntó sí los quesos se elaboraron con leche de vaca, cabra o mixtos, el origen y municipio donde se colectaron así como el origen donde se elaboraron los quesos lo cual se observa el formato en la en la Tabla 2 y la información se encuentra en el anexo 1.

Tabla 2. Encuesta elaborada al momento de colectar la muestra.					
Numero de Muestra	Origen de Producción	Queso Elaborado con leche de:	Punto de Venta	Origen de la Colección Municipio	Fecha
La información se encuentra en el anexo 1					

De los municipios muestreados se destacan los del sur del estado Nuevo León (con una mayor cantidad de ganado caprino) como son: Dr. Arroyo, Aramberri, Galeana, Mier y Noriega, Zaragoza y al Norte: Apodaca (con ganado bovino), por ser los de mayor producción o comercialización de queso artesanal con leche cruda (sin pasteurizar) y con procesos tradicionales. Estos quesos son de circulación local o regional, y tienen como nichos de mercado en las mismas explotaciones y/o los puntos de venta (mercados o vendedores ambulantes), para los consumidores de esos mismos municipios o el área metropolitana de Monterrey, lo cual se puede apreciar en la Figura 9.



Figura 9. Fotografías de venta de queso en las explotaciones y/o puntos de venta (Mercados y vendedores ambulantes)

De los quesos colectados muchos proceden de los diferentes municipios y algunos otros de diferentes estados de la República Mexicana.

Cabe señalar que la leche con la que se elaboran los quesos puede estar contaminada con *Brucella* spp y los lugares donde se procesan los quesos, así como los puntos de venta (mercados y vendedores ambulantes) donde se expenden, tienen deficientes prácticas higiénicas en la elaboración, manipulación, manejo y exhibición del queso donde además la refrigeración generalmente no es la adecuada.

3.5 Procesamiento de las muestras

Para el procesamiento se colectaron y procesaron muestras de queso de aproximadamente 200g, las cuales se depositaron en bolsas Ziplok® que fueron selladas e identificadas individualmente. Esto se realizó en base a las especificaciones del método de muestreo de la OIE (OIE, 2007). Además, se recabó la siguiente información: número de muestra, fecha de la colección, origen, procedencia, especie de la leche con la que se elaboró, propietario y/o punto de venta. Posteriormente, se introdujeron en una hielera

conteniendo gel refrigerante y fueron transportadas al laboratorio de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), donde se almacenaron a una temperatura de 4°C para su posterior extracción de ADN.

3.6 Método de extracción del ADN Genómico

El procedimiento de extracción del ADN de las muestras de queso se realizó en base a las recomendaciones del fabricante del Kit comercial utilizado Wizard® Genomics DNA Purification Kit (Promega, EEUU). El procesamiento de todas las muestras se efectuó bajo la campana de seguridad biológica (Termo Scientific 1300 series A2, EEUU). Esto con la finalidad de evitar contaminaciones entre las muestras y el personal que trabaja en el laboratorio. El procesamiento consistió en pesar 2,0 gr de queso en una bolsa estéril; en la cual se adicionaron 10 ml de una solución de tampón fosfato salino (PBS) (Bio Basic Inc. Markham, Ontario, Canadá), los cuales se homogenizaron manualmente. A continuación, se extrajo 1,0 ml de la mezcla que se depositó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Como paso seguido se centrifugó a 16,000 g durante 2 minutos y se desechó el sobrenadante. Al contenido del tubo se le agregaron 600 µl de una solución de lisis de ácido nucleico (Nuclei Lysis Solution, Promega), se mezcló en un homogeneizador y se incubó durante 5 minutos a 80°C. Después se enfrió a temperatura ambiente durante 5 minutos, tras los que se le adicionaron 3 µl de solución RNAasa y se mezclaron e incubaron a 37°C, durante 60 minutos. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente durante 5 minutos. Como paso seguido, se le adicionaron 300 µl de una solución de precipitación de proteínas y se mezclaron en un homogeneizador y se incubaron durante 5 minutos en congelación a -20°C. Tras centrifugar a 16,000 g durante 3 minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf con 600 µl de alcohol isopropanol (Bio Basic Inc.) a temperatura ambiente y se mezclaron por inversión, tras lo que se incubaron durante 5 minutos a -20°C. Como siguiente paso, se centrifugó a 16,000 g durante 3 minutos descartando el sobrenadante. El precipitado se lavó con 600 µl de etanol al 70% (Jalmerk, México) a temperatura ambiente y se centrifugó a 16,000 gravedades durante 2 minutos. Tras ello se aspiró el etanol y se secó el precipitado incubándolo a 37°C durante 20 minutos. La pastilla obtenida se resuspendió con 40 µl de la solución de hidratación de ADN y se incubó durante 1 hora a 65°C, tras lo que se procedió al análisis del ADN contenido.

Para confirmar la extracción del ADN bacteriano extraído y todos los productos de PCR obtenidos, se visualizaron por medio de la técnica de electroforesis en un gel de agarosa con una concentración de 0,8% (DNA) y de 1,5% (PCR), los cuales fueron revelados con bromuro de etidio (1 mg/ml). Realizando la electroforesis a 110v y 35mA durante 25 minutos (DNA) y 60 minutos (PCR) en cama de electroforesis horizontal (Enduro™ 300v, Labnet Internacional inc., Edison, New Jersey, EEUU), visualizando las bandas de ADN y productos de PCR bajo la luz ultravioleta por medio del transiluminador MultiDoc it (UVP, Upland, CA, EEUU). El resto del ADN se refrigeró a 4°C para su posterior utilización.

3.7 Análisis y cuantificación del ADN

La espectrofotometría UV permite confirmar que se cuenta con cantidad suficiente de ácidos Nucleicos (ADN/ARN) de calidad adecuada antes de realizar ensayos de PCR (Rodríguez Traduchy, 2014; Wilfinger et al., 1997). Por lo que procedió a evaluar la concentración y la pureza del ADN bacteriano obtenido para lo cual se utilizó el espectrofotómetro ND 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU; Figura10). La pureza se cuantificó mediante un rango de absorbancia a dos longitudes de onda UV 260 nm y 280 nm.



Figura 10. Nano Drop ND 1000

3.8 Cebadores utilizados

Los cebadores utilizados fueron B4 y B5, previamente reportados por Baily *et al.* (1992) y Marianelli *et al.* (2008), y que correspondían a 223 pares de bases (pb) de un fragmento del gen que codifica para la proteína antigénica de la membrana, y que amplifican la secuencia de 31 kDa BCSP31. La secuencia de estos cebadores es: 5'TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA 3' y 5'CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG 3'.

3.9 Optimización de las condiciones de amplificación estandarización de la técnica de PCR

Para llegar a las condiciones óptimas se realizó un gradiente para determinar la temperatura óptima de alineamiento con las condiciones de amplificación, en la cual se varió la temperatura de 52.2 a 62.2°C, para lo cual se realizó la PCR de punto final utilizando el termociclador Maxygen II (Axygen, Corning Life Sciences, Unión City, CA, EEUU), y los cebadores B4 y B5. Así mismo, se utilizaron las cepas de referencia de *Brucella melitensis* M16 y *Brucella abortus* 2308 como controles positivos proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México (INIFAP), y agua mili Q como control negativo.

3.10 Amplificación del ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se realizó partir del ADN extraído utilizando los cebadores B4 y B5 anteriormente descritos. Para ello se requirió preparar un volumen total de la reacción de 25 µl compuesto por 0,5 µl de DNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatados) 1 µl de Cebador F, 1 µl de Cebador R, 2,5 µL de Buffer, 0,75 µl de MgCL₂, 1 µl de DNA, 0,25 µl de enzima Taq-Polimerasa y 18,5 µl de agua de grado molecular. Como controles positivos se utilizaron las cepas de referencia de *Brucella abortus* 2308 y *Brucella melitensis* 16 M. Para todas las reacciones de amplificación se utilizó el Termociclador Maxygen II (Axygen), con un protocolo de PCR que incluyó una desnaturalización inicial a 93°C durante 2 minutos durante un ciclo, seguido por 35 ciclos que se inician con una desnaturalización a 93°C por 1 minuto, un alineamiento a 60°C durante 30 segundos, una

extensión a 72°C por 30 segundos y un ciclo para una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa y el tamaño esperado de la amplificación del producto de *Brucella* spp fue de 223 pb.

3.11 Especificidad de la técnica de PCR

Para constatar la especificidad de la técnica se obtuvo ADN de las cepas de *Bartonella henselae*, *Escherichia coli*, *Malassezia pachydermatis*, *Leptospira* spp, *Borrelia burgdorferi* y *Listeria monocytogenes* proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. Posteriormente se realizó la PCR junto con el control positivo de *Brucella* spp y control negativo.

3.12 Secuenciación de los productos amplificados de PCR

Para confirmar la identidad de los productos de PCR positivos a *Brucella* spp se seleccionaron al azar ocho de ellos que correspondían a diferentes municipios, de los cuales los segmentos amplificados se enviaron para su secuenciación al Laboratorio Macrogen (Macrogen Corp.) de los Estados Unidos de América. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Edit Seq versión 13, del Software DNASTAR (Madison, WI, EEUU). Las secuencias consenso fueron compradas por homología en la base de datos del Genbank® <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, mediante el programa BLAST, versión 2.6 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, EEUU) (Camacho et al., 2009) <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, para buscar homologías con secuencias previamente reportadas de *Brucella* spp.

3.13 Análisis de datos obtenidos

Los datos obtenidos fueron capturados en una hoja de cálculo Excel 2007 y los resultados se analizaron para significancia de datos categóricos a través de la prueba de Chi-Cuadrada (X^2) de Pearson, Prueba de Razón de Verosimilitudes y Test Exacto de Fisher, se aplicó cuando se presentaron más del 20% de valores esperados menores de 5), con la finalidad de asociar punto de venta, procedencia, año de la colecta y presencia de *Brucella* spp en los quesos recolectados en 26 municipios de N.L.

Cabe señalar que en México los censos se realizan por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) cada 10 años, por lo que se realizó la estimación para los años de la colección de muestras 2009 al 2012, en base a datos publicados por el INEGI los años 2005, 2010 y 2015. Se estimaron los censos de cada municipio para cada año interpolando los datos censales del 2005, 2010 y 2015 mediante una ecuación lineal.

La estimación del efecto del municipio y del año sobre la incidencia acumulada de brucelosis humana, se ha determinado mediante un modelo lineal generalizado (GLM) ponderando por el censo estimado del primer año de la serie analizada. Las diferencias entre municipios y años se han evaluado creando subconjuntos homogéneos basados en la prueba *post hoc* de Duncan.

La correlación entre la incidencia acumulada de brucelosis humana con la frecuencia de detección de *Brucella* spp en quesos, se ha determinado mediante el coeficiente de correlación de Spearman, ponderando por el número de quesos analizados cada año en cada municipio.

Los análisis estadísticos se han llevado a cabo con el programa IBM SPSS 19.0 (IBM Armonk, New York, EEUU) para Windows y se ha fijado el error alfa en 0,05.

Como parte del análisis de resultados, se planteó comparar la presencia de casos positivos a *Brucella* spp en humanos registrados en el estado de Nuevo León por municipio y compararlo con la presencia de dicho microorganismo en quesos artesanos. Sin embargo, a pesar de existir reportes oficiales por parte de la Secretaría de Salud, respecto a los casos y la incidencia de brucelosis en humanos por Estados de la República Mexicana, en éstos no se desglosa la información por municipio, y para nuestro estudio se requería, motivo por el cual se utilizó como fuente primordial de dicha información para realizar la investigación las estadísticas de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación del tamaño de muestra y colección

Como ya se indicó en el apartado de materiales y métodos, para el presente estudio se utilizaron como material biológico quesos artesanales de 26 de los 51 municipios que conforman el estado de Nuevo León, durante el periodo de septiembre de 2009 a junio de 2012. Se colectaron un total 386 muestras, una más de lo que se determinó como el tamaño de muestra óptima, que fue de 385 de acuerdo al resultado del programa Win Epi 2,0, tomando en cuenta un Error aceptado (E) de 4%, con una prevalencia esperada de 20% y un Nivel de Confianza (NC) del 95%. En la Figura 11 podemos observar la localización geográfica de los municipios donde se realizó el muestreo y el número de muestras por municipio y total.

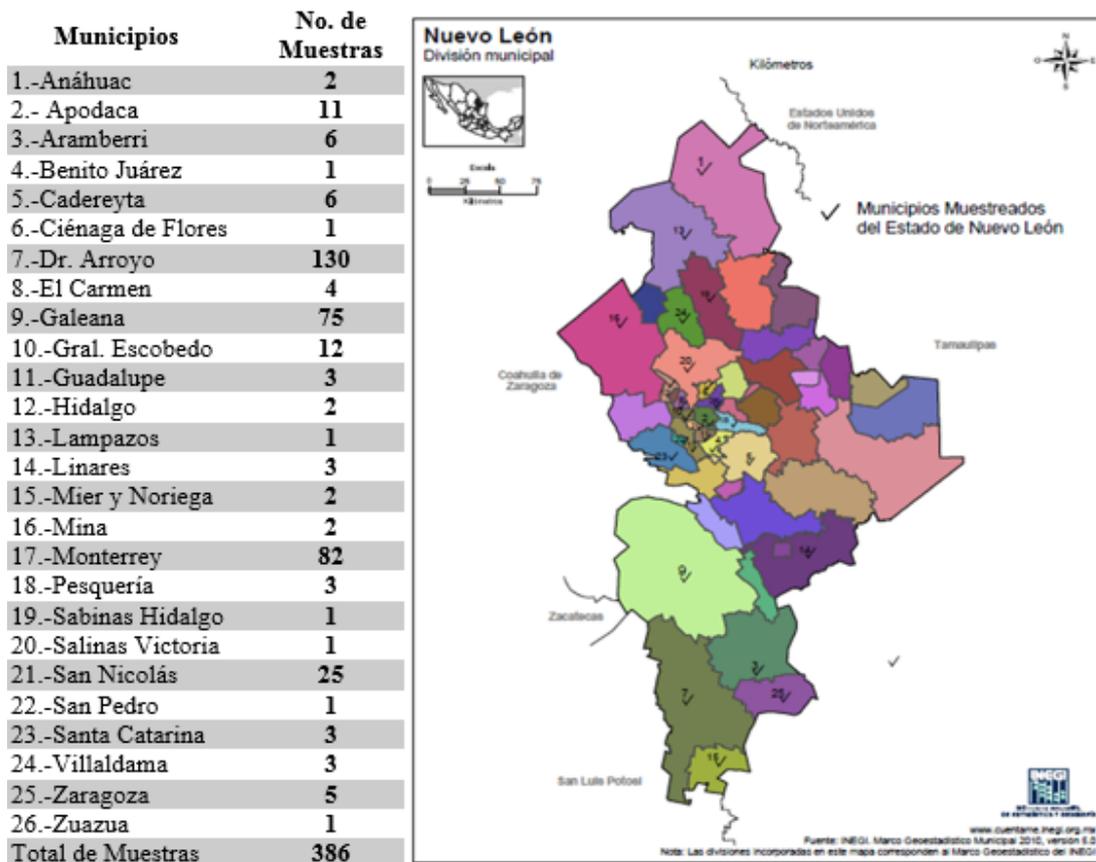


Figura 11. Localización geográfica de los municipios muestreados y total de muestras

Por otro lado, al realizar el muestreo y como parte de éste, se aplicó una encuesta en donde además de otros datos, se consignó el lugar de procedencia de los quesos, encontrando como resultado que éstos fueron elaborados en nueve estados de la República Mexicana, incluido el estado de Nuevo León, lo que se puede observar en la Tabla 3

Tabla 3. Procedencia de quesos colectados en Municipios y el área Metropolitana de Monterrey, N.L.	
Estado de Procedencia	No de Muestras
Nuevo León	293
Chiapas	2
Chihuahua	1
Coahuila	21
Guanajuato	5
San Luis Potosí	13
Tamaulipas	6
Veracruz	5
Zacatecas	1
Origen Desconocido	39
Total de Muestras	386

4.2 Extracción y cuantificación del ADN Genómico

Todos los productos de la extracción del ADN bacteriano extraído y de la PCR obtenidos se separaron por medio de la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y 1,5%, tiñendo las bandas de ADN con bromuro de etidio, y visualizándolas bajo la luz ultravioleta por medio del transiluminador MultiDoc it (UVP, Upland, CA, EEUU). en un rango de 254/365nm, tal como se puede observar en la Figura 12.

4.2.1 Cuantificación de ADN

El análisis de la concentración y pureza del ADN obtenido se cuantificó mediante un rango de absorbancia a dos longitudes de onda de UV, 260 nm y 280 nm. La concentración final se ajustó a 150 ng/µl.

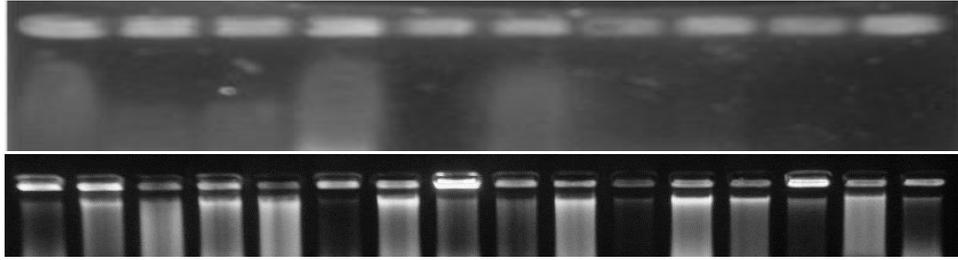


Figura 12. Bandas de los ADN en geles de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio

4.3 Estandarización de la técnica de PCR para determinar la presencia de *Brucella* spp.

4.3.1 Optimización de las condiciones de Amplificación de la PCR

La temperatura óptima de alineamiento de los cebadores se estableció en 60 °C, siendo esta temperatura en la que mejor se amplificó, por lo que resultó ser la más adecuada para el alineamiento. Los resultados de las condiciones optimizadas de amplificación del gradiente se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de amplificación			
Actividad	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	93	2 minutos	1
Desnaturalización	93	1 minuto	35
Alineamiento	60	30 segundos	35
Extensión	72	30 segundos	35
Extensión final	72	10 minutos	1

Se estandarizó la técnica para determinar la presencia de *Brucella* spp en quesos artesanales y los productos amplificados se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa 1,5% y el tamaño esperado de la amplificación (parte del fragmento del gen BSCP31) del producto de *Brucella* spp fue de 223 pb, tal como se puede apreciar en la Figura 13.

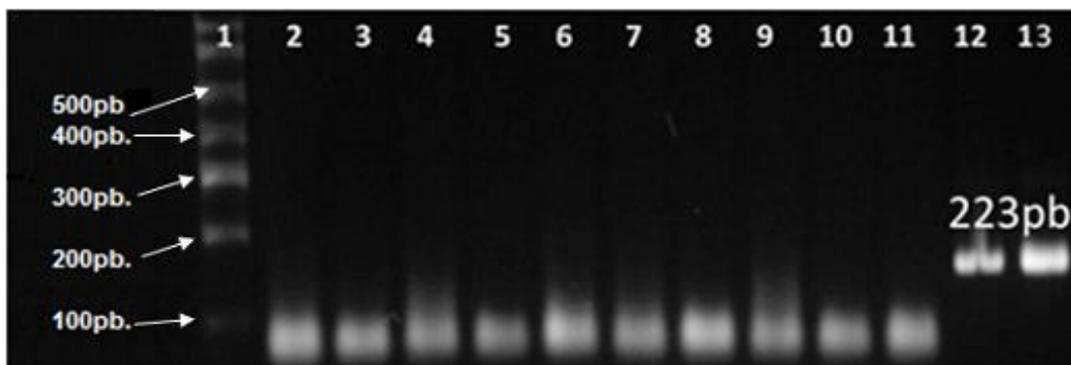


Figura 13. Productos amplificados por electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio, donde fragmento esperado es 223pb.

Carril 1.- Marcador de Peso Molecular (100pb DNA Ladder Marca GenScript), Carril 2.- Control Negativo, Carriles. -3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11 Muestras de queso, Carril 12.- Control Positivo *B. abortus*, Carril 13.- Control Positivo *B. melitensis*.

4.4 Límite de detección por medio de la PCR Punto Final

Se estandarizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Punto final, la cual se realizó con ADN de las muestras de queso y de controles positivos. Para determinar el límite de detección, se realizaron diferentes diluciones desde 10^6 (1 μg) a 10^{15} (1fg). Esta técnica de PCR presenta gran sensibilidad ya que el límite de detección del equipo resultó ser de 100 pg, lo que equivale a dos copias de ADN de *Brucella* spp, como se puede observar en la Figura 14.

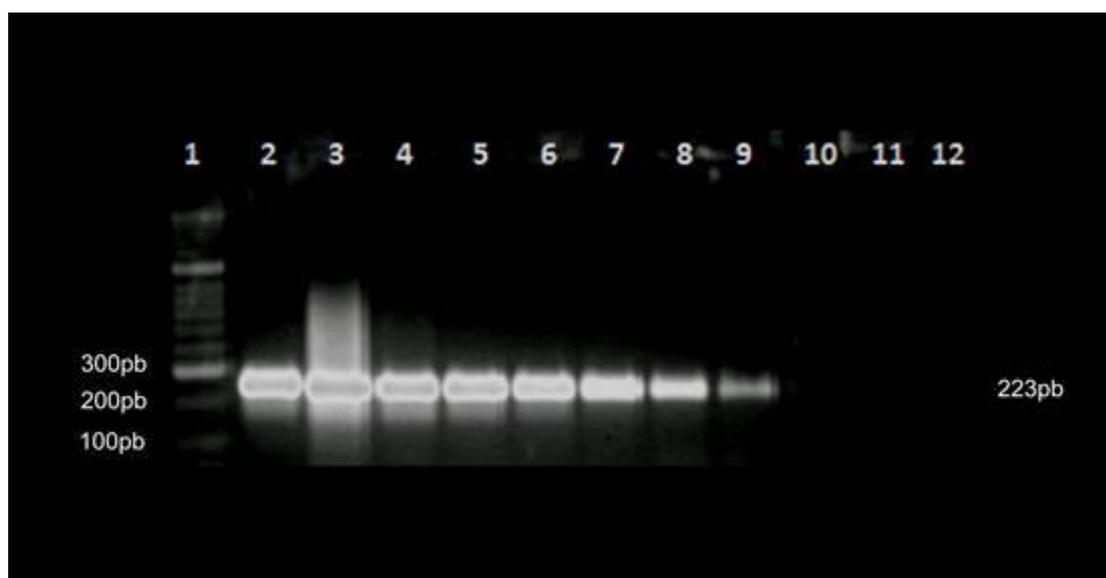


Figura 14. Límite de detección ADN de *Brucella* spp.

Carril 1.- Marcador de Peso Molecular (100pb DNA Ladder Marca GenScript), diluciones Carril 2-8, Carril 12 Control negativo.

4.4.1 Amplificación del ADN de *Brucella* spp por medio de la PCR

Con posterioridad a la estandarización, se procedió a realizar la PCR Punto Final para analizar las 386 muestras de quesos colectadas y procesadas, y detectar la amplificación de la fracción que corresponde al fragmento de 223 pb que identifica la parte BSCP 31 de este gen, que se utilizó para determinar la presencia ADN de *Brucella* spp en las muestras de quesos. En las Figuras 15 y 16 se puede observar la amplificación de los controles positivos y de algunas de las muestras procesadas que resultaron positivas.

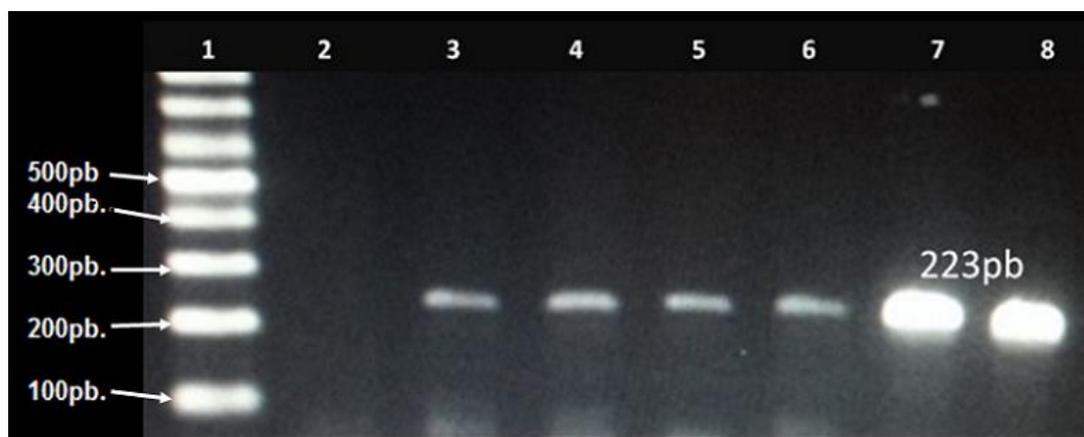


Figura 15. Amplificación de ADN de *Brucella* spp a partir de Muestras

Carril 1 Marcador de Peso Molecular (100pb DNA Ladder Marca GenScript), Carril 2.-Control Negativo, Carril 3.-Muestra 44, Carril 4.-Muestra 47, Carril 5.-Muestra 66, Carril 7.-Control Positivo *B. abortus*, Carril 8.Control Positivo *B. melitensis*



Figura 16. Amplificación de ADN de *Brucella* spp a partir de Muestras

Carril 1.-Marcador de Peso Molecular (100pb DNA Ladder marca GenScript), Carril 2.-Control negativo, Carril 3.-Muestra 48, Carril 4.-Muestra 1, Carril 5.-Muestra 67, Carril 6.-Vacuna *B. melitensis*, Carril 7.-Vacuna *B. abortus* S 19, Carril 8.-Queso inoculado con Vacuna *B. melitensis*, Carril 9.-Queso inoculado Vacuna RB51, Carril 10.-Queso inoculado Vacuna S19.

4.4.2 Especificidad de la técnica de PCR

La técnica de PCR resultó ser específica para *Brucella* spp ya que al desafiar la técnica con los ADN de las cepas de *Bartonella henselae*, *Escherichia coli*, *Malassezia pachydermatis*, *Leptospira* spp, *Borrelia burgdorferi* y *Listeria monocytogenes*, además del control positivo de *Brucella* y agua mili Q como control negativo, solamente amplificó el control positivo de *Brucella*, lo que nos confirma la especificidad de la técnica, tal como se puede observar en la Figura 17.

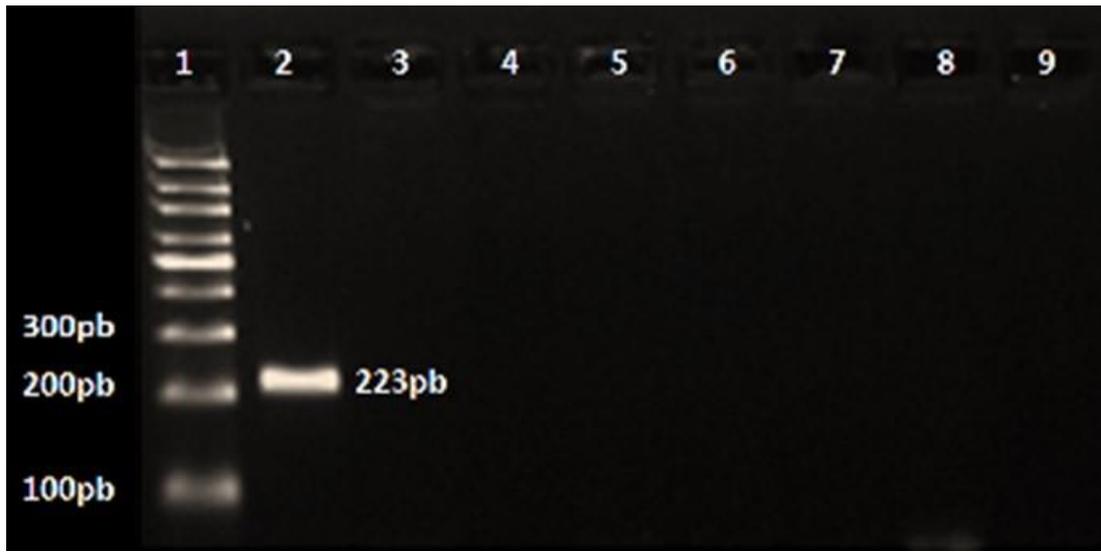


Figura 17. Especificidad de la Técnica de PCR

Carril 1.-Marcador de peso Molecular, Carril 2.-Control positivo *Brucella*, Carril 3.-*Bartonella henselae*, Carril 4.-*Escherichia coli* Carril 5.-*Malassezia pachydermatis*, Carril 6.-*Leptospira* spp, Carril 7.-*Borrelia burgdorferi*, Carril 8.-*Listeria monocytogenes*, Carril 9.-Control negativo.

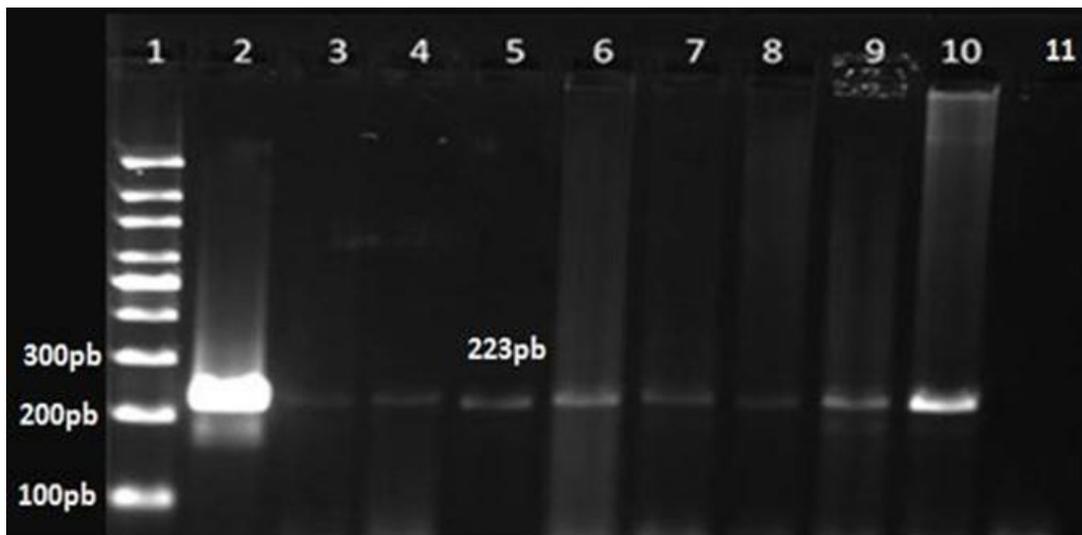


Figura 18. Productos amplificados que se enviaron a secuenciar

(Muestras positivas) Carril 1.-Marcador de peso Molecular, Carril 2.-Control positivo, Carril 3.-Muestra 23, Carril 4.-Muestra 24, Carril 5.-Muestra 71, Carril 6.-Muestra 183, Carril 7.-Muestra 226, Carril 8.-Muestra 269, Carril 9.-Muestra 339, Carril 10.-Muestra 298, Carril 11.-Control negativo.

4.4.3 Secuenciación de los productos amplificados de PCR

Para confirmar la identidad de las muestras que resultaron positivas, se seleccionaron al azar ocho productos de amplificación, los cuales se pueden observar en la Figura 18.

Posteriormente, estos productos se enviaron al laboratorio MacroGen® USA para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se editaron en el programa EditSeq, obteniéndose las secuencias consenso que se pueden observar en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencias consenso obtenidas en el programa EditSeq	
Número de Muestra	Secuencias consenso obtenidas
23	TCCATTGATATTGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGAT TGCCATTGGGCTATAACGGCACCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTAC CCGAAACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGAAGGCAAGCGOGACC GATT
24	TCCATTGATATTGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTT GCCTATTGGGCTATAACGGCACCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTAC CCGAAACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCGACCGATT T
71	CCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTGCCTATTGGGCTATAACGGCA CCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCGGAAACGATCCATATCGTTG CGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCGA
183	ATATTGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTGCCTATT GGGCTATAACGGCACCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTACCCGGAAA CGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGOACC
226	TCCATTGATATTGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTT GCCTATTGGGCTATAACGGCACCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTAC CCGAAACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCGACC
269	GATCATTGATATTGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACG TTGCTATTGGGCTATAACGGCACCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTT ACCCGAAACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCGACC
339	TATTGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTCTATTGG GCCTATAACGGCACCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGAAAC GATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCGACC
298	GATATTGGCTCGGTTGCCAATATCAATGCGATCAAGTCGGGCGCTCTGGAGTCCGGCTTTACGCAGTCAGACGTTGCCTAT TGGGCTATAACGGCACCGGCTTTATGATGGCAAGGGCAAGGTGGAAGATTTGCGCCTTCTGGCGACGCTTTACCCGGA AACGATCCATATCGTTGCGCGTAAGGATGCAAACATCAAATCGGTGCGCAGACCTGAAAGGCAAGCGCGACC

Estas secuencias se compararon para analizar su homología con las secuencias reportadas previamente del gen que codifica la proteína BSCP31 de *Brucella* spp, de 223 pb, en el GenBank, mediante el programa BLAST 2.7 (Camacho *et al.*, 2009). Los resultados mostraron un 100% de homología con las secuencias reportadas en el GenBank, como se puede observar en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la homología de las secuencias del gen BSCP31 *Brucella* spp.

23,24,71,183, 226,269,339, 298	100%	LT963350.1, LT963348.1, LT962953.1 Johansen B.T. Direct Submission Journal Submitted (08/Nov/2017) Norwegian Institute of Public Health Norway	CP023308.1, Paradiso, R., Orsini, M.,Camma', C.,Borriello,G. and Galiero,G. Complete Genome Sequencing of eight <i>Brucella abortus</i> biovar 1 strains isolated from water buffalo Journal Unpublished, (08/Sep/ 2017) Portici, Napoli 80055, Italy
		CP23213 Borriello,G. and Galiero,G. Direct Submission Journal Submitted (04- Sep-2017) Animal health, IZSM-Portici, Via Salute 2, Portici, Napoli 80055, Italy.	KX529834.1 Sun,M., Liu,Q.R., Song,W.J., Qiao,M.M., Gu,Q., Zhang,Q., Liu,B.H., Yang,X.S. and Chen,X.Z. The Identification and genetic characterization of <i>Brucella canis</i> in excretion from two sick pet dogs Journal Unpublished
		KX618689.1 Shahzad,A., Khan,A. and Saqib,M. Isolation and Characterization of <i>Brucella</i> from Cattle Journal Unpublished	Reference 2 (bases 1 to 223) Shahzad,A., Khan,A. and Saqib,M. Direct Submission Journal Submitted (28-JUL-2016) Department of Pathology, University of Agriculture, Jail Road, Faisalabad, Punjab 38000, Pakista

El resultado de la secuenciación nos confirma que las muestras que resultaron positivas corresponden a *Brucella* spp y de acuerdo con la metodología seguida y a las condiciones de trabajo para el método de la PCR que se empleó.

4.4.4 Frecuencias de *Brucella* spp en muestras de queso

En la Tabla 7, se pueden observar las frecuencias relativas de los municipios muestreados, con muestras positivas y negativas. Se detectó la presencia de *Brucella* spp en 16 de los municipios muestreados de un total de 26, que representan el 61,53%. En total se logró detectar 111 muestras positivas a *Brucella* spp de un total de 386 muestras analizadas, lo que representa el 28,76%, destacando con el mayor número de frecuencias positivas los municipios de Dr. Arroyo (37/130), Galeana (29/75) y Monterrey (21/82) (Figura 19).

Tabla 7. Frecuencias relativas obtenidas de los municipios muestreados y de muestras positivas a <i>Brucella</i> spp.			
Municipio	Negativo	Positivo	Total Muestras
Anáhuac *	0	2	2
Apodaca *	8	3	11
Aramberri *	3	3	6
Benito Juárez	1	0	1
Cadereyta *	5	1	6
Ciénega de Flores	1	0	1
Dr. Arroyo *	93	37	130
El Carmen *	3	1	4
Galeana *	46	29	75
General Escobedo *	10	2	12
Guadalupe *	1	2	3
Hidalgo	2	0	2
Lampazos *	0	1	1
Linares	3	0	3
Mier y Noriega*	0	2	2
Mina *	1	1	2
Monterrey *	61	21	82
Pesquería *	2	1	3
Sabinas Hidalgo	1	0	1
Salinas Victoria	1	0	1
San Nicolás de los Garza *	22	3	25
San Pedro Garza García	1	0	1
Santa Catarina	3	0	3
Villaldama *	1	2	3
Zaragoza	5	0	5
Zuazua	1	0	1
Total General	275	111	386
*16 Municipios con muestras positivas <i>Brucella</i> spp. = 61.53%	71,24%	28,76%	100%

En la figura 19 se pueden observar el 28,76% de los quesos artesanales que resultaron positivos y negativos a *Brucella* spp por PCR, por municipio en Nuevo León,

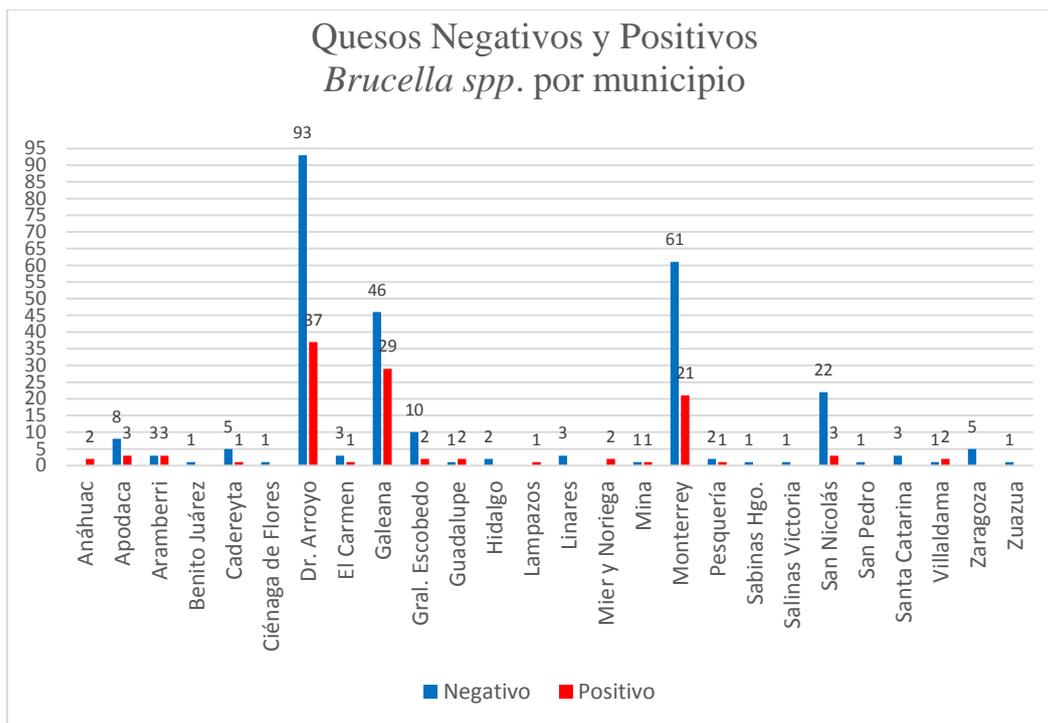


Figura 19. Quesos negativos y positivos por municipio

.En barras de color azul las muestras de quesos negativos y de color rojo las positivas a *Brucella* spp por municipio.

En la Tabla 8, se pueden observar los datos del análisis a través de la prueba de Chi-cuadrada de Pearson de las frecuencias de detección de *Brucella* spp, calculadas en base al número de muestras positivas a *Brucella* spp de quesos elaborados artesanalmente y a los años en que se colectaron (n=386). Donde se obtuvo una frecuencia de quesos positivos lo cual dio como resultado una frecuencia significativa ($p < 0,001$), lo que nos indica la presencia de la bacteria durante los años de colección y su asociación con el proceso de elaboración de los quesos de tipo artesanal. Representando este tipo de fabricación (tradicional) un problema muy importante de Salud Pública.

Tabla 8. Evolución de las frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales en Nuevo León

Año	N	Frecuencias	IC 95%	
2009	60	21,67%	13,12	33,62%
2010	115	25,22%	18,17%	33,87%
2011	177	37,85%	31,04%	45,19%
2012	34	5,88%	1,63%	19,09%

Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson, $p < 0,001$

En la Tabla 9, se observa el cálculo de frecuencias de detección de *Brucella* spp en base al origen de elaboración. En el estado de Nuevo León se observó una frecuencia de detección de un 32,08%, superior a los quesos artesanales elaborados fuera del estado (25,93%). Aunque no se observó una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las frecuencias, la tendencia dicta que dentro del estado la presencia de la bacteria representa un problema de salud pública, similar a los demás estados en conjunto, y con un porcentaje de detección parecido a los arrojados por otros ocho estados, aunque el número de muestras obtenidas en éstos es inferior.

Producción	N	Frecuencia	IC 95%	
Nuevo León	293	32.08%	27.00%	37,63%
Fuera de Nuevo León	54	25,93%	16,12%	38,93%

Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson, p=0,369

En la Tabla 10, se observan las frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos tipo artesanal en base al origen de procedencia de los quesos, siendo los estados de San Luis Potosí (53,85%), Coahuila (28,57%), Nuevo León (32,8%) y Tamaulipas (16,67%) los estados con mayor presencia de muestras positivas a *Brucella* spp. Aunque no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$), cabe señalar que son estados que colindan con el estado de Nuevo León, siendo probable que la cercanía de puntos de venta o mercados donde se comercializan sea un factor importante en la transmisión de la enfermedad.

Tabla 10. Frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales según estado de procedencia (ampliado)

Estado	N	Frecuencias	IC 95%	
Chiapas	2	0,00%	0,00%	65,76%
Chihuahua	1	0,00%	0,00%	79,35%
Coahuila	21	28,57%	13,81%	49,96%
Guanajuato	5	0,00%	0,00%	43,45%
Nuevo León	293	32,08%	27,00%	37,63%
San Luis Potosí	13	53,85%	29,14%	76,79%
Tamaulipas	6	16,67%	3,01%	56,35%
Veracruz	5	0,00%	0,00%	43,45%
Zacatecas	1	0,00%	0,00%	79,35%

Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes, $p=0,078$

Para obtener la frecuencia de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales se consideró la especie de procedencia de la leche (si es de vaca, cabra o de la mezcla de ambas especies) para la elaboración del queso. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre especie, individuales. Sin embargo estos resultados muestran diferencias significativas ($p=0,034$) al combinar la leche de vaca y la de cabra para la elaboración del queso, siendo el porcentaje de detección de *Brucella* spp de un 21,6% y 32,03 % para vaca y cabra, respectivamente, a un 40% al combinar ambas leches, aumentando de igual manera el riesgo de que más porcentaje de quesos estén contaminados (Tabla 11).

Tabla 11. Frecuencias de detección de *Brucella* spp en leche para la elaboración de quesos artesanales según especie

Especie	N	Frecuencias	IC 95%	
Cabra	256	32,03%	26,62%	37,98%
Cabra y Vaca*	5	40,00%	11,76%	76,93%
Vaca	125	21,60%	15,29%	29,60%

Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes, $p=0,086$

*** Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson tras excluir estrato “Cabra y Vaca”, $p=0,034$**

En la Tabla 12, se observaron las frecuencias en la detección de *Brucella* spp en quesos artesanales en base al año de colección, y a la especie animal de procedencia, encontrado

que el año de colección en la especie caprina sí juega un papel determinante en la presencia del microorganismo ($p= 0,004$) entre los años de muestreo del 2009 al 2012. Asimismo, la frecuencia de detección para la especie vaca no mostro diferencia significativa en los años de colección ($p= 0,367$).

Tabla 12. Evolución anual de las frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales según especie.

Año	Cabra		Vaca		P
	N	Frecuencias	N	Frecuencias	
2009	11	18,2%	47	21,3%	>0,999 ^F
2010	75	28,0%	39	17,9%	0,237 ^{X2}
2011	147	39,5%	28	32,1%	0,466 ^{X2}
2012	23	4,3%	11	9,1%	>0,999 ^F
P		0,004 ^{X2}		0,367 ^{X2}	

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson

F: Significación según prueba exacta de Fisher

En la Tabla 13, se puede observar la frecuencia de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales en base a los municipios de muestreo. Los municipios de Anáhuac, Lampazos, Mier y Noriega fueron los municipios con una mayor frecuencia de quesos elaborados artesanalmente con presencia de *Brucella* spp. ($p= 0,029$). Por otro lado, en 16 de los 26 municipios muestreados se detectó la presencia de *Brucella* spp en quesos de tipo artesanal, lo que representa un 61,53% de municipios con presencia del microorganismo

Tabla 13. Frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales según municipio de venta.

Municipio	N	Frecuencia	IC 95%	
Anáhuac	2	100,00%	34,24%	100,00%
Apodaca	11	27,27%	9,75%	56,57%
Aramberri	6	50,00%	18,75%	81,24%
Benito Juárez	1	0,00%	3,01%	79,35%
Cadereyta	6	16,67%	3,01%	56,35%
Ciénega de Flores	1	0,00%	0,00%	79,35%
Dr. Arroyo	130	28,46%	21,41%	36,75%
El Carmen	4	25,00%	4,56%	69,94%
Galeana	75	38,67%	28,46%	49,98%
Gral. Escobedo	12	16,67%	4,70%	44,80%
Guadalupe	3	66,67%	20,77%	93,85%
Hidalgo	2	0,00%	0,00%	65,76%
Lampazos	1	100,00%	20,65%	100,00%
Linares	3	0,00%	0,00%	56,15%
Mier y Noriega	2	100,00%	34,24%	100,00%
Mina	2	50,00%	9,54%	90,55%
Monterrey	82	25,61%	17,40%	36,00%
Pesquería	3	33,33%	6,15%	79,23%
Sabinas Hidalgo	1	0,00%	0,00%	79,35%
Salinas Victoria	1	0,00%	0,00%	79,35%
San Nicolás de los G	25	12,00%	4,17%	29,96%
San Pedro	1	0,00%	0,00%	79,35%
Santa Catarina	3	0,00%	0,00%	56,15%
Villaldama	3	66,67%	20,77%	93,85%
Zaragoza	5	0,00%	0,00%	43,45%
Zuazua	1	0,00%	0,00%	79,35%

Significación según prueba de Razón de Verosimilitudes, $p=0,029$

En la Tabla 14, se pueden observar las frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales según el área donde se sitúan los municipios donde se comercializan los quesos. Estos municipios se agruparon por áreas, siendo estas el área Rural y el área Metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Se observó una mayor frecuencia en la

detección del microorganismo en el área Rural (31,75%) en comparación con el área Metropolitana (23,13%), aunque sin mostrar una diferencia significativa ($p > 0,05$). Aunque las condiciones de urbanización suelen estar ligadas al grado de tecnificación en el proceso de elaboración de los quesos, no hay que olvidar que muchos de los quesos que se expenden en el Área Metropolitana de Monterrey proceden del área Rural.

Tabla 14. Frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales según municipio de venta (agrupado).

Municipio	N	Frecuencias	IC 95%	
Área Metropolitana	134	23,13%	16,80%	30,96%
Área Rural	252	31,75%	26,31%	37,73%

Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson, $p=0,075$

En la Tabla 15, se puede observar la evolución anual de las frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales según municipio de venta agrupados por áreas en las cuales se comercializan los quesos. Al analizar los datos del muestreo no se observaron diferencias estadísticas entre las áreas de colección de quesos. Sin embargo, en los municipios del área Rural, el año 2011 representó el año con mayor frecuencia de detección del microorganismo (40,4%), siendo significativamente mayor ($p=0,002$) que el año 2012 (4,5%).

Tabla 15. Evolución anual de las frecuencias de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales según municipio de venta (agrupado).

Año	Área Metropolitana		Área Rural		P
	N	Frecuencias	N	Frecuencias	
2009	36	19,4%	24	25,0%	0,609 ^{X2}
2010	50	26,0%	65	24,6%	0,865 ^{X2}
2011	36	27,8%	141	40,4%	0,163 ^{X2}
2012	12	8,3%	22	4,5%	>0,999 ^F
P	0,490 ^{X2}		0,002 ^{X2}		

X2: Significación según prueba Chi-cuadrado de Pearson

F: Significación según prueba exacta de Fisher

4.4.5 Correlación de los casos e incidencia de brucelosis en humanos con las frecuencias de quesos artesanales positivos a brucelosis por municipio

Cabe señalar que para la búsqueda de información respecto a los casos clínicos y la incidencia de brucelosis en humanos por municipio, se ha utilizado como fuente primordial los datos de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. Dicha recopilación de datos ha permitido ordenar, por municipio, los casos positivos y la tasa de incidencia de brucelosis en humanos durante los mismos años en que se obtuvieron las muestras de queso, es decir, del 2009 al 2012. Esta información fue el insumo necesario para realizar la correlación entre casos positivos de brucelosis en humanos y los quesos positivos a dicho microorganismo, por municipio.

En las Figuras de la 20 a la 23, se puede observar que la incidencia de brucelosis en la población humana en los municipios de Nuevo León, donde cada año durante el tiempo en que se muestreo (2009-2012) se presentó la enfermedad en humanos. De esto se concluye que la brucelosis en humanos en endémica en los municipios de Nuevo León y variable en cada municipio, ya que en ningún año durante el muestro dejó de estar presente en la población humana, variando e número de casos anuales de 1 a 79 en algunos municipios.

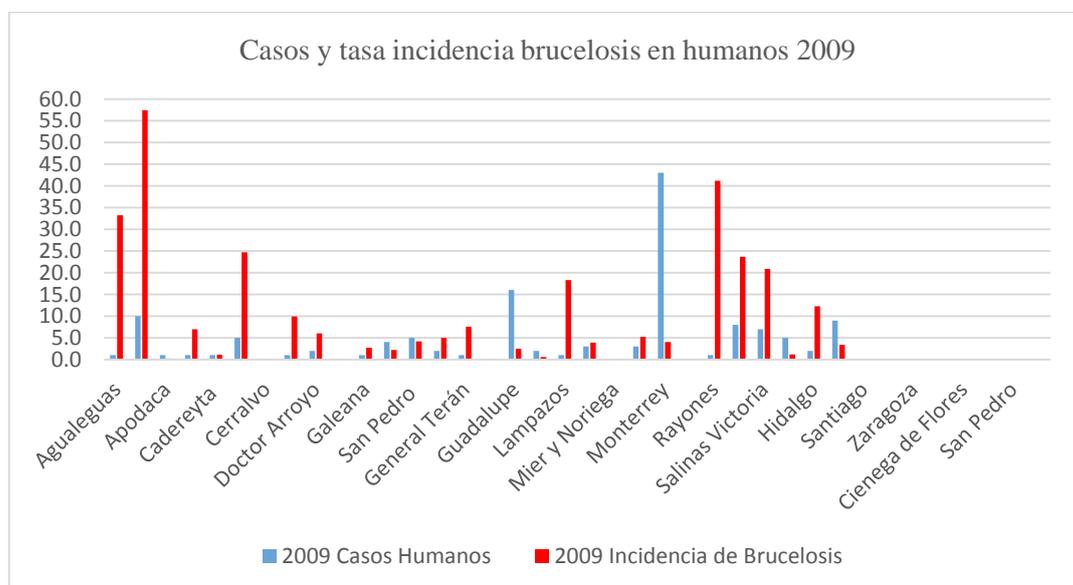


Figura 20. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en Nuevo León 2009
Casos barra de color azul e incidencia barra de color rojo.
Tasa de Incidencia por 100,000 habitantes.

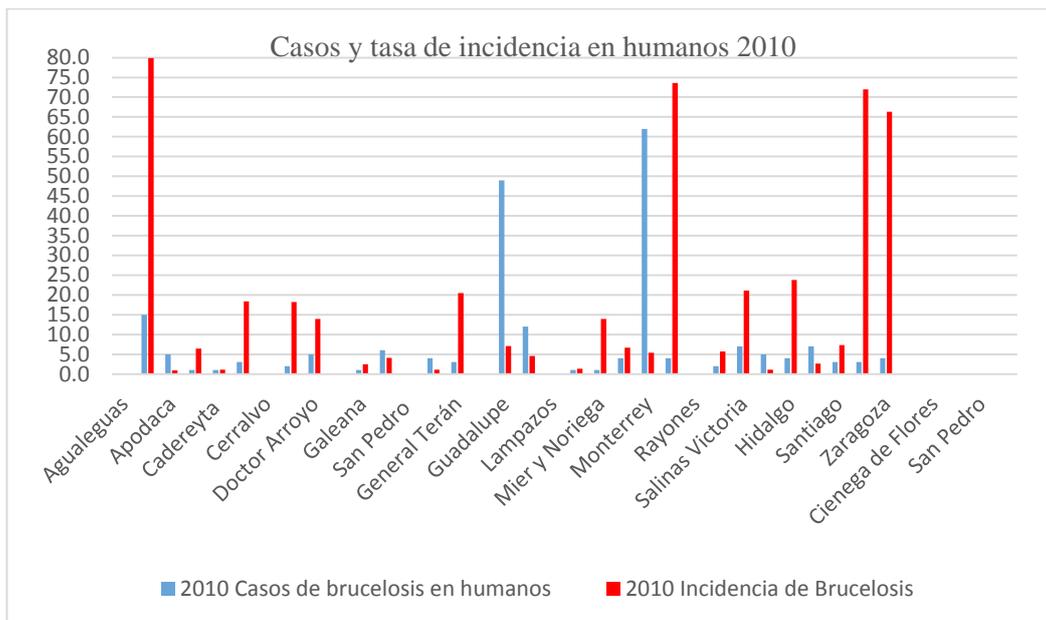


Figura 21. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en Nuevo León 2010
Casos barra de color azul e incidencia barra de color rojo de brucelosis en humanos
Tasa de Incidencia por 100,000 habitantes. Elaboración propia en base Anónimo (2015).
 (Anuario de Información, Sistema Único de Información Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología /SSA).

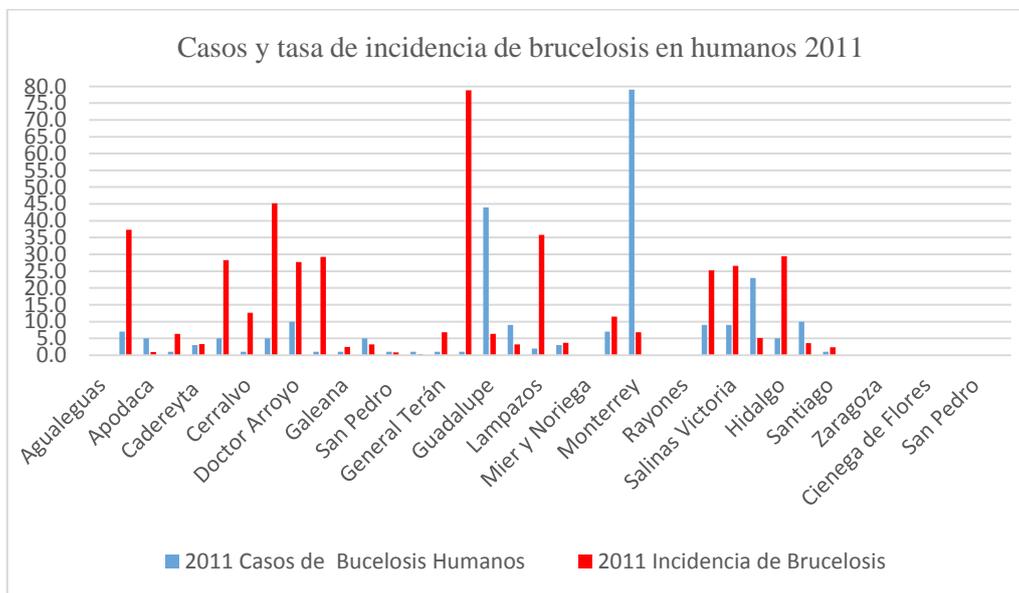


Figura 22. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en Nuevo León 2011
Casos barra de color azul e incidencia barra de color rojo de brucelosis.
Tasa de Incidencia por 100,000 habitantes. Elaboración propia en base Anónimo (2015).
 (Anuario de Información, Sistema Único de Información Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología /SSA).

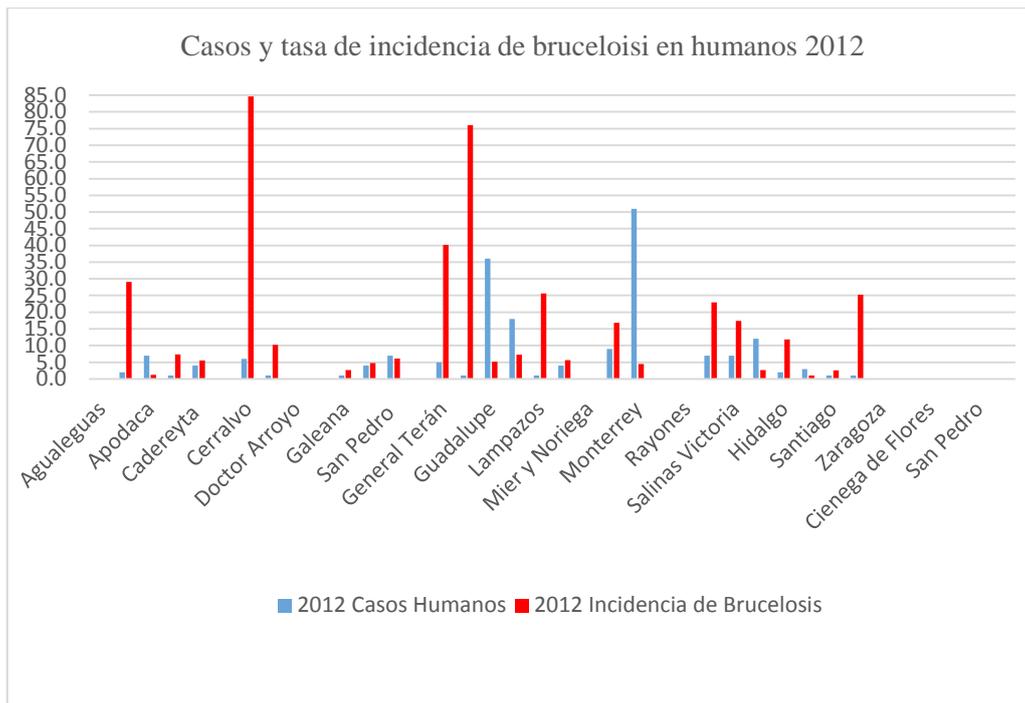


Figura 23. Casos e Incidencia de brucelosis en humanos por municipios en Nuevo León 2012
Casos barra de color azul e incidencia barra de color rojo de brucelosis
Tasa de Incidencia por 100, 000 habitantes. Elaboración propia en base Anónimo (2015).
 (Anuario de Información, Sistema Único de Información Epidemiológica / Dirección General de Epidemiología /SSA).

En la Tabla 16, se puede observar el número de casos y la incidencia de brucelosis en humanos por municipio y por año. Cabe señalar que en el listado no aparecen cinco municipios (Benito Juárez, Ciénega de Flores, Mina, Pesquería y Zuazua) ya que no se contaba con reportes de casos de brucelosis en humanos, aunque no hay que olvidar que en México existe una sub notificación de esta enfermedad. Así mismo se observa un aumento en la incidencia de casos de brucelosis en humanos entre los años 2009 y 2011, que coincide con la frecuencia de detección de *Brucella* spp en los mismos años durante el muestreo en el área Metropolitana y Rural de Nuevo León, siendo en los años 2010, 2011 y 2012 en los que se detectó un mayor número de muestras positivas, e igualmente el mayor número de casos en humanos.

Por otro lado, en los municipios de Anáhuac, Apodaca, Aramberri, Cadereyta, China, Galena, Villa de García, General Terán, Guadalupe, Juárez, Linares, Montemorelos, Monterrey, Sabinas Hidalgo, Salinas Victoria, San Nicolás de los Garza, Hidalgo y Santa Catarina, se observó una incidencia constante de brucelosis en humanos durante los cuatro años del presente estudio, de manera que de los 18 municipios antes mencionados 15 corresponden a las áreas de muestreo tanto en área Metropolitana como Rural.

**Tabla 16. Casos y tasa de incidencia de brucelosis en humanos por municipio y año
Comunicación personal (R. Hernández SSA 2015)**

Municipio	2009		2010		2011		2012	
	Casos	*Tasa	Casos	*Tasa	Casos	*Tasa	Casos	*Tasa
Agualeguas	1,0	33,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Anáhuac	10,0	57,4	15	79,9	7,0	37,3	2,0	29,1
Apodaca	1,0	0,2	5,0	0,9	5,0	0,9	7,0	1,2
Aramberri	1,0	7,0	1,0	6,4	1,0	6,4	1,0	7,3
Cadereyta Jiménez	1,0	1,1	1,0	1,1	3,0	3,3	4,0	5,6
El Carmen	5,0	24,7	3,0	18,4	5,0	28,3	0,0	0,0
Cerralvo	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	12,6	6,0	84,6
China	1,0	9,9	2,0	18,2	5,0	45,2	1,0	10,3
Doctor Arroyo	2,0	6,0	5,0	13,9	10,0	27,7	0,0	0,0
Doctor González	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	29,2	0,0	0,0
Galeana	1,0	2,7	1,0	2,5	1,0	2,5	1,0	2,7
Villa de García	4,0	2,2	6,0	4,1	5,0	3,2	4,0	4,7
San Pedro Garza García	5,0	4,2	0,0	0,0	1,0	0,8	7,0	6,1
General Escobedo	2,0	5,0	4,0	1,1	1,0	0,3	0,0	0,0
General Terán	1,0	7,6	3,0	20,5	1,0	6,8	5,0	40,2
General Treviño	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	78,8	1,0	76,1
General Zaragoza	0,0	0,0	4,0	66,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Guadalupe	16,0	2,5	49,0	7,1	44,0	6,4	36,0	5,1
Juárez	2,0	0,6	12,0	4,6	9,0	3,2	18,0	7,2
Lampazos	1,0	18,3	0,0	0,0	2,,	35,8	1,0	25,7
Linares	3,0	3,9	1,0	1,3	3,0	3,7	4,0	5,6
Mier y Noriega	0,0	0,0	1,0	13,9	0,0	0,0	0,0	0,0
Montemorelos	3,0	5,2	4,0	6,7	7,0	11,5	9,0	16,8
Monterrey	43,0	4,0	62,0	5,4	79,0	6,8	51,0	4,5
Los Ramones	0,0	0,0	4,0	73,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Rayones	1,0	41,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sabinas Hidalgo	8,0	23,7	2,0	5,7	9,0	25,3	7,0	22,9
Salinas Victoria	7,0	20,9	7,0	21,1	9,0	26,6	7,0	17,4
San Nicolás de los Garza	5,0	1,2	5,0	1,1	23,0	5,1	12,0	2,7
Hidalgo	2,0	12,3	4,0	23,8	5,0	29,4	2,0	11,8
Santa Catarina	9,0	3,4	7,0	2,6	10,0	3,6	3,0	1,0
Santiago	0,0	0,0	3,0	7,3	1,0	2,4	1,0	2,6
Villaldama	0,0	0,0	3,0	72,0	0,0	0,0	1,0	25,2
Total	125		214,0		249,0		191,0	
*Tasa de Incidencia por 100,000 habitantes								

En la Tabla 17, podemos observar la incidencia acumulada de brucelosis humana (por 100,000 habitantes) distribuida por municipios y ajustada según el censo estimado. El municipio de Anáhuac tiene una incidencia media acumulada de brucelosis humana del 46,17 %, estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Los municipios de General Treviño, Villaldama, Cerralvo, Salinas Victoria y China tuvieron una incidencia acumulada de brucelosis humana muy similar entre ellos, aunque inferior al municipio de Anáhuac. Los

municipios de Hidalgo, Los Ramones, Sabinas Hidalgo, Lampazos, General Terán, El Carmen y General Zaragoza presentaron una incidencia acumulada de brucelosis humana estadísticamente por debajo de los municipios antes mencionados.

Tabla 17. Incidencia acumulada de brucelosis humana (X 100,000 habitantes) distribuida por municipios ajustada según censo estimado. (ordenado por incidencia decreciente)

Municipio	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Anáhuac	46.17 ^a	25,51	10,9	81,2
General Treviño	39.93 ^{ab}	41,41	0,0	84,5
Villaldama	24.35 ^{ab}	29,79	0,0	72,9
Cerralvo	22,20 ^{ab}	31,79	0,0	76,8
Salinas Victoria	21,04 ^{ab}	2,82	17,0	24,3
China	20,74 ^{ab}	15,09	9,2	46,0
Hidalgo	20,15 ^{bc}	7,92	12,2	31,2
Los Ramones	18,98 ^{bc}	32,50	0,0	74,6
Sabinas Hidalgo	18,76 ^{bc}	7,78	5,8	25,8
Lampazos	18,69 ^{bc}	13,19	0,0	37,1
General Terán	17,28 ^{bc}	11,38	6,9	43,3
El Carmen	17,13 ^{bc}	11,38	0,0	35,0
General Zaragoza	16,83 ^{bc}	29,15	0,0	67,3
Doctor Arroyo	12,10 ^c	10,69	0,0	28,4
Montemorelos	9,37 ^c	3,94	5,2	15,1
Rayones	9,52 ^c	16,52	0,0	38,2
Doctor González	7,67 ^c	13,32	0,0	30,8
Agualeguas	7,58 ^c	12,71	0,0	28,9
Aramberri	6,44 ^c	0,07	6,4	6,5
Guadalupe	5,34 ^c	1,86	2,4	7,2
Monterrey	5,19 ^c	1,19	3,8	7,0
Juárez	3,90 ^c	1,96	0,9	6,3
Mier y Noriega	3,53 ^c	6,11	0,0	14,1
Linares	3,51 ^c	1,38	1,3	5,1
Santiago	3,08 ^c	2,69	0,0	7,4
Villa de García	3,07 ^c	0,73	2,2	4,2
Santa Catarina	2,66 ^c	1,01	1,1	3,6
San Pedro Garza García	2,65 ^c	2,33	0,0	5,7
Cadereyta Jiménez	2,58 ^c	1,42	1,2	4,4
San Nicolás de los Garza	2,54 ^c	1,68	1,1	5,2
Galeana	2,49 ^c	0,02	2,5	2,5
Apodaca	0,85 ^c	0,39	0,2	1,3
General Escobedo	0,48 ^c	0,42	0,0	1,1
Total	4,37	5,86	0,0	84,5

Significación estadística según GLM ponderado por censo estimado, $p < 0,001$. Superíndices distintos en la misma columna indican diferencias significativas según la prueba post hoc de Duncan ($p < 0,050$).

En la Tabla 18, se observa la incidencia acumulada de brucelosis humana (por 100,000 habitantes) distribuida por años y ajustada según censo estimado. Donde no se observaron

diferencias significativas ($p=0,132$), aunque la incidencia acumulada de brucelosis humana presentó su máximo nivel en el año 2011, con un 5,47.

Tabla 18. Incidencia acumulada de brucelosis humana (X 100,000 habitantes) distribuida por años ajustada según censo estimado

Año	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
2009	3,07	4,99	0,0	54,4
2010	4,78	7,24	0,0	81,2
2011	5,47	5,77	0,0	81,3
2012	4,13	4,88	0,0	84,5
Total	4,37	5,86	0.0	84.5

Significación estadística según GLM ponderado por censo estimado, $p=0,132$.

En la Figura 24, se puede observar la correlación entre la incidencia acumulada de brucelosis humana y la frecuencia de detección de *Brucella* spp en quesos artesanales por PCR. Donde se puede apreciar que el porcentaje de positividad no sigue un patrón en la gráfica. Sin embargo muestra una correlación significativa positiva entre la incidencia acumulada de brucelosis humana y la frecuencia de detección de *Brucella* spp en quesos por PCR, aunque el coeficiente de correlación de *Spearman* es bajo ($Rho=0,193$; $p<0,001$). El resultado de la correlación *Spearman* indica que la presencia de la *Brucella* spp en el queso solo explicaría un 20 %, aproximadamente, de los casos de brucelosis humana; el resto podría ser debido otras fuentes de infección.

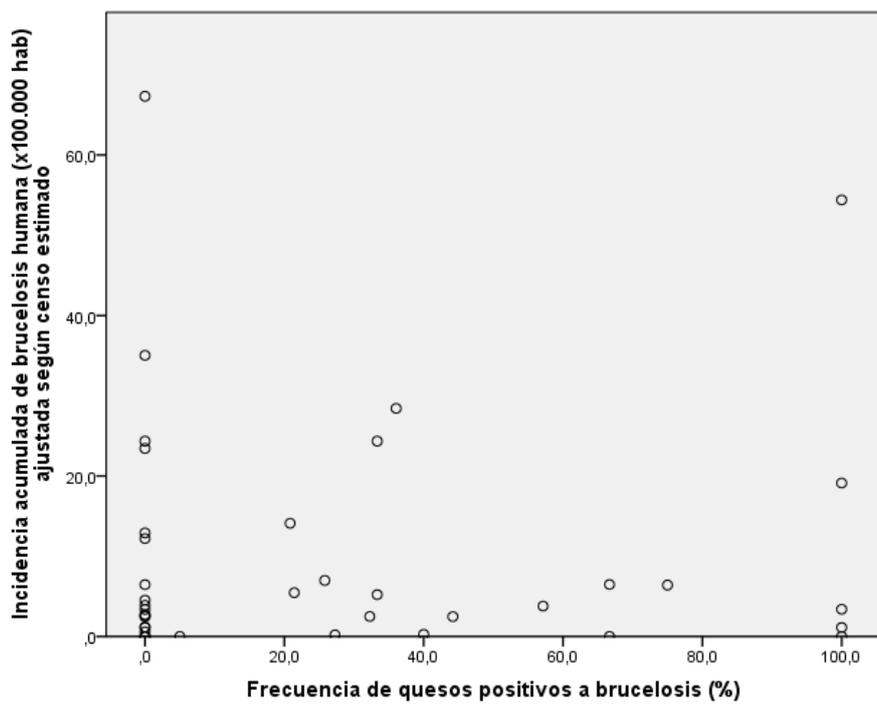


Figura 24. Correlación entre la incidencia acumulada de brucelosis humana y la frecuencia de detección de *Brucella* spp

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, luego de realizar el muestreo, quedó claramente expuesto que el sur del Estado presenta la mayor cantidad de ganado caprino, y, por ende, la mayor oferta de productos y sub-productos de este tipo de ganadería, entre ellos los quesos, en las mismas explotaciones o en los puntos de venta. Cabe señalar que en su mayoría los mismos ganaderos elaboran el producto con leche cruda (sin pasteurizar), y las condiciones de producción no son tecnificadas. También se adolece de medidas higiénicas en la elaboración del queso.

Estas observaciones son similares a lo mencionado por otros autores (Anónimo, 1988; López y col.,1992; Aréchiga y col., 2008), los cuales mencionan que la distribución geográfica de la seroprevalencia de la brucelosis humana guarda una estrecha relación con la distribución de ganado caprino y bovino en esas regiones; por consiguiente, son las zonas de mayor riesgo de México, debido fundamentalmente a las malas condiciones de crianza del ganado y a la gran producción y distribución de quesos sin ningún control sanitario, que muy probablemente están contaminados con *Brucella*. Guzmán y col. (2016) refieren que la vía más común por la que la población puede adquirir la brucelosis es por consumo de derivados lácteos no pasteurizados: leche cruda y quesos frescos, sobre todo de origen caprino y bovino.

En estudios realizados por García y col. (2014), sobre análisis de riesgo de brucelosis en el estado de Tlaxcala, México, donde aplicaron encuestas a la población, algunos de los datos observados son similares a los de nuestro estudio en Nuevo León, ya que los municipios situados principalmente al sur del estado (Dr. Arroyo, Galeana, Aramberri, Zaragoza) y al norte (Apodaca), son los de mayor producción o comercialización de quesos artesanales con leche cruda, y donde la mayoría de los productores no hierva la leche, siguiendo procesos tradicionales. Se trata de personas de escasos recursos económicos, que pastorean en terrenos ejidales. Posiblemente, a pesar de que los productores reciben cursos sobre el proceso de pasteurización, muchos de ellos no realizan dicho proceso y por consiguiente se siguen presentando casos de brucelosis en humanos.

El objetivo del presente estudio es similar al del realizado por Villanueva y col. (2013), enfocado a la situación sanitaria de las muestras de queso colectadas en puntos de venta (mercados y vendedores ambulantes), aunque dicho estudio se realizó en Veracruz, México, y su tamaño de muestra fue de tan sólo 60 quesos, mientras que nuestro estudio se realizó en Nuevo León, donde el tamaño de muestra fue de 386 quesos. Asimismo, los quesos artesanales colectados en nuestro estudio se expenden en las mismas explotaciones o en los puntos de venta (mercados y vendedores ambulantes) de los diferentes municipios, y algunos otros tienen su origen en diferentes estados de México. Sin embargo, la mayoría de los quesos son de venta o consumo local o regional, los cuales se comercializan o consumen en las poblaciones cercanas, así como en el área conurbada de la ciudad de Monterrey, Nuevo León, la cual se encuentra aproximadamente a 300 km del sur del estado donde se obtuvieron la mayor cantidad de muestras. Esta situación es similar a lo reportado por García y col. (2014), en un estudio realizado en la población de San José Teatalco, Veracruz; donde determinaron la presencia de diversos patógenos, incluida *Brucella* spp, y encontraron que el material estudiado (quesos) no pasteurizados se distribuía y comercializaba a una distancia mayor de 270 km, en la zona conurbada de Veracruz.

Álvarez y col. (2015b) mencionan que la movilización de lácteos hacia las zonas urbanas, como parte del proceso de comercialización, ha contribuido en buena medida a la diseminación de la brucelosis, sin importar qué tan alejados están los sitios de las zonas endémicas.

Lo que también coincide con otros autores (Luna y Mejía, 2002; Anónimo, 2006), es que el número de casos de brucelosis humana está directamente relacionados con el consumo de productos derivados de la leche no pasteurizados y productos conexos, que se movilizan hacia zonas urbanas, y de esta manera contribuyen a la diseminación de la brucelosis.

Así mismo, en un estudio realizado por Barroso y col. (2007), sobre un brote de brucelosis humana interprovincial por ingesta de queso fresco sin higienizar en los municipios españoles de Vélez-Rubio, en la provincia de Almería, y en Alcalá de Guadaíra, en la provincia de Sevilla (ambos de la comunidad autónoma de Andalucía), en los que se identificaron 10 casos 8 probables (aglutinaciones positivas a *Brucella* spp.) y 2

confirmados (hemocultivo positivo o seroconversión), que pertenecían a 7 familias distintas. De esas familias se identificaron un total de 28 expuestos, se recogieron muestras clínicas de todos ellos, y se detectaron 3 personas asintomáticas con aglutinaciones positivas a *Brucella* spp y para saber el origen de la contaminación se elaboró una encuesta epidemiológica y pudo conocerse que habían ingerido quesos frescos, que procedían de venta ambulante y de elaboración casera.

Lo cual es similar a nuestro estudio en Nuevo León, en lo referente a la colección de muestras de quesos artesanales obtenidas en las explotaciones y/o puntos de venta (mercados y vendedores ambulantes) en dieciséis de los municipios, aunque con la diferencia de que en nuestro estudio solamente se detectó la presencia de *Brucella* spp por medio de la PCR en este tipo de quesos.

En el trabajo de Villanueva y col. (2013) titulado “Presencia de *Brucella* spp en quesos frescos elaborados con leche sin pasteurizar en Veracruz, México” y en el realizado por Álvarez y col. (2015b), titulado “Comparación de las pruebas: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp en muestras humanas, a partir de muestras de sangre”, fueron utilizados los mismos cebadores (B4 y B5) utilizados en nuestro estudio, que amplifican la secuencia de un gen de la proteína de la membrana BCSP31, de 31 kDa. Así mismo, las condiciones de amplificación fueron muy similares a nuestro estudio. Además, respecto a los resultados encontrados en ambos trabajos, Villanueva y col. (2013), no lograron aislar e identificar *Brucella* spp por las pruebas convencionales, como el cultivo bacteriológico y la serología. Sin embargo, por PCR identificaron la presencia de ADN de *Brucella* spp en cuatro muestras de un total de 60, lo que representa el 6,67% de muestras positivas (IC 95%). Por otro lado, en el presente trabajo no se realizó aislamiento ni serología, pero nuestros resultados moleculares identificaron ADN de *Brucella* spp en 111 de un total de 386 muestras, lo que representó un 28,76% de muestras de queso positivas (IC 95%). La diferencia en el porcentaje de muestras positivas fue de un 22,09% entre ambos trabajos, situación que pudo ser influida por el tamaño de muestras, que en nuestro caso fue mayor.

En un estudio realizado por Soto y col. (2018), titulado “Detección molecular de *Salmonella* spp, *Listeria* spp y *Brucella* spp en queso fresco artesanal comercializado en la ciudad de Barranquilla: un estudio piloto”, se colectaron quesos en 17 expendios

mayoristas de la ciudad de Barranquilla (Colombia), colectando un total de 27 muestras de queso fresco costeño, de las cuales 17 muestras correspondían a queso blando, 5 a queso semi duro y 5 a queso duro. Del total de muestras analizadas se encontró un 63% de muestras positivas para *Salmonella* spp (17/27), el 70,14% para *Listeria* spp (19/27) y el 22,2% *Brucella* spp (6/27), mientras que de las 17 muestras de queso blando 11 muestras fueron positivas para *Salmonella* spp (64,7%), 13 para *Listeria* spp (76,5%) y 6 muestras para *Brucella* spp (35,3%). Estos resultados guardan similitud con los de nuestro estudio, aunque en el trabajo de Soto y col. (2018) los quesos fueron colectados en expendios mayorista de Barranquilla, realizando el análisis de las mismas por PCR Tiempo Real, mientras que en el presente trabajo se colectaron las muestras de quesos en mercados, y además se identificó ADN de *Brucella* spp por PCR Punto Final. En nuestro caso se detectó un 28,76% de muestras positivas a *Brucella* spp, con un tamaño de muestra de 386 quesos, mientras que en los resultados encontrados por Soto y col. (2108) fue de 22,2% pero con un tamaño de muestra de tan solo 27 quesos, aunque si se consideran únicamente las 17 muestras de queso blando, las muestras positivas supusieron un 35,3%. Estos resultados tan similares se deben probablemente a que en la elaboración de quesos artesanales, tanto en Colombia como en México, se utiliza tecnología rustica y leche sin pasteurizar, sin procedimientos higiénicos adecuados y con un almacenamiento incorrecto.

Álvarez y col. (2015b) realizaron su estudio en dos municipios que han sido considerados para nuestro trabajo, donde se presentó un brote de brucelosis en humanos: Anáhuac y Sabinas Hidalgo, Nuevo León. Cabe enfatizar que en el presente trabajo estos municipios resultaron con una incidencia significativa según la prueba *post hoc* de Duncan ($p < 0,05$). Así mismo, se observó una correlación estadísticamente significativa entre muestras de quesos positivos y la incidencia en humanos por municipio. Cabe destacar que dicha comparación no se midió en el estudio de Álvarez y col. (2015b), ya que ellos sólo estudiaron la presencia de la enfermedad en humanos.

En un estudio realizado por Méndez y col. (2015), referente a la incidencia de brucelosis humana en México y su relación con la brucelosis en rumiantes durante 2001-2011, mostró que las tendencias más altas de brucelosis bovina y caprina se asocian con un incremento de 19 y 17%, respectivamente, de las tasas de incidencia de humanos. De modo similar, en nuestro estudio se observó un aumento en la incidencia de casos de

brucelosis en humanos entre los años 2009 y 2011, que coincide con la mayor frecuencia de detección de *Brucella* spp en los mismos años durante el muestreo de quesos artesanales elaborados con leche de ambas especies (vacas y cabras) en el área Metropolitana y Rural de Nuevo León, siendo en los años 2010, 2011 y 2012 en los que se detectó un mayor número de muestras de quesos positivas a *Brucella* spp, e igualmente el mayor número de casos de brucelosis en humanos.

Así mismo la incidencia acumulada de brucelosis humana distribuida por municipios en los que han sido objeto de muestreo en este estudio arrojó una diferencia significativa según la prueba “post hoc” de Duncan ($p < 0,050$), y a su vez tiene una correlación positiva significativa ($p < 0,001$) entre la incidencia acumulada de brucelosis humana en municipios que han sido objeto de muestro en este estudio, con la obtención de muestras de queso positivas a *Brucella* spp, aunque el coeficiente de correlación de Spearman obtenido fue bajo ($Rho = 0,193$), lo que significaría que la presencia de la *Brucella* spp en el queso solo explicaría un 20 % aproximadamente de los casos de brucelosis humana. El resto de casos podría deberse a diferentes fuentes de infección. No obstante, Méndez y col (2015) mencionan que en México existe una sub- notificación de brucelosis en humanos, basándose en evidencias a partir de estudios de seroprevalencia, en donde en estados con baja notificación de casos de brucelosis humana se presenta una seropositividad alta en la población. Esto podría explicar algunos de los casos en que en municipios donde se obtuvieron aislamientos positivos a *Brucella* spp, la incidencia reportada de la enfermedad fuese baja o nula, dificultando obtener una mejor correlación

Así mismo, Méndez y col. (2015) encontraron una relación ecológica entre la incidencia de brucelosis en los animales (bovinos y caprinos), con la incidencia de brucelosis humana, existiendo una población importante ocupacionalmente expuesta a esta bacteria, y entre la que todavía es una práctica común el consumo de leche cruda y la elaboración de quesos provenientes de leche no pasteurizada, lo que representa un problema de salud pública.

En un estudio realizado por Guzmán y col. (2016) titulado “Brucelosis: zoonosis de importancia en México”, se menciona que la brucelosis en los animales en México, en el período de 2000 al 2011, registró un aumento de la incidencia en todo el país, pasando del 1 al 15% en la brucelosis bovina, mientras que el ganado caprino el aumento fue del

2 al 7%. En ese mismo periodo, el incremento de la brucelosis bovina se relacionó con el 15% de aumento en la incidencia de los nuevos casos de brucelosis humana. Así mismo La Dirección General de Epidemiología, en el “Manual de vigilancia epidemiológica brucelosis 2012” refieren que en el año 2007 se registraron 1,874 casos, con una incidencia de 1,7 por 100,000 habitantes y en el año 2011 se registraron 3,436 casos, con una incidencia de 3,1 por cada 100.000 habitantes, lo que representa un incremento en la incidencia del 77% para el año 2011 con respecto al 2007 (Anónimo 2012). Estos datos son similares a reportados en Nuevo León en nuestro estudio, donde se incrementaron los casos de brucelosis humana durante el tiempo de colección de muestras de queso artesanal, siendo estos de 125, 214, 249 y 195 casos, durante los años 2009, 2010, 2011 y 2012 respectivamente.

En cuanto a los resultados de la frecuencias de detección de *Brucella* spp según la especie animal de procedencia de la leche utilizada para la elaboración de quesos artesanales, ésta fue de 32,03% para la leche de cabra, 21,60% para la de vaca y 40% para la mezcla de cabra y vaca, siendo el resultado de la mezcla significativo ($p=0,034$).

Además, al evaluar las frecuencias en la detección de *Brucella* spp en quesos artesanales en base al año de colección y a la especie de procedencia de la leche, se desprende que el año de colección en la especie caprina juega un papel determinante en la presencia del microorganismo ($p=0,004$) en los quesos artesanales entre los años de muestreo del 2009 al 2012. igualmente a la mezcla ambas leche de cabra y vaca.

Lo que también es similar a lo reportado en dos estudios realizados en México por (García y col., 2008; García y col., 2014) donde llegaron a la conclusión de que la principal forma de contagio de la población estudiada fue a través del consumo de productos lácteos sin pasteurizar y el queso fresco. Igualmente a lo mencionado por (Guzmán *et al.*, 2016). Donde mencionan que la leche cruda y los quesos frescos sin pasteurizar, sobre todo de origen caprino y bovino, son por tanto la vía más común por la que se puede adquirir la brucelosis en la población.

6. CONCLUSIONES

La investigación realizada permitió llegar a las siguientes conclusiones:

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) Punto Final fue utilizada con éxito para determinar la presencia de *Brucella* spp, en queso fresco elaborado artesanalmente. Esta técnica de PCR presenta gran especificidad y sensibilidad ya que se estableció el límite de detección en 100 pg lo que equivale a dos copias del ADN de *Brucella* spp.

Se detectó *Brucella* spp en 111 muestras de queso fresco de leche de vaca, cabra y su mezcla, elaborados artesanalmente de un total de 386 muestras colectadas y analizadas, lo que representa el 28,76%. Estas muestras positivas fueron obtenidas en 16 de los 26 municipios muestreados del estado de Nuevo León, que representan el 61,53%.

Todos los productos de amplificación seleccionados al azar mostraron un 100% de homología con las secuencias del gen que codifica la proteína BSCP31 reportadas en la base de datos de GenBank, lo que confirma que todos correspondían a ADN de *Brucella* spp.

La frecuencias de detección de *Brucella* spp en leche utilizada para la elaboración de quesos artesanales, según la especie animal, fue significativa ($p=0,034$) para la combinación de leche de vaca y cabra.

Las frecuencias en la detección de *Brucella* spp en quesos artesanales en base al año de colección, y a la especie animal de procedencia, se desprende que el año de colección en la especie caprina sí juega un papel determinante en la presencia del microorganismo ($p=0,004$) entre los años de muestreo del 2009 al 2012 para la elaboración de queso artesanal.

Aunque se observó una correlación positiva significativa ($p < 0,001$) entre la incidencia acumulada de brucelosis humana en municipios que han sido objeto de muestreo, en este estudio, con la obtención de muestras de queso positivas a *Brucella* spp, el coeficiente de correlación de *Spearman* obtenido fue bajo ($Rho=0,193$), lo que significa que la presencia

de la *Brucella* spp en el queso solo explicaría un 20 %, aproximadamente, de los casos de brucelosis humana por lo que el resto de la incidencia debería atribuirse a otra fuente de infección o debido a falta de precisión en la notificación de casos de brucelosis humana en algunos estados que han sido objeto de muestreo.

Nuevo León es un estado endémico de brucelosis, representando esta enfermedad un importante problema de salud pública, siendo el consumo de productos lácteos no pasteurizados una de las principales vías de contagio, aunque no la única. Los métodos moleculares (PCR) constituyen actualmente una buena alternativa para la detección de *Brucella* spp, ya que es una técnica que ofrece mayor sensibilidad y especificidad que los métodos tradicionales, además de ser más rápidos y fáciles de interpretar.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Acha P. N y Szyfres B. 2001. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre ya los animales. Volumen I: Bacteriosis y micosis. Organización Mundial de la salud 525 Twenty-third Street, NW Washington, DC 20037, EUA 28-55
- Aguilar R. F., Cantú C. A., Díaz A. E., Fabila H. L. del C., Herrera L.E., Morales Á. J. F., Palomares R. E. G., Santillán F. M. A. 2011. Prevención de Brucelosis en Rumiantes, Folleto Técnico N°2, ISBN 978-607-425-557-7 Primera Edición INIFAP.
- Aguirre A.V.E., Alvarado G. M., Ibave G. J. L., Leal H. M., Díaz A. E., Nevárez M. V., Solís M. F. J., Arévalo G. S., Rivera Ch. B. E. 2008. Diagnóstico rápido y polimerasa doble *Téc Pecu Méx*; 46(2):147-158.
- Alton G. G., Jones L. M., Angus R. D., Verger J. M. 1998. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris France: *Institute Nacional de la Recherdie Agrononique*.
- Álvarez H. N. E., Díaz F. M., Ortiz R .M. 2015. Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Rev. Med. Inv*: 3:129-33,2015a.
- Álvarez O. M.G., Saldaña F. C., Ballesteros E. M. R., Martínez V. I. O., López M. A., Briones L.E., Morales L. A. 2015b. Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp en muestras humanas. *Gac Med Mex* 151:620-7
- Anónimo 1988. UNAM, C., Brucelosis, S.A.R.H. (1988). II Foro Nacional. México, DF, *CANIFARMA, SARH*.
- Anónimo, 2006. Seroprevalencia de anticuerpos anti- *Brucella* en humanos y aislamiento de *Brucella melitensis* en el estado de Nuevo León, 2004-2005.
- Anónimo, 2012. Dirección General de epidemiología, Manual de vigilancia epidemiológica brucelosis Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/03_2012_Manual_Brucelosis_vFinal_13nov12.pdf.
- Anónimo 2014. Ganadería Disponible en: <http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/perfgan.pdf>
- Anónimo, 2015. Anuarios de información, (Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General Adjunta de Epidemiología/SSA).2015 Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

- Aréchiga, C. F., Aguilera, J. I., Rincón, R. M., Méndez de Lara, S., Bañuelos, V. R., & Meza-Herrera, C. A. 2008. Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 9 (1) :1-14
- Ariza, J., Pellicer T., Pallares R., Foz A, Gudiol F.1992. Specific antibody profile in human brucellosis. *Clin Infect Dis*; 14(1):131-40.
- Ariza, J. 1992. Diagnóstico de la brucelosis en la actualidad. *Med Clin*; 98:491-483.
- Asuar, L. E. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Thought A Rev Cult Idea*, 110034(11), 517-40.
- Ávila, G. J., y Cruz H. G. E. 2009. Enfermedades abortivas clínica de los bovinos1, México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en:
- http://www.ammveb.net/clinica/enfermedades_abortivas.pdf
- Ávila, T. S. y Gutiérrez CH. A. J. 2014. Producción de leche con ganado bovino, Tercera edición Imagen editorial Yire 1-30.
- Baily, G. G., Krahn J. B., Drasar B. S., Stocker N. G., 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95: 271-275.
- Barroso, G. P., Lucerna M. M., Cortés M. M., Toranzo L. M., Escabias M. F. J., Molina, C. F. 2007. Brote de brucelosis interprovincial por ingesta de queso fresco sin higienizar *Medicina de Familia, (And)*. 2: 27-32.
- Beal, V. C. 1984. Current estimated brucellosis losses. Hyattsville, MD: Veterinary Services. Animal and Plant Health Inspection Services. *US Department of Agriculture*.
- Beeson, P. B. 1956. The Nature of Brucellosis the *Journals of Biology and Medicine* 29 2,162-162.
- Betsy, J.B., Halling S. M. 1995. Enhancement of the *Brucella* AMOS PCR assay for differentiation of *Brucella abortus* vaccine strain S19 and RB51. *J Clin Microbiol* 1640-642.
- Bolívar, F. 2004. Ingeniería genética: las herramientas moleculares y los métodos para aislar, caracterizar y manipular el DNA. Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología Moderna. Bolívar, F. (ed). *El Colegio Nacional, México*. 57-84.

- Bounaadja, L., Albert, D., Chénais, B., Hénault, S., Zygmunt, M.S., Poliak, S., Garin-Bastují, B. 2009. Real-time PCR for identification of *Brucella* spp. A comparative study of Is711, bcs31 and per target genes. *Veterinary Microbiology*. 137:156-164.
 - Brinker, B. J., Halling S. M. 1994. Differentiation of *Brucella abortus* (biovar 1, 2 and 4), *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* (biovar 1) by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 32:2660-2666.
 - Byrd, J. W., Heck F. C., Hidalgo R.J. 1979. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Brucella abortus* antibodies. *Am J Vet Res* 40(6) 896-898.
- Cabrera, R. M. A., y Valladares T. P. K. 2016. Determinación de *Listeria* spp. mediante PCR en Tiempo Real en muestras de leche cruda, recolectadas en la provincia de Pichincha. Disponible en:
- <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/12137>
- Calderón, A., Tique V., Ensuncho C. F., Rodríguez V. 2010. Seroprevalencia de *Brucella abortus* en Búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en el municipio de Lórica, Córdoba. *rev. Actual. divulg. cient.* 13 (2) 125-132.
 - Camacho, C.; Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., y Madden. T. L. 2009. Blast+: architecture and applications. *B M C bioinformatics*, 10 (1), 421.1. Disponible en: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
 - Cariello, N. F., Swenberg J. A., Skopek T. R. 1991. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 19 (15): 4193-4198
 - Carrisoza, U. I., Medina C. M., Palomares R. E. G., Díaz A. E. 2014. Transmisión de *Brucella abortus* en becerras menores de tres meses diagnosticadas por medio de las pruebas de tarjeta e inmunodifusión radial en dos hatos lecheros del estado de Querétaro. *Veterinaria México*, 45(spe), 11-18. Recuperado en 06 de julio de 2016, Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922014000200002&lng=es&tlng=es
 - Castro, H. A., González, S. R., Prat M. I. 2005. Brucelosis: una revisión práctica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 39 (2), 203-216. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000200008

- Cervantes, E. F., Santoyo C. H., Álvarez M. A. 2001. Lechería Familiar: factores de éxito para el negocio. Plaza y Valdés Editores S.A. de C.V., México D.F., México, 165-188.
- Cesín-V. A. 2014. La leche y los quesos artesanales en México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(2), 243-248. Disponible en:
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-54722014000200008&lng=es&tlng=pt.
- Cesín V. A., Aliphath F. M., Ramírez V.B., Herrera H. J., Martínez C. D. Carrera 2007. Ganadería lechera familiar y producción de queso. Estudio en tres comunidades del municipio de Tetlatlahuca en el estado de Tlaxcala, México. *Técnica Pecuaria en México* 45(1) Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/28141500_Ganaderia_lechera_familiar_y_produccion_de_queso_Estudio_en_tres_comunidades_del_municipio_de_Tetlatlahuca_en_el_estado_de_Tlaxcala_Mexico
- CFSPH, 2009 The Center Food Security Public Health, Iowa State University.
- Coelho, A., García D. J., Coelho A. C. 2014 Brucelosis en pequeños rumiantes: epidemiología sintomatología, diagnóstico, prevención y control. Disponible en:
http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/brucella_abortus-es.pdf
- Córdova, I. A.; Iglesias, A. E., Cervantes E. R., Liera G. J. E., Castro I. J. F., Mancera, V. A. E., Mendoza M. M., Crispín H. R., Mosqueda J. M. L., Vázquez G. A., Arroyo C. G., Hernández M.W., Pérez O. J., Vázquez V., Sánchez P. 2017. Importancia de la brucelosis bovina y consecuencias económicas. Disponible en:
http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/21-Importancia_brucelosis.pdf
- Cortázar, A., y Rincón, E. 2004. Métodos Físico-Químicos en Biotecnología PCR. Universidad Nacional Autónoma de México. *Instituto de Biotecnología*. 43.
- Dahouk, S., Flecher P., Nockler K., Jaques I., Grayon M., Holger C., Scholz H,T., Veeganud G., Neubauer H., 2007, Evaluation of Brucella MLVA typing for human brucellosis, *Journal of Microbiological Methods* 69 137–145
- De Blas, I., Ruiz. Z. I., Bayot B., Ferreira CH. 2008. Manual de Epidemiología Veterinaria Primera edición Unidad de Patología Infecciosa y Epidemiología. , Zaragoza España Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.
- DGIS. Dirección General de Información en Salud. (2015) Disponible en;

http://www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/basesdedatos/std_defunciones_gobmx.html

- Díaz, A. E. 2013. Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos. . *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 32(1), 53-60.
- Díaz, A. E; Tortora P. J. L.; Palomares R, E.G; Gutiérrez H. J. L. 2015. Enfermedades de las cabras México, D.F.: SAGARPA- INIFAP. ISBN 978 607 37 0411-3
- Díaz, A. E., Hernández A. L., Valero, E. G., Arellano 2000. Diagnóstico de Brucelosis Animal, México D. F. Segunda Edición, *CENID, MICROBIOLOGIA INIFAP. SAGARPA*. 1-230
- Estein, S. M. 2006. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). *Revista electrónica de veterinaria*, 5, 1-25. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506.html>
- Fekete A., Bantle J A., Halling S M. 1990. Sanborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 69:216-27.
- Félix, J. S., Agüero J., García L. J. M. 2000. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology*.146:487-495.
- Fernández, C. E., Gómez V. F. 2009.Brucelosis revisión bibliográfica *Medicina Tropical Revista médica de Costa Rica y Centro América LXVII* (590) 399-404.
- Ficht Thomas. 2011 *Brucella* Taxonomy and evolution Published in final edited form as: *Future Microbiol*.2010 June; 5(6): 859–866. doi:10.2217/fmb.10.52.
- Flores Castro, R. 2010. La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo *Gaceta Médica de México*, 146:423-29. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2010/gm106j.pdf>
- Flores. G. T. y Herrera, Rojas R. A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud Pública de México*, 47(5), 388-390. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342005000500010&lng=es&tlng=es.
- García, J. G., Ramírez B. J. E., Hernández V. M., Hernández C. L. M., Díaz A .E., y Orozco B.H. 2014. Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala. *Salud Pública de México*, 56(4), 355-362.

- García, B., H. R., Vitela M. I. V., y Leonor, M. 2008. PCR multiplex' para diagnóstico de brucelosis, leptospirosis y neosporosis. Disponible en: [http://csa.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otra instituciones/Garcia-BustamanteHismeldaRubi\(pp651-658\)/651-658.pdf](http://csa.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/avances/avances2008/Otra%20sinstituciones/Garcia-BustamanteHismeldaRubi(pp651-658)/651-658.pdf)
- Genbank® :Disponible en; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- González, C. A., Torres L. M., y Vallejo C. B. 2004. Tecnificación del proceso artesanal para la obtención de queso fresco mexicano. *CIAD, AC CONACYT*.
- González, M. L., Franco F.M. J. 2015. Microbiological profile of aro cheese consumed in Oaxaca, Mexico. *Brazilian Journal of Food Technology*, 18(3), 250-257.
- Guzmán, H. R. L., Contreras R. A., Ávila C.E. D., Morales G.M.R. 2016. Brucelosis: zoonosis de importancia en México. *Revista chilena de infectología*, 33(6), 656-662.
- Hamdy, M. E., Amin A.S. 2002. Detection of *Brucella* Species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. *Veterinary J*; 163:299-305.
- Herman, L, de Ridder H.1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol*. 58(6):2099-101.
- Hernández, J. E., Franco F. J., Villarreal O. A., Camacho J.C., Pedraza R.M. 2011. Caracterización socioeconómica y productiva de unidades caprinas familiares en la Mixteca Poblana. *Arch. zootec. revista en la Internet*. 60(230): 175-182.
Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-05922011000200002&lng=es.
<http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922011000200002>.
- Herschhorn, A., y Hizi, A. 2010. Retroviral reverse transcriptases. *Cellular and molecular life sciences*, 67(16), 2717-2747.
- Hess, W. R., Roepke M. H. A 1951 A Non- especific *Brucella*.. agglutinating substance in bovine serum. *Proc Soc Exp Biol Med*.77:469-72
- Hinić, V., Brodard, I., Thomann, A., Cvetnić, Z., Makaya P. V., Frey J., Abril, C. 2008. Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. *Journal of microbiological methods*, 75(2), 375-378.
- Huddleson IF, Abell F. 1982. Rapid macroscopic agglutination test for the serum diagnosis of Bang's abortion disease. *J Infect Dis*; 42: 242-7.
- INEGI, 2010 Instituto Nacional Estadística y Geografía ,Disponible en:

http://www.inegi.gob.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/pais/aepef/2010/Aepef2010.pdf

- INEGI, 2016 Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en: <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/nl/default.aspx?tema=me&e=19>
- Ingh, B. B., Dhand, N. K., Gill, J. P. S. 2015. Economic losses occurring due to brucellosis in Indian livestock populations. *Preventive veterinary medicine*, 119 (3), 211-215.
- Izquierdo, M. 2007 Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina *REDEVET Revista electrónica de Veterinaria*, 1695, 7504.
- Jawetz, E., Melnik J. L., Adelberg E. A. 1995, Microbiología médica. 11a. ed. México, D.F.: El Manual Moderno.
- Kulakov, I.K., Gorelov V. N., Motin V.L., Brukhanskii G.V., Skavroskaya A. G. A. 1992 A highly sensitive non-isotopic DNA hybridization system using amplification (PCR) for the identifying and indicating presence of *Brucella*. *Molekulyarnaya Genetika, Microbiologiya i Vurisologiya*. (7-8) 23-27.
- Lawinsky, M. L D. J., Ohara P. M., Elkhoury M. D. R., Faria N. D. C., Cavalcante, K. R. L. J. 2010. Estado da arte da brucelose em humanos. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(4), 75-84.
- Leal-Klevezas, D. S, López M. A., Martínez S. J. P. (1995) a. Molecular detection of *Brucella* spp rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. *Arch Med Res*. 26 (3):263-67.
- Leal-Klevezas, D. S., Martínez .V. I. O., López M.A., Martinez-S. J P. (1995) b. Single step PCR for the detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J Clin Microbiol*. 33 (12):3087-90.
- Leal-Klevezas, D. S., Martínez V. I. O., Martínez S. J. P. (1995) c. Nested PCR en la confirmación del diagnóstico de brucelosis en humanos. Reunión Regional de Investigación Médica del IMSS; Monterrey, N.L. México; 16.
- Leal-Klevezas, D. S., Barbabosa P. A., Flores T. M., López M. A., Martínez-S. J. P. (1999) d. Epidemiología molecular de un foco primario de brucelosis en el Estado de México. *Biotecnología Aplicada*, (16), 149-153.
- López, M. A, y Contreras R. A. 2004. *Brucella*. *Scand J Infect Dis* 36, 636-638

- López, M. A, y Contreras R. A. 2006. Agentes Infecciosos. *Revista latinoamericana de Microbiología* vol. 48 (2), 146 -153
- López Merino, A., y Merino, A. L. 1991. Brucelosis avances y perspectivas Publicación Técnica Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos 614.4 -8-6.
- López-Merino, A. H., Migrañas O. R., Pérez M. A., Magos C., Izaba B. S., Tapia Coyner R., Sepúlveda J. 1992. Seroepidemiología de la brucelosis en México. *Salud Pública de México*, 34(2), 230-240. Disponible en:
<http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5491/5847>
- Lucero, N. E., Ayala S. M., Escobedo G. I., Jacob N. R. 2007 Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006, *Epidemiol. Infect.* 1, 8. Disponible en:
<https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/brucella-isolated-in-humans-and-animals-in-latin-america-from-1968-to-2006/62B1FE4C06BBD8EA773899605B1A717D>
- Luna, J. E. y Mejia C. 2002. Brucellosis in México: current status and trends. *Veterinary microbiology* . 90(1): 20-30.
- Marianelli, C., Martucciello, A., Tarantino, M., Vecchio, R., Iovane, G., & Galiero, G. 2008. Evaluation of molecular methods for the detection of Brucella species in water buffalo milk. *Journal of dairy science*, 91(10), 3779-3786.
- Martínez, CH. L. C., Verdugo R. A., Hernández C. R. 2006. Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca, *Veterinaria México* 37: 4, 479-485.
- Martínez, H. D. I., Abeledo, M. A., Lara G. A., Peniche C. A., Robledo S. M. L., Pulido C. E., y Flores C. R. 2009. Evaluación de métodos de cultivo para el aislamiento primario de *Brucella melitensis* a partir de leche de cabras. *Revista de Salud Animal*, 31(3), 164-169.
- Martínez, R. E y Martínez R. J. C. Microbios en línea 2002. Editores. Dra. Esperanza Martínez Romero y Martínez Romero J. C. Cuernavaca, Morelos, México, ISBN 968-36-8879-9. Disponible en :
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>

- Martínez, S. J. P., Cab B. E. L. Tamez G. R., Leal K. D. S. 1993. Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*. 18(4):10-6.
- Mederos, D., Rodríguez, J., y Rivero E. M. 1981. Brucelosis. Patología Especial de los Animales Domésticos. Editorial Pueblo y Educación. Primera reimpression. 206-231.
- Méndez, G. K. J., Monroy L. J. F., Suarez G. F., López M. A., Hernández R. 2007. Evaluación de la sobrevivencia de *Brucella melitensis* en quesos de cabra durante su elaboración y maduración.
- Méndez, L. M., Rodríguez R. E. J., Sánchez Z. L. M. 2015. Brucelosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. *Salud Publica de México* 57, 6, 519.
- Merino, A. L. 2015 La brucelosis humana es en realidad un problema un problema de salud pública de interés para la población. Tercer encuentro de participación de la mujer en la ciencia. Disponible en:
<https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&q=%E2%80%A2%09Merino%2C+A.+L.+LA+BRUCELOSIS+HUMANA%C2%BF+ES+EN+REALIDAD+UN+PROBLEMA+DE+SALUD+PUBLICA+DE+INTERES+PARA+LA+POBLACION%3F.&btnG=&lr=>
- Michanie, S., Medina, L., Ghiberto, D., Prosello, W., Alia, P., Coria, P., & del Equipo HACCP, M. 2001. Epidemiología de las enfermedades transmitidas por quesos. *Énfasis Alimentacion*, 7 (2) 30-36.
- Mikolon, A. B., Gardner A. I., Hietala S.K., Hernández D. J., Pestan Ch .E., Hennager G. S., Edmondson J. A. 1998. North American Antibody Detection Tests for Diagnosis of Brucellosis in Goats. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 6, 1716-1722.
- Mittal, K R., Tizard I R. 1980. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res Vet Sci* 28(3):311-314.
- Morales, L. A., Martínez V. I. O., Álvarez, O. G., Lozano, M. S. 2004. Manual de para el diagnóstico de patógenos en lácteos y carne mediante PCR, Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional del Noreste, Campo Experimental General Terán, Nuevo León, México. Folleto Técnico núm. 5 128 (INIFAP) ISSN1405-1915

- Mullis, K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61.
- Nagel, P., M. Wurzinger, L. Iñiguez, F. G. Echavarría Chaires., M. de Flores Nájera., J. K. Pinos Rodríguez., W. J. Gómez Ruiz y W. Zollitsch. 2006. Characterization of goat production systems in the Highlands of México International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Developmet. Bonn, October 11-13, 2006. 1-4.
- Navarro, E. Casao M A, Solera J. 2004. Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Rev Mol Diagn* 4:115-23
- Norma Oficial Mexicana, NOM-121-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx>
- Norma Oficial Mexicana, NOM 251-SSA-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Disponibles en: <http://dof.gob.mx>.
- Norma Oficial Mexicana, NOM 243-SSA1-2010 Productos y Servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y Especificaciones Sanitarias. Métodos de prueba. Disponible en: <http://dof.gob.mx>
- OIE, 2004, Organización Mundial de Sanidad Animal, Oficina Internacional de Epizootias Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.3.1. 445., 472 Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>.
- OIE, 2007, Organización Mundial de Sanidad Animal, Oficina Internacional de Epizootias Métodos de muestreo disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal Health in the World/docs/pdf/1.1.01_Muestreo_2007.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/1.1.01_Muestreo_2007.pdf)
- OIE, 2014, Organización Mundial de Sanidad Animal, Oficina Internacional de Epizootias (OIE) Disponible: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/enfermedades-de-la-lista-de-la-oie-2014/>
- OIE, 2016, Organización Mundial de Sanidad Animal, Oficina Internacional de Epizootias (OIE) Disponible en: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2016/>
- Olivera, M., Sciagr, D., DI-Lorenzo, C.E.C.I.L.I.A. 2009. Aislamiento de *Brucella canis* en un humano conviviente con caninos infectados. Informe de un caso. *Colombia Médica*, 40(2), 218-20.

- Organes, H. C. 2001. Optimización del método PCR para la amplificación de los genes ery A, ery B y ery D del genoma de *Brucella abortus* con potencial para diagnóstico [tesis licenciatura]. Tijuana, BC: Universidad Autónoma de Baja California.
- OIT, 2005. Organización Internacional del Trabajo. disponible en: http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_protect/---protrav/---safework/documents/meetingdocument/wcms_116930.pdf p-8
- Ortega, M. M. G., 1997. Evaluación en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la brucelosis estimando el espectro infección en humanos en una zona endémica Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/7158/1/1080080864.PDF>
- Ospina-Pinto, M. C., y Hernández Rodríguez, P. 2015. Utilidad de las herramientas moleculares para la identificación de *Leptospira* spp. en muestras humanas, animales y ambientales. *Revista cubana de medicina tropical*, 67(3).
- Perry, M, Bundle DR. 1990. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. *Inf Immun*. 58:1391-5
- Poullot, R., Garin-Bastuji B., Gerbier G., Coche Y., Cau C., Dufour B. Moutou F. 1997. The brucellin skin test as a tool to differentiate false positive serological reactions in bovine brucellosis. *Vet. Res.*, 28, 365–374.
- Probert, S.W., Schrader, N. K., Khuong, Y. N., Bystrom, L.S., Graves, H, M. 2004. Real Time PCR Assay for Detection of *Brucella* spp., *B. abortus*, and *B. melitensis*, *journal of Clinical Microbiology* 42:3, 1290-1294.
- Ramírez, Miranda Ina 2011. Importancia del establecimiento de programa de Buenas prácticas de manufactura (BPM) en la industria quesera. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/industria-lechera/articulos/industria-quesera-t3431/472-p0.htm>
- Redkar, R., Rose S., Bricker B., DelVecchio V. 2001 Real Time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Molecular and cell Probes* 15(1), 43-52.
- Renteria, E. T. B., Organes, De los S. H., Licea., N. F. A., Medina, B.G.E., Nilsen, K., Montaña G. M. F., Moreno, R. J. F., Pujol, M.L.C., 2005. Evaluación de la Prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos

- puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina, *Técnica Pecuaria México*, 43:1, 117-126.
- Reséndiz, M.R., Hernández, Z. J. S., Ramírez, H. R., & Pérez, A. R. 2012. El queso fresco artesanal de la canasta básica y su calidad sanitaria en Tuzuapan, México. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*, 2, 253-255.
 - Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., Oñate, A. 2006. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(1), 7-18.
 - Rodríguez Jerez, J. J. 2012. La vulnerabilidad del queso fresco. Consumer Eroski Disponible en:
<http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2002/08/22/3051.php>
 - Rodríguez, Tamuchy Gemma 2014. Cuantificación de Ácidos Nucleicos Disponible en:
<https://www.iib.uam.es/portal/documents/76122/76162/CUANTIFICACION+DE+%C3%81CIDOS+NUCLEICOS+V2.pdf/04333940-c6ff-4419-ad85-cfd1e04dbca8>
 - Rodríguez, Y., Ramírez, W., Antúnez, G., Pérez, F., Ramírez, Y., Igarza, A. 2005. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. *Revista Electrónica de Veterinaria*, (6.): 1 -9.
 - Romero, C., Gamazo C., Pardo M., López-Goñi I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J Clin Microbiol* 33(4):615-617.
 - Ruiz, Castañeda. M., 1986. Brucelosis 3ra. ed. México, D.F. La Prensa Médica
 - SAGARPA-SIAP. 2014. Panorama de la lechería en México. Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, Sistema de información Agroalimentaria y Pesquera SIAP Disponible en:
<http://www.siap.gob.mx/wp-content/uploads/boletinleche/bboletinleche1trim2014.pdf>.
 - Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. T., Higuchi, R., Horn, G. T., & Ehrlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA. *Science*, (239) 487-491.
 - Sangari, F. J, García-L. J. M, Agüero J. 1994. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic genes. *FEMS Microbiol Lett* 121:337-342.

- Schmoock, G., Ehricht, R., Melzer, F., Elschner, M., Tomaso, H., Neubauer, H., Dahouk, AL Sascha., 2011. Development of a diagnostic multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect and differentiate *Brucella* spp. *Diagnostic microbiology. and Infectious Disease* 71 ,341–353
- Scholz, H.C. y Vergnaud., 2013 Molecular characterisation of *Brucella* species sci. tech. *Int. Epiz.*, 32(1) 149-162
- Seleem N, M., Boyle M, S., Sriranganathan, N., 2010, Brucellosis: A re-emerging zoonosis. *Veterinary Microbiology* 140: 392–398.
- SENASICA, Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria; 2015. Situación actual del control de la brucelosis en México. Disponible en:
<https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-brucelosis-en-mexico>
- Soares, C. D. P. O. C., Teles, J. A. A., Santos, A. F. D., Silva, S.O.F., Cruz, M.V.R.A., Silva-Júnior, F.F.D. 2015. Prevalence of *Brucella* spp in humans. *Revista latino-americana de enfermagem*, 23(5), 919-926.
- Soler-Lloréns, P. F., Quance, C. R., Lawhon, S. D., Stuber, T. P., Edwards, J. F., Ficht, T. A.& Keriell, A. 2016. A *Brucella* spp. Isolate from a Pac-Man Frog (*Ceratophrys ornata*) Reveals Characteristics Departing from Classical Brucellae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6.
- Soto, Varela Z E, Gutiérrez C. G., De Moya Y., Mattos R., Bolívar-Anillo H. J., Villarreal J.L. 2018. Detección molecular de *Salmonella* spp, *Listeria* spp y *Brucella* spp en queso fresco artesanal comercializado en la ciudad de Barranquilla: un estudio piloto. *Biomédica*. 38(3). Disponible en :
<https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3677>
- Suárez, G. F., Arellano, R. B., & Díaz A. E. 2014. Brucellosis: Importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico. FMVZ UNAM CENID Microbiología INIFAP SAGARPA [serie en internet]. 2009; 1: 1-12 [consultado el 5 de mayo de 2014]. Disponible en:
<http://www.zoonosis.unam.mx/contenido/publicacion/archivos/libres/Brucelosis.pdf>
- Swai, E. S., y Schoonman, L. 2009. Human brucellosis: seroprevalence and risk factors related to high risk occupational groups in Tanga Municipality, Tanzania. *Zoonoses and Public Health*, 56(4), 183-187.

- Taboada, E.N., Campos, L. M., Leiva, R. R., Gómez, B. J., Mansilla, H. C., Salazar, A. M. 2005. Seroprevalencia de brucelosis en ganado caprino en hatos del Callao, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 22: 2.
- Tae H., Shallom S.H., Settlege R, Preston D. Adams L.G., A., Garner H.R. 2011
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2, 10-78.
- Tiller, R. V., Gee J.E., Lonsway D.R., Grbble S., Bell S.C., Jennison A.V., Bates J., Cluter C. Hoffmaster A., De B.K. 2014. Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) form a lug biopsy in a 52 year- old patient with chronic destructive pneumonia, *BMC Microbiology* 2010 10:23 Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-10-23>
- Torres, P. J. C., López M. A., García E. R. M., & Gutiérrez G. J. N. 2004. Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Brucella* en disponentes de sangre con fines terapéuticos en tres bancos de sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Gaceta médica de México*, 140(4), 391-398.
- Valdespino O. J. R.1994. Impacto económico de la brucelosis y tuberculosis bovina durante 1992 en México. In: Proceedings of the XIV Panamerican Congress of Veterinarian Science; Acapulco, Gro. México; p.858.
- Valencia, C. C. M. 2002. Desafíos del sistema extensivo de producción caprina. *Memorias de la 17ª Reunión Nacional sobre Caprinocultura*. Durango, Dgo, 2, 102-107.
- Vargas, C., Escoto, A. C., & Macías, F. Á. 2009. *La lechería familiar en México* ISBN 9786074011067, (No. 637. 10972 L4).
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., Romero, 2014 A. C. Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1. Disponible en: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/\\$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/770DBBBD5ADF759505257D4900580FE6/$FILE/HerramientasMolecularesAplicadasEcolog%C3%ADa.pdf).
- Vemulapalli R., McQuiston J. R., Schurig G. G., Sriranganathan N., Halling S H., Boyle S. M. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the wboA gene of

- Brucella abortus* vaccine strain RB51 and a PCR assay To distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clin Diagn Lab Immunol* 6 (5):760-764.
- Villanueva, V. M., Martínez H. D. I., Peniche C. A., López M. A., Rosas S. T. D. J., Morales E. A. I., y Flores C. R. 2013. Presencia de *Brucella* spp. En quesos frescos elaborados con leche sin pasteurizar en Veracruz, Mex. Disponible en: <https://www.uv.mx/veracruz/cienciaanimal/files/2013/11/Presencia-de-Brucella-ssp-en-quesos-frescos.pdf>
 - Villegas, G. A 2004. Tecnología Quesera Editorial Trillas S.A. de C.V. Primera edición, pp13-66.
 - Villegas, G. A.; Cervantes E. F. 2011. La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. *Estudios Sociales*, Santo Domingo, (19),. 38,. 145-164. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-45572011000200006&script=sci_arttext&tlng=en
 - Watson, J D, Crick F H. A 1953; structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature*. 421: 397-378
 - Win Epi 2.0 disponible en: <http://www.winepi.net/menu1.php> <http://www.winepi.net/sp/index.htm>
 - Wilfinger, W.W., Mackey K. 1997. Chomczynski, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity: *Bio Techniques* 22:474-481
 - Woldemeskel, M. 2013. Zoonosis due to *Brucella suis* with special reference to infection in dogs (Carnivores): A brief review. Disponible en: https://scholar.google.com/scholar?q=Woldemeskel++2014+zoonosis+due+to+brucella+suis+with+special+&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5
 - Xolalpa C. V. M., Pérez R.M., Córdova I. A. 2010. Evaluación de las pérdidas económicas por eventos de falla reproductiva asociadas a brucelosis bovina en hembras y explotaciones de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo, México. *Revista Científica*, 20(2), 190-195.
 - Yanagi M, Yamasoto K.1993. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of the 16S genes using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol Lett*. 107(1):115-20

8. ANEXO 1

Tabla 2 Encuesta elaborada en el momento de la colección				
Ordenado por alfabéticamente por origen de producción				
Número de Muestra	Origen de Producción	Queso elaborado con leche de	Origen de la colección Municipio	Fecha de colección
319	Chiapas	Vaca	Escobedo	01/08/2012
320	Chiapas	Vaca	Escobedo	01/08/2012
318	Chihuahua	Vaca	Escobedo	01/08/2012
258	Coahuila	Cabra	Monterrey	15/08/2011
252	Coahuila	Cabra	Monterrey	15/08/2011
254	Coahuila	Cabra	Monterrey	15/08/2011
255	Coahuila	Cabra	Monterrey	15/08/2011
260	Coahuila	Cabra	Monterrey	15/08/2011
256	Coahuila	Vaca	Monterrey	15/08/2011
247	Coahuila	Vaca	Monterrey	15/08/2011
184	Coahuila	Vaca	Monterrey	20/02/2011
179	Coahuila	Vaca	Monterrey	10/02/2010
176	Coahuila	Vaca	Monterrey	10/02/2010
177	Coahuila	Cabra	Monterrey	10/02/2010
49	Coahuila	Cabra y Vaca	Escobedo	27/11/2009
39	Coahuila	Cabra	San Nicolás	24/11/2009
38	Coahuila	Vaca	San Nicolás	24/11/2009
12	Coahuila	Cabra	Monterrey	05/09/2009
13	Coahuila	Vaca	Monterrey	05/09/2009
7	Coahuila	Cabra	Monterrey	05/09/2009
10	Coahuila	Cabra	Monterrey	05/09/2009
11	Coahuila	Cabra	Monterrey	05/09/2009
9	Coahuila	Vaca	Monterrey	05/09/2009
14	Coahuila	Vaca	Monterrey	05/09/2009
242	Desconocido	Cabra	Monterrey	15/08/2011
241	Desconocido	Cabra	Monterrey	15/08/2011
251	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/08/2011
253	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/08/2011
243	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/08/2011
244	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/08/2011
245	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/08/2011
246	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/08/2011
159	Desconocido	Cabra y Vaca	Monterrey	16/11/2010

165	Desconocido	Cabra	Monterrey	16/11/2010
161	Desconocido	Vaca	Monterrey	16/11/2010
162	Desconocido	Vaca	Monterrey	16/11/2010
163	Desconocido	Vaca	Monterrey	16/11/2010
164	Desconocido	Vaca	Monterrey	16/11/2010
157	Desconocido	Vaca	Monterrey	16/11/2010
158	Desconocido	Vaca	Monterrey	16/11/2010
160	Desconocido	Vaca	Monterrey	16/11/2010
156	Desconocido	Vaca	Monterrey	10/11/2010
123	Desconocido	Cabra	Monterrey	15/10/2010
124	Desconocido	Cabra	Monterrey	15/10/2010
127	Desconocido	Cabra	Monterrey	15/10/2010
130	Desconocido	Cabra	Monterrey	15/10/2010
125	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
126	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
128	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
129	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
131	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
132	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
133	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
134	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
135	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
136	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
138	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
139	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
140	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
141	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
142	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
137	Desconocido	Vaca	Monterrey	15/10/2010
15	Guanajuato	Vaca	San Nicolás	09/09/2009
16	Guanajuato	Vaca	San Nicolás	09/09/2009
17	Guanajuato	Vaca	San Nicolás	09/09/2009
18	Guanajuato	Vaca	San Nicolás	09/09/2009
19	Guanajuato	Vaca	San Nicolás	09/09/2009
261	Nuevo León	Cabra	Monterrey	30/09/2011
167	Nuevo León	Cabra	Galeana	03/12/2010
168	Nuevo León	Cabra	Galeana	03/12/2010
166	Nuevo León	Cabra	Galeana	03/12/2010
317	Nuevo León	Cabra	Hidalgo	20/08/2013

332	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2012
331	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2012
333	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2012
334	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2012
335	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2012
336	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2012
315	Nuevo León	Cabra	Monterrey	16/08/2012
323	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
324	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
325	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
326	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
328	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
329	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
330	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
327	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/08/2012
322	Nuevo León	Vaca	Gral. Escobedo	01/08/2012
314	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	01/08/2012
321	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	01/08/2012
380	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	21/06/2012
381	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	21/06/2012
382	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	21/06/2012
384	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	21/06/2012
353	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
341	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
346	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
349	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
350	Nuevo León	Vaca	Dr. Arroyo	08/12/2011
370	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	28/11/2011
371	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	28/11/2011
372	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	28/11/2011
375	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	28/11/2011
376	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	28/11/2011
377	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	28/11/2011
373	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	10/11/2011
374	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	10/11/2011
378	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	26/10/2011
379	Nuevo León	Vaca	Dr. Arroyo	26/10/2011
309	Nuevo León	Cabra	Aramberri	25/10/2011
307	Nuevo León	Cabra y Vaca	San Nicolás	21/10/2011

308	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	21/10/2011
354	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
355	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
356	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
364	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
270	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
271	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/10/2011
266	Nuevo León	Cabra	Aramberri	13/10/2011
273	Nuevo León	Cabra	Aramberri	13/10/2011
265	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
267	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
268	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
269	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
272	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
365	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2011
366	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2011
367	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2011
240	Nuevo León	Cabra	El Carmen	15/08/2011
234	Nuevo León	Cabra	El Carmen	07/08/2011
239	Nuevo León	Vaca	Escobedo	06/08/2011
238	Nuevo León	Vaca	Escobedo	05/08/2011
237	Nuevo León	Vaca	Escobedo	04/08/2011
236	Nuevo León	Vaca	Escobedo	03/08/2011
235	Nuevo León	Vaca	Escobedo	02/08/2011
338	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	11/07/2011
340	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	11/07/2011
337	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	11/07/2011
339	Nuevo León	Vaca	Dr. Arroyo	11/07/2011
220	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/04/2011
222	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/04/2011
223	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/04/2011
218	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/04/2011
221	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/04/2011
214	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/04/2011
215	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/04/2011
216	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/04/2011
217	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/04/2011
219	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/04/2011
213	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/03/2011

212	Nuevo León	Vaca	Salinas Victoria	08/03/2011
187	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
188	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
189	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
191	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
193	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
194	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
195	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
196	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
197	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
198	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
199	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
200	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
201	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
202	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
209	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
210	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
211	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
190	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
192	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
203	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
204	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
205	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
206	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
207	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
208	Nuevo León	Cabra	Galeana	07/03/2011
175	Nuevo León	Cabra	Galeana	20/01/2011
173	Nuevo León	Cabra	Galeana	20/01/2011
174	Nuevo León	Cabra	Galeana	20/01/2011
171	Nuevo León	Cabra	Galeana	11/01/2011
170	Nuevo León	Cabra	Galeana	11/01/2011
172	Nuevo León	Cabra	Galeana	11/01/2011
143	Nuevo León	Cabra	Galeana	22/10/2010
118	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
107	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/10/2010
109	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/10/2010
111	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/10/2010
113	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/10/2010
114	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010

115	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
116	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
106	Nuevo León	Cabra	Zaragoza	08/10/2010
108	Nuevo León	Cabra	Zaragoza	08/10/2010
110	Nuevo León	Cabra	Zaragoza	08/10/2010
112	Nuevo León	Cabra	Zaragoza	08/10/2010
119	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
120	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
121	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
122	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
117	Nuevo León	Cabra	Galeana	08/10/2010
65	Nuevo León	Cabra	Aramberri	14/08/2010
64	Nuevo León	Cabra	Mina	12/08/2010
181	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	10/02/2010
62	Nuevo León	Cabra	Santa Catarina	26/01/2010
61	Nuevo León	Vaca	Dr. Arroyo	24/01/2010
54	Nuevo León	Cabra	Hidalgo	30/11/2009
53	Nuevo León	Vaca	Pesquería	30/11/2009
48	Nuevo León	Vaca	Apodaca	27/11/2009
52	Nuevo León	Vaca	Apodaca	27/11/2009
50	Nuevo León	Cabra	Villaldama	27/11/2009
46	Nuevo León	Vaca	Apodaca	26/11/2009
45	Nuevo León	Vaca	Pesquería	26/11/2009
47	Nuevo León	Vaca	Apodaca	26/11/2009
44	Nuevo León	Vaca	Pesquería	26/11/2009
36	Nuevo León	Vaca	Juárez	23/11/2009
37	Nuevo León	Cabra	El Carmen	23/11/2009
35	Nuevo León	Cabra	Cadereyta	21/11/2009
31	Nuevo León	Vaca	Cadereyta	21/11/2009
32	Nuevo León	Vaca	Cadereyta	21/11/2009
34	Nuevo León	Vaca	Cadereyta	21/11/2009
26	Nuevo León	Vaca	Escobedo	20/11/2009
29	Nuevo León	Vaca	Sabinas Hgo.	20/11/2009
28	Nuevo León	Vaca	Zuazua	20/11/2009
21	Nuevo León	Vaca	Anáhuac	23/09/2009
22	Nuevo León	Vaca	Anáhuac	23/09/2009
23	Nuevo León	Vaca	Lampazos	23/09/2009
24	Nuevo León	Vaca	Villaldama	23/09/2009
20	Nuevo León	Cabra	Linares	18/09/2009

8	Nuevo León	Cabra y Vaca	Villaldama	05/09/2009
3	Nuevo León	Vaca	Apodaca	04/09/2009
4	Nuevo León	Vaca	Apodaca	04/09/2009
5	Nuevo León	Vaca	Apodaca	04/09/2009
2	Nuevo León	Vaca	Apodaca	04/09/2009
6	Nuevo León	Vaca	Apodaca	04/09/2009
1	Nuevo León	Vaca	Apodaca	02/09/2009
283	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
289	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
303	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
291	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/10/2011
292	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/10/2011
293	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/10/2011
301	Nuevo León	Cabra	Guadalupe	13/10/2011
287	Nuevo León	Cabra	Zaragoza	13/10/2011
57	Nuevo León	Vaca	Apodaca	02/12/2009
72	Nuevo León	Cabra	Aramberri	13/09/2010
146	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
149	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
150	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
151	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
152	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
153	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
154	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
155	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
91	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
92	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
93	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
94	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
95	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
96	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
343	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
344	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
345	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
347	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
348	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
351	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
352	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/12/2011
358	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011

359	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
360	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
361	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
362	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
363	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	20/10/2011
368	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2011
369	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	16/08/2011
383	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	21/06/2012
385	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	21/06/2012
342	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	11/07/2011
224	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/04/2011
225	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/04/2011
227	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
229	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
230	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
232	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
357	Nuevo León	Cabra y Vaca	Dr. Arroyo	20/10/2011
43	Nuevo León	Vaca	Linares	25/11/2009
103	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
104	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
105	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
73	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
74	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
75	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
76	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
77	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
78	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
79	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
81	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
386	Nuevo León	Cabra	Galeana	21/06/2012
169	Nuevo León	Cabra	Galeana	03/12/2010
144	Nuevo León	Cabra	Galeana	25/10/2010
145	Nuevo León	Cabra	Galeana	25/10/2010
25	Nuevo León	Vaca	Linares	23/09/2009
84	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
88	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
90	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
69	Nuevo León	Vaca	Monterrey	15/08/2010
87	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010

89	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
58	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	02/12/2009
59	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	02/12/2009
310	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	01/11/2011
311	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	01/11/2011
313	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	01/11/2011
70	Nuevo León	Vaca	San Pedro Garza García	15/08/2010
63	Nuevo León	Cabra	Santa Catarina	26/01/2010
56	Nuevo León	Vaca	Santa Catarina	02/12/2009
277	Nuevo León	Cabra	Aramberri	13/10/2011
263	Nuevo León	Vaca	Cadereyta	30/09/2011
147	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
148	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	25/10/2010
274	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
275	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
276	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
278	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
279	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
280	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
281	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
282	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
284	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
288	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
294	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
295	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
296	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
297	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
298	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
299	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
304	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
305	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/10/2011
98	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
99	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
226	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
228	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
231	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
233	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	08/05/2011
306	Nuevo León	Vaca	Dr. Arroyo	13/10/2011

262	Nuevo León	Cabra	El Carmen	30/09/2011
101	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
290	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/10/2011
80	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
300	Nuevo León	Cabra	Guadalupe	13/10/2011
302	Nuevo León	Cabra	Guadalupe	13/10/2011
285	Nuevo León	Cabra	Mier y Noriega	13/10/2011
286	Nuevo León	Cabra	Mier y Noriega	13/10/2011
264	Nuevo León	Cabra	Mina	30/09/2011
82	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
86	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
83	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
85	Nuevo León	Vaca	Monterrey	13/09/2010
97	Nuevo León	Cabra	Dr. Arroyo	13/09/2010
100	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
312	Nuevo León	Vaca	San Nicolás	01/11/2011
102	Nuevo León	Cabra	Galeana	13/09/2010
257	San Luis Potosí	Vaca	Monterrey	15/08/2011
182	San Luis Potosí	Vaca	Monterrey	20/02/2011
186	San Luis Potosí	Cabra	Monterrey	20/02/2011
67	San Luis Potosí	Cabra	Monterrey	14/08/2010
66	San Luis Potosí	Cabra	Monterrey	14/08/2010
68	San Luis Potosí	Cabra	Monterrey	14/08/2010
178	San Luis Potosí	Cabra	Monterrey	10/02/2010
180	San Luis Potosí	Vaca	Monterrey	10/02/2010
41	San Luis Potosí	Cabra	San Nicolás	25/11/2009
42	San Luis Potosí	Vaca	San Nicolás	25/11/2009
30	San Luis Potosí	Vaca	Escobedo	20/11/2009
71	San Luis Potosí	Cabra	San Nicolás	15/08/2010
185	San Luis Potosí	Cabra	Monterrey	20/02/2011
250	Tamaulipas	Vaca	Monterrey	15/08/2011
259	Tamaulipas	Vaca	Monterrey	15/08/2011
183	Tamaulipas	Vaca	Monterrey	20/02/2011
55	Tamaulipas	Vaca	San Nicolás	30/11/2009
40	Tamaulipas	Vaca	San Nicolás	25/11/2009
60	Tamaulipas	Vaca	San Nicolás	02/12/2009
316	Veracruz	Vaca	San Nicolás	16/08/2012
248	Veracruz	Vaca	Monterrey	15/08/2011
51	Veracruz	Vaca	San Nicolás	27/11/2009

33	Veracruz	Vaca	Cadereyta	21/11/2009
27	Veracruz	Vaca	Ciénaga de Flores	20/11/2009
249	Zacatecas	Vaca	Monterrey	15/08/2011