



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

**CENTRO UNIVERSITARIO UAEM AMECAMECA**

**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**“PREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO DE *BRUCELLA ABORTUS* EN HATOS LECHEROS DE LOS MUNICIPIOS DE AMECAMECA Y AYAPANGO, ESTADO DE MÉXICO.”**

**T E S I S**

**P R E S E N T A N:**

**P. MVZ. Mabel Gethsemani Jaimes González**

**P. MVZ. Lizbeth Andrea Ochoa Campos**

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:**

**ASESOR DR. ROBERTO MONTES DE OCA JIMÉNEZ**

**COASESOR DRA. ERENDIRA QUINTANA SÁNCHEZ**

**AMECAMECA DE JUÁREZ ESTADO DE MÉXICO. MARZO, 2022.**

**“Prevalencia y factores de riesgo de *Brucella abortus* en hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.”**

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Antecedentes	9
2.2 Sinonimias	11
2.3 Agente etiológico	12
2.4 Supervivencia de <i>Brucella sp</i> en el ambiente	15
2.5 Ciclo de vida	16
2.6 Patogenia	17
2.7 Transmisión	20
2.8 Signos clínicos	22
2.9 Prevalencia	22
2.10 Diagnóstico	27
2.11 Diagnóstico diferencial	30
2.12 Tratamiento	30
2.13 Prevención y control	32
2.14 Vacunación	33
2.15 Factores de riesgo	35
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>37</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>40</b>
<b>V. HIPÓTESIS</b>	<b>41</b>
<b>VI. OBJETIVOS</b>	<b>42</b>
<b>VII. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>43</b>
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>54</b>
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>61</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>74</b>
<b>XI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b>	<b>75</b>
<b>XII. IMPLICACIONES ÉTICAS</b>	<b>76</b>
<b>XIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>77</b>
<b>XIV. ANEXOS</b>	<b>87</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

## PÁGINA

Tabla 1. Especie de <b><i>Brucella</i></b> por huésped. El potencial zoonótico se clasifica como patogenicidad y virulencia en huéspedes humanos.	14
Tabla 2. Períodos de supervivencia de <b><i>Brucella abortus</i></b> en varios sustratos.	16
Tabla 3. Dirección de campañas zoonitarias. Datos de constancias de hatos libre de brucelosis emitidas enero-diciembre 2019.	26
Tabla 3A. Dirección de campañas zoonitarias. Datos de constancias de hatos libre de brucelosis emitidas enero-diciembre 2019.	27
Tabla 4. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de infección por <b><i>Brucella abortus, melitensis o suis.</i></b>	29
Tabla 5. Esquemas de tratamiento sugeridos por la Organización Mundial de la Salud y aceptados por la Norma Oficial Mexicana.	32
Tabla 6. Datos obtenidos en la encuesta de las condiciones sanitarias, manejo y uso de tecnologías en las unidades de producción pecuaria.	56
Tabla 7. Prevalencia de <b><i>Brucella abortus</i></b> a través de la prueba de tarjeta, rivanol e INMUNODIFUSIÓN radial en unidades de producción de bovinos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.	57
Tabla 8. Prevalencia de <b><i>Brucella abortus</i></b> en hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.	58
Tabla 9. Prevalencia de <b><i>Brucella abortus</i></b> en unidades de producción animal en Amecameca y Ayapango, Estado de México.	59

Tabla 10. Factores de riesgo asociados a la presencia de *Brucella abortus* en hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.

61

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
Figura 1. Ciclo infeccioso de <i>Brucella abortus</i> .	17
Figura 2. Transmisión de la brucelosis del animal al humano.	22
Figura 3. Mapa de distribución mundial de <i>Brucella abortus</i> .	24
Figura 4. Mapa de distribución de brucelosis en 2016 (Actualizar mapa, o revisar si es el más reciente).	25
Figura 5. Integración de los municipios de la región 1 Amecameca.	44

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>PÁGINA</b>
Cuadro 1. Fundamento, sensibilidad y especificidad de las pruebas: Tarjeta, Rivanol e Inmunodifusión radial.	52
Cuadro 2. Descripción de variables colectadas para el análisis estadístico y su reclasificación de las unidades de producción pecuaria lechera de Amecameca y Ayapango, Estado de México.	54
 <b>ANEXOS</b>	
Anexo 1. Encuesta de para identificación de problemas reproductivos en hatos lecheros de Amecameca y Ayapango, Estado de México.	89

## I. INTRODUCCIÓN

Brucelosis es el nombre genérico que se aplica a las infecciones, humanas o animales, causadas por distintas especies del género *Brucella*, principalmente *Brucella abortus* (*B. abortus*), *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) y *Brucella suis* (*B. suis*). En el ganado bovino, la infección por *Brucella* suele deberse a *B. abortus*, menos frecuentemente a *B. melitensis* y en ocasiones a *B. suis* (Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad animal, 2018).

Esta enfermedad infectocontagiosa es de origen bacteriano, atribuida al género *Brucella*, que son pequeños cocobacilos, aerobios estrictos, gramnegativos, intracelulares facultativos, de reproducción intracelular (Harrison y Posada, 2018; Mantur *et al.*, 2007). La transmisión de esta enfermedad puede realizarse a través de la ingestión de leche o sus derivados procedentes de animales enfermos, cuando la leche no ha sido pasteurizada en forma adecuada, pudiendo también transmitirse a través del contacto con animales infectados en las prácticas rutinarias del campo (NOM-041-ZOO-1995).

Es considerada una zoonosis de distribución mundial, causante de pérdidas económicas para el sector pecuario, afectando significativamente a pequeños productores y siendo foco de infección para la salud pública. En la actualidad, el crecimiento más agudo en número de casos se está registrando en países de Asia Central y Sudoriental. Se cree que varios países de Europa Occidental y del Norte, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda, están libres del agente infeccioso (OIE, 2020).

En México, el Estado de Baja California Sur está reconocido como libre de Brucelosis. El 28.99% del territorio nacional está reconocido en fase de Erradicación (SENASICA, 2020b). Al controlar y erradicar la brucelosis en los animales, se eliminará la fuente de infección para el humano.

Por lo anterior mencionado el diagnóstico de esta enfermedad, es considerado uno de los puntos primordiales para establecer un control sobre la brucelosis, generando condiciones para el desarrollo creciente de la ganadería local, elevar la producción y mejorar la calidad sanitaria de los productos destinados al consumo humano.



De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales”, el diagnóstico debe realizarse con muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y muestras de tejidos, mediante pruebas inmunológicas y estudios bacteriológicos. Las pruebas inmunológicas establecidas por la Dirección de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, efectuadas por el personal oficial o aprobado son: para especies lisas la prueba de tarjeta, rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche; para detección de *Brucella ovis*, la prueba de inmunodifusión doble.

Un estudio realizado en 2012 en los municipios de Amecameca, Ayapango y Tlalmanalco en el Estado de México, determinó la seroprevalencia de Brucelosis Bovina, donde de 184 animales muestreados, no se encontró ninguno positivo bajo pruebas serológicas de alta sensibilidad y especificidad realizadas en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) (Domínguez, 2012).

El siguiente trabajo es un estudio que se realizará en los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México y que reportan actividades ganaderas, principalmente en la producción láctea. En la zona predominan las unidades de producción a pequeña escala, encontrando hatos desde 6 a 50 animales, trabajadas únicamente por miembros de la familia, donde también resaltan como su única o principal fuente de ingresos.

Desde el 2012, no hay evidencia de estudios realizados en la zona donde se demuestre la prevalencia de *Brucella abortus*, siendo esta una de las importantes causas de problemas reproductivos y pérdidas económicas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES

Los estudios más antiguos referentes a casos de brucelosis en humanos se remontan a Hipócrates (450 a. de C.). Durante la guerra de Crimea (1854-1856), se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas, la desconocida y nueva enfermedad se extendió a los países del Mediterráneo, en particular a la isla de Malta. Fue hasta 3 años después cuando Jeffery Allen Marston (1831-1911) realizó cuidadosos estudios clínicos y autopsias en los individuos con tales síntomas, detalló la enfermedad según apareció en la isla y confirmó la presencia del padecimiento en otras zonas (Padrón *et al.*, 2011). En 1861 Marston contrajo la enfermedad mientras trabajaba en el área del Mediterráneo y describió su propio caso dos años después, este fue el primer informe clínico sobre Brucelosis (Álvarez *et al.*, 2015).

Sir David Bruce descubrió el agente etiológico a finales del siglo XIX, quien fue enviado a investigar a la Isla de Malta (Mediterranean Fever Commission) el origen de un padecimiento febril que había provocado la muerte de un gran número de soldados. El agente se identificó en 1887 en el bazo de cuatro soldados fallecidos y fue denominado *Micrococcus melite* (Vega *et al.*, 2008). Posteriormente fue nombrado *Brucella melitensis* (*B. melitensis*) (Álvarez *et al.*, 2015).

El primer descubrimiento en animales fue en 1896 por el veterinario danés Bernhard Lauritz Frederik Bang de un feto bovino, que en un futuro se denominó *B. abortus* (Vega *et al.*, 2008). En 1897, Wright y Semple hicieron un estudio para diagnosticar a los individuos enfermos de *Micrococcus melitensis*, y en 1904 el doctor David Bruce (1855-1931) dirigió una comisión inglesa para revisar la enfermedad, la que toma su nombre (Padrón *et al.*, 2011). Themistokles Zammit documentó que el consumo de productos provenientes de las cabras era una fuente de contagio para adquirir la enfermedad. Desde mediados del siglo XVIII ya se tenía conocimiento de esta enfermedad en bovinos, se atribuía a un fenómeno considerado “por simpatía”, el argumento era que, si una vaca gestante observaba abortar a otra, lo hacía también a los pocos días o semanas, por lo que se recomendó el aislamiento de la

vaca afectada. En 1895 Bang y Stribolt describieron también cuadros de brucelosis, ratificando que era el aborto su principal signo. En este momento también se propuso que el toro distribuía entre las hembras y también la leche de vaca debido a la identificación de *Micrococcus abortus*, o bacilo de Bang, que hoy se conoce con el nombre de *Brucella abortus* (Padrón *et al.*, 2011).

Fue hasta 1914 que Traum estudió un microorganismo en los fetos abortados de cerdos que denominó *B. suis* (Vega *et al.*, 2008). En 1918 la Dra. Alice Evans al establecer una semejanza entre *Micrococcus melitensis* y *Bacillus abortus*, confirmó que esta enfermedad de los animales de crianza no ocasionaría contagio alguno al humano, si se consumiera su leche pasteurizada (Moreno, 2014). En 1920 la bacterióloga norteamericana Alice Evans confirmó la similitud de los microorganismos aislados por Bruce, Bang y Traum y sugirió designar el agente causal con el nombre de *Brucella*, en honor a Sir David Bruce.

A partir de 1934 se consideró que el contacto con las vacas era la principal fuente de infección para los humanos, dado que la incidencia de casos por *Brucella abortus* estaba en aumento en zonas rurales. En otras zonas se descartó el contagio de brucelosis caprina a humanos, debido al bajo consumo de leche de cabra, contrario a lugares donde existía una densa población caprina. A partir de entonces aumento los estudios de la enfermedad, fue en 1939 cuando se realizaron pruebas en el rastro de la Ciudad de México, 21 de 68 sueros fueron positivos en trabajadores que tenían contacto con el ganado vacuno (Padrón *et al.*, 2011).

Fue hasta 1956 cuando Buddle y Boyce identifican *B. ovis* en carneros, en 1957 Stoenner y Lackman aíslan *B. neotomae* y en 1968 Carmicheal y Bruner descubren *B. canis* en perros. Se conocieron dos nuevas especies de *Brucella* denominadas *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* en ballenas (Vega *et al.*, 2008). En 1906 Valenzuela y Carbajal realizan las primeras descripciones sobre Brucelosis en México, luego en 1921 Manuel Vergara describió casos de brucelosis en la ciudad de Puebla (Vega *et al.*, 2008).

En México, los estudios de Brucelosis se remontan al año 1906, donde Valenzuela y Carbajal realizan las primeras descripciones, luego en 1921 Manuel Vergara describió casos de brucelosis en la ciudad de Puebla (Vega *et al.*, 2008).

En el mismo año Vergara planteó la existencia de la enfermedad en el estado de Puebla y fue confirmada por Pláceres, quien aportó las pruebas serológicas y bacteriológicas necesarias. En 1924 se registró el primer caso de brucelosis en el Distrito Federal (hoy Ciudad de México), y en 1935 en el estado de Jalisco. El doctor López Portillo recopiló los índices de mortalidad de todos los estados de la República, siendo el más afectado Coahuila, donde ocurrían diez muertes por cada 100 mil habitantes; después Durango, Chihuahua, Querétaro, Guanajuato, Tamaulipas, Nuevo León y el Distrito Federal; en el resto de las entidades había menos de tres muertes por cada 100 mil habitantes (Padrón *et al.*, 2011).

De manera particular, *Brucella melitensis* es la especie responsable de la mayoría de los casos clínicos humanos debido al consumo de leche de cabra y sus derivados, en las áreas de gran densidad de cabra, como las zonas centro, sureste y costera. En 1996 se publicó en el *Diario Oficial de la Federación* la Norma Oficial Mexicana 041, en la cual se establecen los procedimientos de la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales (Padrón *et al.*, 2011).

## 2.2 SINONIMIAS

La Brucelosis clínica humana y animal conlleva una gran cantidad de sinónimos que incluyen: fiebre ondulante, fiebre de malta, fiebre mediterránea, aborto contagioso, enfermedad de Bang, fiebre napolitana, fiebre de Crimea y enfermedad del cuerpo. La mayoría de estos nombres todavía se usan en diferentes partes del mundo (Hull y Schumaker, 2018).

### 2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

Las especies del género *Brucella* son el agente causal de la brucelosis. Son pequeñas cocobacilos, aerobios estrictos, gramnegativos, no móviles, no formadores de esporas, de crecimiento lento, intracelulares facultativos, que pueden reproducirse solo intracelularmente (Mantur *et al.*, 2007, Harrison y Posada, 2018).

Taxonómicamente corresponde al filo Proteobacteria, clase Alphaproteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae (Glowacka *et al.*, 2018), producen oxidasa, catalasa, nitrato reductasa y ureasa (excepto *Brucella ovis*); no producen indol y no son hemolíticos. La mayoría (de nuevo excepto *B. ovis*); utilizan la glucosa como energía, se considera arma del bioterrorismo porque pueden propagarse en aerosol y no hay vacunas humanas (Corbel, 2006).

*Brucella* incluye las siguientes especies: *Brucella suis*, *Brucella ovis*, *Brucella abortus*, *Brucella canis*, *Brucella melitensis*, *Brucella neotomae*, *Brucella ceti*, *Brucella pinnipedialis*, *Brucella microti*, *Brucella inopinata*, *Brucella papionis*, *Brucella vulpis* y otras cepas sin nomenclatura, que incluyen muestras ambientales (Glowacka *et al.*, 2018).

Cada especie tiene un hospedero preferido que sirve como reservorio principal para la infección. *B. abortus* causa enfermedades en el ganado y las infecciones generalmente conducen al aborto; mientras que *B. suis* es responsable de la brucelosis en los cerdos, lo que provoca problemas reproductivos, las ovejas son hospederos de *B. melitensis*; la infección causa problemas de fertilidad y *B. ovis* es un factor etiológico en la esterilidad de los carneros (Tabla 1) (Medig *et al.*, 2010).

**Tabla 1.** Especies de *Brucella* por hospedero. El potencial zoonótico se clasifica como patogenicidad y virulencia en hospederos humanos.

ESPECIE	RESERVORIO NATURAL	POTENCIAL ZOOINÓTICO
<i>B. melitensis</i>	Ovejas, cabras y camellos	Si, alto
<i>B. abortus</i>	Ganado, alces y bisontes	Si, alto
<i>B. suis</i>	Cerdos, liebres, renos / caribúes	Si, alto
<i>B. canis</i>	Perros (domésticos y salvajes)	Si, moderado
<i>B. ovis</i>	Oveja	No hay infecciones reportadas
<i>B. neotomae</i>	Ratas de madera del desierto	No hay infecciones reportadas
<i>B. cetis</i>	Cetáceos	Si, bajo
<i>B. pinnipedialis</i>	Pinnípedos	Si, bajo
<i>B. microti</i>	Zorros rojos y topillos comunes	No hay infecciones reportadas
<i>B. papionis</i>	Primates no humanos	No hay infecciones reportadas
<i>B. vulpis</i>	zorro rojo	No hay infecciones reportadas

Fuente tomada y modificada de: (Hull y Schumaker, 2018)

Las primeras descripciones de las especies de *Brucella* se asociaron específicamente con animales de ganado, como ovejas y cabras para *B. melitensis*, ganado bovino *B. abortus* y cerdos para *B. suis*, en los que pueden causar abortos y otras enfermedades reproductivas. Estas especies son altamente transmisibles a los humanos a través del contacto directo con animales infectados, aerosoles o el consumo de productos lácteos de leche cruda, y pueden producir infecciones crónicas debilitantes. Han sido aisladas otras especies de la vida silvestre y consisten en su orden de descripción de: (I) *B. neotomas* aislados de roedores (Stoenner y Lackman, 1957), (II) *B. ceti* y *B. pinnipedialis* aislados de mamíferos marinos (Foster *et al.*, 2007), (III) *B. microti* inicialmente aislado del topillo común pero luego encontrado en una variedad más amplia de animales como zorros rojos, jabalíes e incluso ranas (Scholz *et al.*, 2008; Jaý *et al.*, 2018) (IV) *B. papionis* aislado de babuinos (Whatmore *et al.*, 2014) y (V) *B. vulpis* aislado de zorros rojos (Scholz *et al.*, 2016). Se ha informado de nuevas cepas de *Brucella* más distantes genéticamente y que comprenden varias especies potenciales (Tiller *et al.*, 2010; Eisenberg *et al.*, 2012; Eisenberg *et al.*, 2016). Hasta la fecha, solo una especie de este grupo de cepas ha sido publicada válidamente como *B. inopinata*, y consiste en un solo aislado humano para el cual aún no se ha identificado el reservorio animal o ambiental (De *et al.*, 2008, Scholz *et al.*, 2010).

Actualmente la clasificación de *Brucella* incluye 12 especies clasificadas como "clásicas" o "atípicas", según sus características fenotípicas y sus relaciones filogenéticas (Scholz *et al.*, 2018).

#### 1.4 SUPERVIVENCIA DE BRUCELA EN EL AMBIENTE

En condiciones apropiadas, *Brucella* puede sobrevivir fuera del hospedero en el medio ambiente durante períodos prolongados. Pueden permanecer viables en cadáveres y tejidos por hasta 6 meses a aproximadamente 0°C. Sobreviven hasta 125 días en polvo o tierra, y hasta 1 año en heces. Las brucelas son susceptibles a varios desinfectantes, incluyendo hipoclorito de sodio al 1%, fenólicos, etanol al 70%, yodóforos, glutaraldehído y formaldehído. La presencia de materia orgánica o el uso a bajas temperaturas puede reducir en gran medida la eficacia del desinfectante. Los organismos se inactivan físicamente por calor húmedo (121° C, ≥ 15 minutos) y por calor seco (160°-170° C, ≥ 1 hora) (Songer y Post, 2004).

**Tabla 2.** Períodos de supervivencia de *Brucella abortus* en varios sustratos.

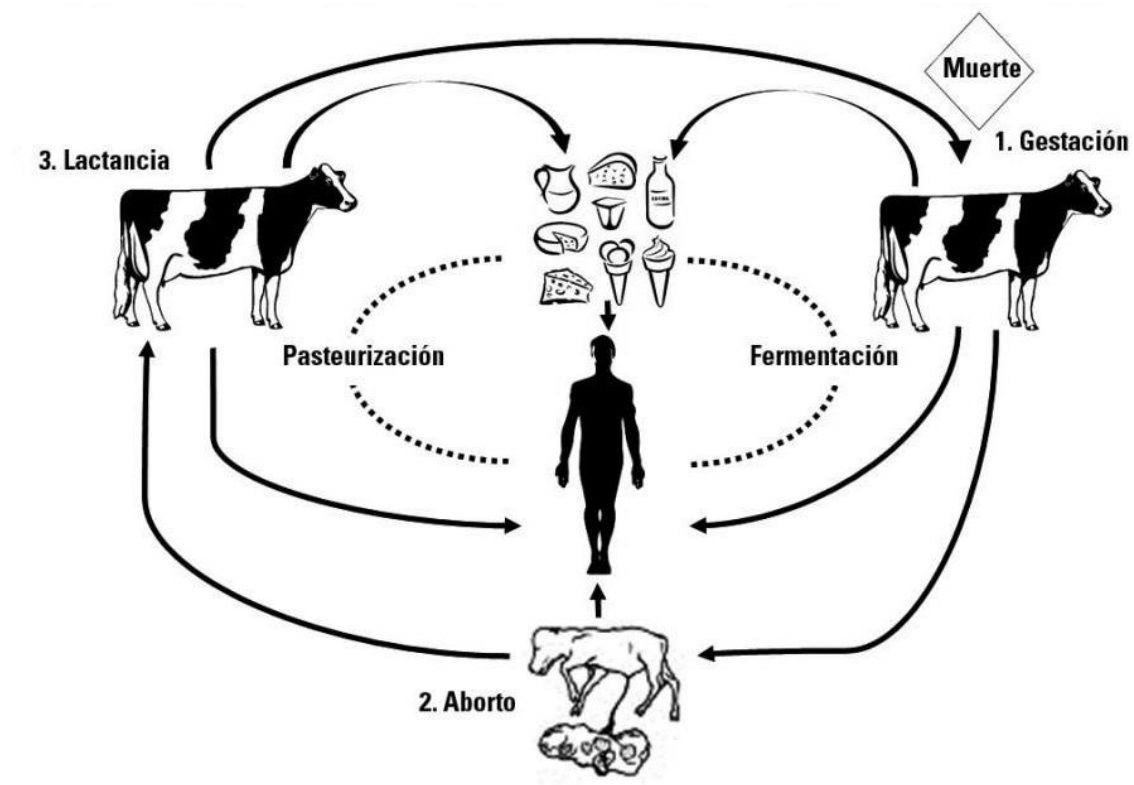
Medio	Temperatura o ambiente	Supervivencia
Superficies sólidas	<31 °C, luz solar	4-5 horas
Agua del grifo	-4 °C	114 días
Agua de lago	37 °C, pH 7.5	<1 día
Agua de lago	8 °C, pH 6.5	>57 días
Suelo – seco	>20 °C	< 4 días
Suelo – mojado	<10 °C	66 días
Estiércol	Verano	1 día
Estiércol	Invierno	53 días
Residuos animales (estiércol agrícola)	tanque de temperatura ambiente	7 semanas

Fuente tomada y modificada de: Corbel 2006.



## 2.5 CICLO DE VIDA

Una vaca gestante puede abortar como consecuencia de una infección con *B. abortus*. El humano y otros animales pueden contagiarse por contacto con tejidos, sangre, orina, secreciones vaginales, fetos abortados o placentas de animales infectados; la bacteria puede persistir en el ambiente y eventualmente colonizar las ubres de las vacas. Existe otra vía por la cual el humano puede contagiarse, el microorganismo se puede diseminar por consumo de leche cruda, productos lácteos sin pasteurizar, se incluyen productos de cabras y ovejas (Arenas, y Moreno, 2016).



**Figura 1.** Ciclo infeccioso de *Brucella abortus*.

Fuente: Adaptado de Moreno, 2014.

## 2.6 PATOGENIA

Las bacterias intracelulares han tenido que evolucionar para encontrar la manera de sobrevivir al medio ambiente y diseminarse a nuevos hospederos (Degos *et al.*, 2020). Lograda esta tarea los microorganismos pueden entrar por ingestión o inhalación, también por membranas como las mucosas o laceraciones de la piel (Harrison y Posada, 2018).

*Brucella sp.* son bacterias clasificadas por su forma como cocobacilos, intracelulares facultativos, se trata de una zoonosis de distribución mundial que afecta al ganado y la vida silvestre con pérdidas económicas, debido a que los animales infectados con *Brucella* sufren aborto e infertilidad, reduciendo su eficiencia reproductiva (Corbel, 1997; Cutler *et al.* 2005; Moreno, 2014; Hull y Schumaker, 2018).

*Brucella spp* ha sido considerada como un agente de guerra potencial (Robinson-Dunn, 2002); razón por la cual solo se manipula en laboratorios de nivel III. *Brucella spp.* tienen la capacidad de evadir los mecanismos de defensa del sistema inmunitario del hospedero, pueden ingresar, sobrevivir y replicarse dentro de células no fagocíticas o fagocíticas (Gorvel y Moreno, 2002; Martirosyan *et al.*, 2011; Von Bargen *et al.*, 2012; Byndloss y Tsolis, 2016). Las especies de *Brucella* carecen de exotoxinas y endotoxinas que son factores de virulencia clásicos, el mayor determinante de virulencia de esta bacteria es el lipopolisacárido S (LPS-S) predominando una respuesta inmunitaria de tipo humoral, la cual es la responsable de conferir protección en contra de la infección por esta bacteria (Segura, 2005; Mantur *et al.*, 2007).

Para invadir a sus células hospederas *Brucella* emplea distintas estrategias, en macrófagos, la cadena O del lipopolisacárido (LPS) liso de las bacterias no opsonizadas interactúa con moléculas receptoras ubicadas en la membrana de la célula hospedera, como ManR, entre otros, posteriormente es ingerida por medio de las balsas lipídicas. Ingresa a la célula hospedera por un mecanismo de fagocitosis tipo “zipper”, el cual se caracteriza por la inducción de modificaciones limitadas en la membrana y el citoesqueleto de la célula hospedera (Porte *et al.*,

2003; Moreno y Gorvel, 2004). Las brucelas también pueden ser ingeridas por macrófagos cuando son opsonizadas a través de receptores Fc, de complemento o de fibronectina (Moreno y Gorvel, 2004). En otras células como intestinales M y epiteliales, también se ha observado el ingreso de *Brucella* por medio del mecanismo tipo “zipper”. En células HeLa, *Brucella* se une a receptores desconocidos en la membrana y penetra por fagocitosis con reclutamiento reducido de actina y activación de GTPasas pequeñas como Cdc42, Rac y Rho. La bacteria logra unirse en mayor cantidad y penetra de manera más eficiente cuando las células HeLa se tratan con el factor citotóxico necrotizante (CNF), este impulsa la formación de pliegues y fibras de estrés en la membrana de la célula hospedera (Guzmán *et al.*, 2001). Generalmente, sólo los fagocitos profesionales logran interiorizar un alto número de bacterias debido a su naturaleza fagocítica (Celli *et al.*, 2003). No obstante, la eficiencia de internalización en fagocitos no profesionales suele ser baja, lo que sugiere que no todas las células son permisivas, o bien que no todas las bacterias son capacitadas para unirse a fagocitos no profesionales (Sola *et al.*, 1998). La mayor parte de las bacterias que son ingeridas por macrófagos son dirigidas a los fagolisosomas donde el principal objetivo es alcanzar el retículo endoplásmico, que es su nicho replicativo, pero muy pocas lo logran. En contraste en células epiteliales, la mayoría de las bacterias fagocitadas son dirigidas al retículo endoplásmico y dejando una menor cantidad a los lisosomas (Moreno y Gorvel, 2004). El modelo más acertado describe que una vez que *Brucella* se internaliza en los macrófagos, escapa de la vía endocítica y se localiza en un compartimento no replicativo denominado vacuola que contiene *Brucella* (BCV), el cual interactúa rápidamente con los lisosomas, pero escapa de ellos y se transforma en una vacuola con pH ácido. Posteriormente cambia su pH a neutro, esto lo logra a través de la adquisición de propiedades del retículo endoplásmico por una interacción y fusión limitada con este organelo. Entonces la BCV se transforma en un organelo derivado del retículo endoplásmico que permite la replicación bacteriana (Celli *et al.*, 2003).

*Brucella* también inhibe o retrasa la unión de fagosomas y lisosomas tanto en macrófagos como en células epiteliales, evitando la pronta degradación enzimática

del material ingerido (Ko y Splitter, 2003). Después de que la bacteria alcanza su replicación se encuentra protegida de antibióticos y factores bactericidas del hospedero como el complemento y los anticuerpos, esto facilita el establecimiento de una infección crónica (Roop *et al.*, 2009). La BCV una vez que alcanza su potencial replicativo se convierte en un compartimento con características autofágicas abreviado como aBCV. La aBCV requiere algunas proteínas que están implicadas en el inicio de la autofagia. La formación aBCV es necesaria para culminar el ciclo intracelular de *Brucella* y para la diseminación de la bacteria entre célula y célula, lo que demuestra que esta bacteria es capaz de apropiarse selectivamente de los complejos de iniciación de la autofagia para tomar el control de la célula hospedera y promover la infección (Starr *et al.*, 2012). *Brucella* también logra reconocer algunas señales de estrés (acídico o nutricional) a nivel intracelular lo que es necesario para regular su propia expresión génica e incluso transformar algunas funciones de los fagocitos profesionales. Puede inducir resistencia a la apoptosis en macrófagos, así como inhibir la capacidad de presentación de antígenos de las células dendríticas (Roop *et al.*, 2009).

### Respuesta Inmune

Una vez ingresa *Brucella* a un organismo comienza la activación de mecanismos de defensa, los primeros en participar son algunos componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los polimorfo nucleares neutrófilos y los macrófagos. Los polimorfo nucleares neutrófilos son las primeras células del hospedero que tienen contacto con *Brucella*, en ellos puede sobrevivir y reproducirse, de esta forma ser transportada a los tejidos linfoides. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares es necesaria la degranulación de los gránulos de los neutrófilos, pero se ha demostrado que *Brucella* posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evitan así su destrucción.

Otras células que reaccionan ante la presencia de *Brucella* son los macrófagos. El ingreso de la bacteria a los mismos se produce a través de la interacción entre la molécula CD14 y el LPS, con ello la producción de IL-12 que estimula las células NK y los linfocitos T colaboradores o helper (LTH) CD4+, que secretan IFN- $\gamma$ ,

favoreciendo el desarrollo de una respuesta inmune predominantemente mediada por LTH1. Se estimula una respuesta inmune de tipo celular con la participación de los linfocitos T. Los macrófagos tienen la capacidad de destruir la bacteria pero al igual que en los polimorfo nucleares neutrófilos, *Brucella* puede inhibir estos mecanismos de destrucción. Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos, en especial en infecciones crónicas, donde suelen alcanzar títulos elevados (Castro *et al.*, 2005).

## 2.7 TRANSMISIÓN

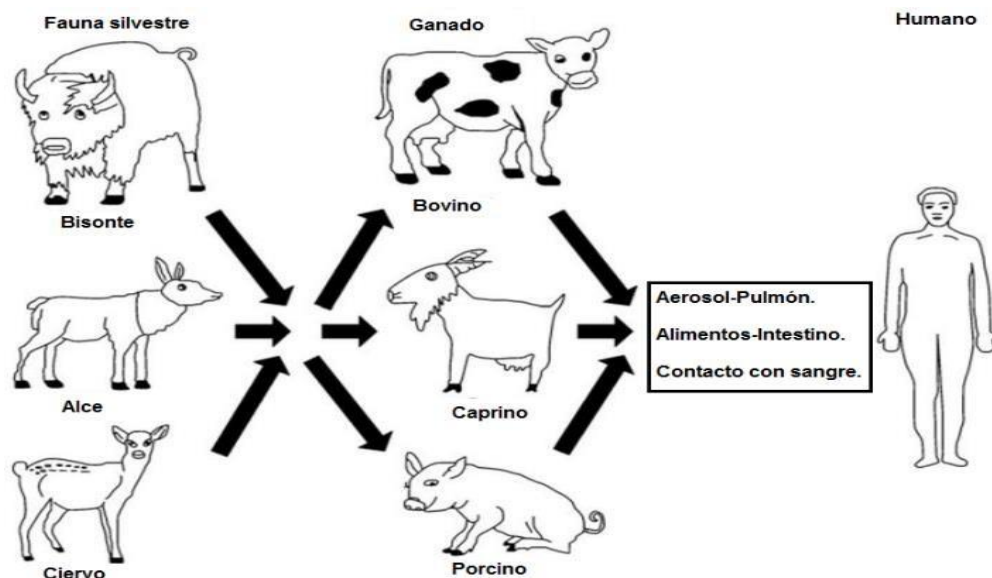
**Animales:** la transmisión de *Brucella* puede ser por contacto directo o por ingestión de alimento o agua contaminada (Jamil *et al.*, 2020), también cuando un animal sano lame terneros o fetos abortados (Songer y Post, 2004). En los líquidos del parto del animal infectado hay una gran cantidad de bacterias y en las descargas uterinas en partos posteriores (Carrisoza *et al.*, 2014; OIE, 2020) que pueden sobrevivir varios meses en el medio externo, especialmente en condiciones frías y húmedas, y siguen siendo infecciosas para otros animales, que se contagiarán al ingerirlas (OIE, 2020). La transmisión sexual por lo general juega un pequeño papel en la transmisión de los bovinos; sin embargo, la inseminación artificial puede diseminar la enfermedad y el semen solo debe recolectarse de animales que se sepa que están libres de infección (Corbel, 2006).

**Humanos:** la infección por brucelosis al igual que en los animales puede ocurrir directamente, por contacto con sus secreciones de animales infectados, o indirectamente por ingestión de carne poco cocida, leche no pasteurizada, por transfusiones sanguíneas, agua contaminada, inhalación, vectores de artrópodos y plagas (Méndez *et al.*, 2015), o debido también por la poca bioseguridad e higiene durante el manejo de los animales (Zambrano y Pérez, 2015). Los humanos pueden

ser infectados por *Brucella abortus* (vacas), *Brucella canis* (perros), *Brucella suis* (cerdos) y *Brucella melitensis* (ovejas y cabras) (Shabana y Krimly, 2019).

Desafortunadamente la principal población con mayor riesgo de contraer la enfermedad son los Médicos Veterinarios Zootecnistas, empleados de los mataderos y las empresas de procesamiento de carne debido a la dependencia de los reservorios de animales, además se estima que, de todos los casos reportados de brucelosis humana, el 2% de las infecciones son debido al trabajo de laboratorio, con una tasa de ataque de 30-100% (Preis *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

Dentro de la cadena de transmisión de *Brucella sp.* además de incluir el ganado productivo (bovinos, caprinos, ovinos y suinos) y humanos, se puede incluir a los animales de la vida silvestre. El ganado adquiere las enfermedades de *Brucella* de los reservorios naturales, como bisontes, alces y venados. Los humanos son infectados por estos animales enfermos y/o sus productos, ya sea por inhalación de aerosol contaminado, por ingestión de alimentos como leche y queso no pasteurizados (Yang *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Transmisión de la brucelosis del animal al humano.

Fuente tomada y modificada de Yang *et al.*, 2013.

## 2.8 SIGNOS CLÍNICOS

**Animales:** La principal manifestación de la infección por *Brucella* en las hembras es el aborto durante el último trimestre de gestación, la inflamación de los genitales y las membranas fetales, las lesiones en los vasos linfáticos y las articulaciones, infertilidad, retención placentaria, terneros recién nacidos débiles (Shabana *et al.*, 2019; Ávila *et al.*, 2019), en los machos, *Brucella abortus* afectara principalmente en los testículos, lo que produce epididimitis por orquitis unilateral e inflamación de los órganos reproductores accesorios, con disminución de la libido y disminución de la fertilidad, estos signos han sido mayormente observados en ovinos (Songer *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2013).

**Humanos:** La enfermedad se puede tornar en un curso agudo, subagudo o crónico y provocar daños graves para la salud física y mental de los pacientes. Empeorando la situación la falta de tratamiento efectivo y métodos de diagnóstico confiable y oportuno, la brucelosis amenaza seriamente la salud humana y es un problema de salud mundial (Wang *et al.*, 2020). Los síntomas comunes de la brucelosis humana son fiebre ondulante, debilidad, dolor de cabeza, dolor en las articulaciones, sudores nocturnos (Shabana *et al.*, 2019).

Mientras que los síntomas de la brucelosis crónica incluyen fatiga y complicaciones de sacroileítis, espondilitis, osteomielitis y bursitis (Yang *et al.*, 2013), además se pueden presentar complicaciones neurológicas, endocarditis y formación de abscesos testiculares u óseos, que persisten durante semanas o meses reduciendo la capacidad de un paciente para el trabajo (Dean *et al.*, 2012).

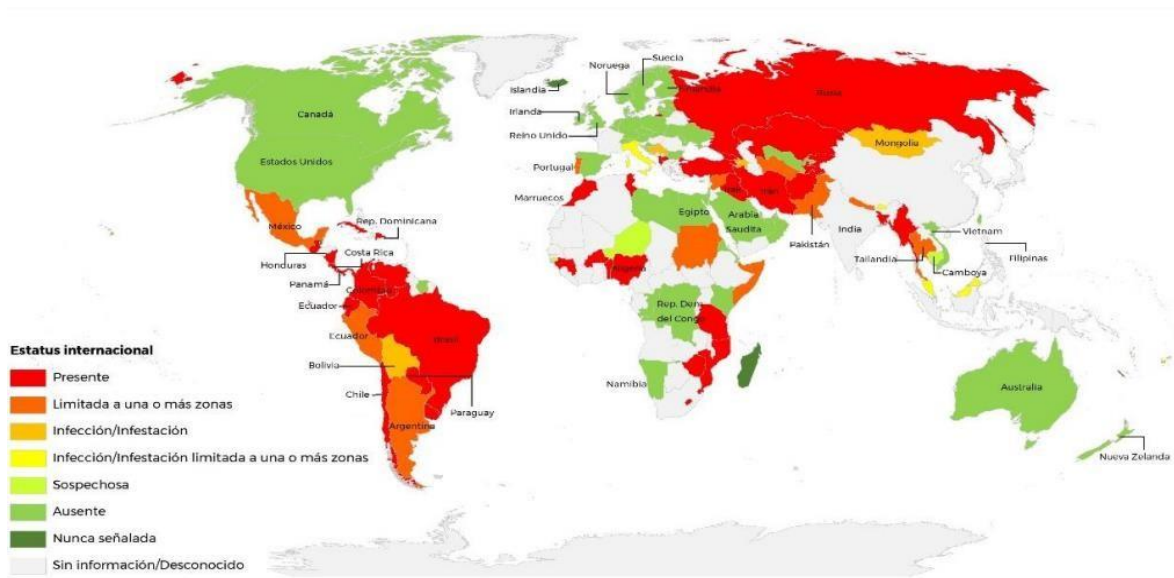
## 2.9 PREVALENCIA

### **Situación mundial de la brucelosis**

La brucelosis bovina se considera una zoonosis global, dado que se manifiesta en Europa, en el oeste de Asia, en algunas zonas de África y en toda América. También

se encuentran registros en varios países de Sudamérica de forma endémica, por lo cual resulta un problema sanitario importante (Peña *et al.*, 2014).

En cuanto a la incidencia los mayores números se sitúan en Oriente Medio, la región Mediterránea, el África subsahariana, China, India, Perú y México. En la actualidad, el crecimiento más agudo en número de casos se está registrando en países de Asia Central y Sudoriental. Se cree que varios países de Europa Occidental y del Norte, así como Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda, están libres del agente infeccioso (OIE, 2020) (Figura 3).



**Figura 3.** Mapa de distribución mundial de *Brucella abortus*.

Fuente tomada de: OIE 2019.

Estados Unidos presenta menos de 100 casos reportados por año, y la mayoría ocurre en el sur y suroeste, debido a quesos blandos importados ilegalmente (sin pasteurizar) de México (Gould *et al.*, 2014). Sin embargo, en los Estados Unidos la incidencia real se ha estimado entre 5 y 12 veces mayor, por enfermedades transmitidas en su mayoría debido a los alimentos (Scallan *et al.*, 2011). Se ha informado que Siria tiene la incidencia más alta (1,603.4 casos por cada 1,000,000 de individuos), le sigue Mongolia (con 30910), Iraq (268.8), Tayikistán (211.9),



Arabia Saudita (149.5) e Irán (141.6) (Pappas *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010; Gould *et al.*, 2014). Varios países han tenido una incidencia superior a 200 en la última década, pero desde entonces han disminuido drásticamente, como en Turquía (49.5) y Kirguistán (88.0) (Dean *et al.*, 2012).

### Situación actual del control de la brucelosis en México.

El Estado de Baja California Sur está reconocido como libre de Brucelosis y Sonora se encuentra libre de brucelosis causada por especies lisas. El 28.99% del territorio nacional está reconocido en fase de Erradicación (reconocidos en fase de erradicación los estados de Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit, Quintana Roo y Yucatán, así como las regiones A de Aguascalientes, Baja California, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Puebla, Oaxaca y Querétaro) (SENASICA, 2020b).



**Figura 4.** Mapa de la distribución de brucelosis en México

Fuente tomada de: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2020b).

**Tabla 3. DATOS DE CONSTANCIAS DE HATOS LIBRE DE BRUCELOSIS  
EMITIDAS EN ENERO-DICIEMBRE 2019**

<b>HATOS LIBRES BOVINOS</b>		
<b>ESTADO</b>	<b>Hatos</b>	<b>Cabezas</b>
Aguascalientes	54	3,941
Baja California	147	41,350
Baja California Sur	1	165
Campeche	107	35,526
Chiapas	532	93,779
Chihuahua	132	56,331
Ciudad de México	4	189
Coahuila de Zaragoza	78	35,516
Colima	37	6,520
Durango	137	41,400
Guanajuato	135	27,266
Guerrero	686	26,952
Hidalgo	34	2,558
Jalisco	1,176	122,390
México	<b>147</b>	<b>8,810</b>
Michoacán de Ocampo	286	20,125
Morelos	116	2,631

**Tabla 3A. DATOS DE CONSTANCIAS DE HATOS LIBRE DE BRUCELOSIS  
EMITIDAS EN ENERO-DICIEMBRE 2019**

<b>Nayarit</b>	72	8,260
<b>Nuevo León</b>	401	86,408
<b>Oaxaca</b>	1,848	59,911
<b>Puebla</b>	284	19,244
<b>Querétaro</b>	258	31,743
<b>Quintana Roo</b>	16	1,772
<b>San Luis Potosí</b>	66	15,298
<b>Sinaloa</b>	168	37,700
<b>Sonora</b>	6	3,399
<b>Tabasco</b>	354	92,567
<b>Tamaulipas</b>	241	77,220
<b>Tlaxcala</b>	23	3,032
<b>Veracruz</b>	328	81,937
<b>Yucatán</b>	135	22,434
<b>Zacatecas</b>	104	15,733
<b>Total</b>	<b>8,113</b>	<b>1,082,107</b>

Fuente tomada y modificada de: Sistema de Constatación de Hatos Libres de Tuberculosis y Brucelosis (SENASICA, 2020a).

## 2.10 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de brucelosis en bovinos, caprinos, ovinos y porcinos, se debe realizar en los laboratorios aprobados por la Secretaría, con muestras de suero sanguíneo, leche, líquidos corporales y muestras de tejidos, mediante pruebas inmunológicas, estudios bacteriológicos u otros que sean autorizados por la Secretaría (NOM-041-ZOO-1995).

Todos casos de aborto u orquitis del ganado bovino, ovino y caprino, así como porcino, deben considerarse sospechosos de brucelosis y deben estudiarse teniendo en cuenta los antecedentes del rebaño/manada y enviando muestras al laboratorio. El cuadro clínico no es patognomónico, de tal forma que el diagnóstico definitivo de infección por *Brucella* solo puede realizarse a partir del aislamiento e identificación de *Brucella*, pero en situaciones en las que no es posible el análisis bacteriológico, el diagnóstico debe basarse en los métodos serológicos (Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad animal, 2018).

Según lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, las pruebas inmunológicas establecidas por la Dirección y efectuadas por el personal oficial o aprobado son: para especies lisas la prueba de tarjeta, rivanol, fijación del complemento y prueba de anillo en leche; para detección de *Brucella ovis*, la prueba de inmunodifusión doble. La prueba de tarjeta y la de anillo en leche, podrán ser realizadas por un Médico Veterinario oficial o aprobado, o bien, por un laboratorio aprobado. Las pruebas de rivanol, fijación del complemento e inmunodifusión doble, deben ser realizadas por un laboratorio aprobado. Los Médicos Veterinarios aprobados que apliquen la prueba de tarjeta en campo y los laboratorios aprobados, deben pasar pruebas de aptitud, tener la infraestructura mínima necesaria que garantice la correcta realización de la prueba y llevar registro tanto de todas las pruebas que realicen, como de los reactivos utilizados.

## Técnicas de diagnóstico

**Tabla 4.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de infección por *Brucella abortus*, *melitensis* o *suis*.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales concretos <sup>a</sup>	Contribuir a las políticas de erradicación <sup>b</sup>	Confirmar casos clínicos sospechosos <sup>c</sup>	Determinar la prevalencia de la infección-vigilancia en el rebaño/manada	Determinar el estado inmunitario en animales concretos o en poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente</b>						
Métodos de tinción	-	-	-	+	-	n/a
Cultivo	-	-	-	+++	-	n/a
PCR <sup>d</sup>	-	-	-	+ / +++	-	n/a
<b>Detección de la respuesta inmunitaria</b>						
BBAT (RBT O BPAT)	+++	++	+++	+	+++	n/a
FPA	++	++	+	++	++	n/a
CFT	++	++	+++	++	+++	n/a
I-ELISA	+++	++	+++	++	+++	n/a
C-ELISA	++	+	+	+	++	n/a
BST	++	-	+	+++	++	n/a
SAT	++	+	+	-	+	n/a
Pruebas basadas en el NH y proteínas del citosol	-	-	+	++	-	n/a
Pruebas en leche de tanque <sup>f</sup> I-ELISA con leche o prueba del anillo de leche	++	-	+++	+	+++	n/a

Clave: **+++** = método recomendado; **++** = método adecuado; **+** = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el costo la fiabilidad u otros factores limitan su aplicación; **-** = no adecuado para esta finalidad; **n/a** = no aplicable. **PCR** = reacción en cadena de la polimerasa; **BBAT** = pruebas con antígeno tamponado de *Brucella* (es decir, **RBT** [rosa de bengala] y BPAT [prueba de la aglutinación en placa tamponada]); **CFT** = fijación del complemento; **I-** o **C-ELISA** = enzimoimmunoanálisis indirecto/de competición; FPA = prueba de polarización de la fluorescencia; **BST** = prueba cutánea de la brucelina; **SAT** = prueba de aglutinación en suero; **NH** = hapteno nativo. <sup>a</sup>Solo aplicable a rebaños/manadas, países o zonas libres de infección por *Brucella*. <sup>b</sup>Para aumentar la eficiencia de las políticas de erradicación en rebaños/manadas, se recomienda combinar pruebas para aumentar la sensibilidad en cuanto al diagnóstico, es decir, al menos dos pruebas serológicas, como BBAT o FPA y CFT o IELISA. La sensibilidad aumenta aún más si se aplica simultáneamente serología y BST. <sup>c</sup>En zonas de prevalencia baja o casi libres, el valor predictivo de los resultados positivos en las pruebas serológicas puede ser muy bajo. En tales situaciones, para confirmar casos clínicos suele ser necesario identificar el agente causal. En rebaños/manadas infectadas, un resultado positivo en cualquier prueba serológica puede considerarse una confirmación de un caso clínico. Todo animal que dé positivo en cualquier prueba serológica debe considerarse infectado, incluso en ausencia de signos clínicos. En zonas de prevalencia baja o casi libres, los resultados positivos aislados pueden confirmarse mediante cultivo (o PCR) o BST. En países o zonas libres, los animales sospechosos son los que dan positivo tanto en una prueba serológica de cribado como en una confirmativa (pruebas en serie) y pueden confirmarse mediante cultivo (o PCR) y/o BST. <sup>d</sup>Es posible que se obtengan falsos positivos. <sup>e</sup>En las zonas en las que se practica la vacunación subcutánea con S19 o Rev.1, esta prueba puede ayudar a diferenciar entre los anticuerpos generados a partir de la vacunación y los generados a partir de la infección. <sup>f</sup>Solo ganado lechero.

Fuente tomada de Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas para Animales Terrestres (Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad animal, 2018).

## 2.11 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

**Animales:** Se deben tomar en cuenta otras enfermedades que causan abortos o epididimitis y orquitis. En caso de presentar solo aborto como signo clínico se puede sospechar de Campilobacteriosis, Listeriosis, Leptospirosis, Ureaplasmosis, Tricomoniasis, Haemophilosis, Rinotraqueitis infecciosa Bovina (IBR) o Diarrea viral Bovina (DVB) y Neosporosis (Domínguez, 2012).

**Humanos:** Para realizar el diagnóstico diferencial se requiere de personal de salud y laboratorios autorizados, por el cuadro clínico inespecífico o poco específico con las siguientes entidades nosológicas: Tuberculosis, Paludismo, Hepatitis, Leptospirosis, Clamidiosis, Mononucleosis infecciosa, Linfoma de Hodgkin, Espondiloartropatías (González *et al.*, 1988).

## 2.12 TRATAMIENTO

*Brucella sp.* tiene la capacidad de evadir los mecanismos de defensa del sistema inmunitario del hospedero, es una bacteria intracelular facultativa, generando protección a la presencia de antibióticos, así mismo en la NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales no se menciona en ningún apartado la posibilidad de tratamiento para animales.

En humanos la administración de antibióticos eficaces durante un periodo de tiempo adecuado es el elemento esencial en el tratamiento de todas las formas de brucelosis humana. Este debe estar dentro del contexto de la supervisión médica general y, para pacientes gravemente enfermos, se realiza mejor en el hospital si las circunstancias lo permiten. El tratamiento antibiótico debe ser administrado en la etapa más temprana posible, incluso en pacientes que parecen estar mostrando una mejora espontánea. En aquellos pacientes con complicaciones, será necesario un tratamiento adicional, incluso en algunos casos intervención quirúrgica (Corbel, 2006).

**Tabla 5.** Esquemas de tratamiento sugeridos por la Organización Mundial de la Salud y aceptados por la Norma Oficial Mexicana.

**ESQUEMA A:** De primera elección en adultos con función renal normal, Mujeres no embarazadas, ni en lactancia, Tetraciclina tabletas o comprimidos 500 mg cada 6 horas por 21 días, Estreptomina solución inyectable de 1 g cada 24 horas por 21 días.

Como alternativa Gentamicina 5 mg/kg/día por 2 semanas.

**ESQUEMA B:** Indicado en niños menores de 8 años, mujeres embarazadas (después del primer trimestre), y ancianos. Adultos: Rifampicina 300 mg cada 8 horas + Trimetoprim con Sulfametoxazol 160/800 mg cada 12 horas por 21 días.

Niños: Rifampicina 20 mg/kg/día dividido en tres dosis + Trimetoprim con Sulfametoxazol 8/40 mg/ kg/día dividido en dos dosis, por 21 días.

**ESQUEMA C:** En los casos en los que exista fracaso con la ministración de los esquemas A y B, o en los que la enfermedad presenta curso prolongado. Adultos: Doxiciclina 200 mg, cada 24 horas por seis semanas + Rifampicina 600-900 mg, cada 24 horas por seis semanas.

Niños: Doxiciclina 4-5 mg/kg/día, por seis semanas dividido en tres dosis + Rifampicina 20 mg/kg/día, dividido en tres dosis por seis semanas.

Fuente tomada y modificada de: Vega *et al.*, 2008; NOM-022-SSA2-2012.



## 2.13 PREVENCIÓN Y CONTROL

La vigilancia con fines de detección puede pasar por la realización sistemática de pruebas serológicas y de análisis de la leche, con técnicas como la prueba del anillo en leche. Estas medidas de vigilancia pueden resultar de gran ayuda en las campañas para eliminar la enfermedad. También se practican análisis de animales concretos con fines de comercio o de lucha contra la enfermedad. Cuando se está cerca de lograr la eliminación de la enfermedad es preciso aplicar un programa de pruebas diagnósticas y sacrificios sanitarios para erradicarla por completo.

En las zonas donde la brucelosis es endémica, suele utilizarse la vacunación para reducir la incidencia de la infección. Existen varias vacunas con virus vivos modificados (OIE, 2020).

**Sacrificio:** Todos los animales que resultaron positivos deben ser sacrificados y compensados por el Gobierno. La política de compensación actual establece que los animales que resulten positivos en las pruebas serológicas deben enviarse a un matadero. Se deben realizar pruebas de laboratorio adicionales dentro de los 15 días de un resultado positivo de la prueba serológica. La matanza de esos animales sólo puede realizarse en un matadero aprobado por el estado en presencia del propietario del animal, el veterinario autorizado encargado de esa unidad administrativa y el inspector veterinario del estado (NOM-041-ZOO-1995).

Según lo establecido por la NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, los animales reactores, bajo el programa de hatos libres y los del programa de control-erradicación que no vayan a ser enviados a unidades de producción controlada, deben ser sacrificados en un rastro autorizado por la Secretaría, en un periodo entre 3 y 10 días posteriores a la notificación del resultado. No procederá ningún decomiso de canales o vísceras por causa de brucelosis, excepto cuando así lo indique la Secretaría.

El incumplimiento a lo establecido en el punto anterior dará lugar a la cuarentena de la unidad de producción pecuaria, la cual no podrá levantarse hasta que se sacrifique a los reactores y que en un siguiente muestreo del 100% de los animales

sujetos a prueba, se obtengan resultados negativos en un periodo no menor de 30 días a partir del muestreo en que se diagnosticaron los animales reactivos.

En hatos libres en zonas en control o hatos del subprograma control-erradicación, se podrá evitar el sacrificio de los animales, siempre y cuando éstos sean destinados a unidades de producción controlada. El sacrificio debe realizarse bajo condiciones de trato humanitario a los animales y debe levantarse un acta con carácter oficial, señalando claramente que fueron sacrificados aquellos animales que se indiquen en el certificado zoosanitario.

Los rastros deben participar con el programa de monitoreo que se establezca a través de la Secretaría.

La decisión sobre el sacrificio de los animales de prueba positiva se toma después de considerar los factores reguladores, económicos y de prevalencia. Cuando la prevalencia de una población animal es muy baja (por ejemplo, 2%), existe una mayor posibilidad de éxito en reducir la incidencia, cuando son sacrificados animales con pruebas positivas. Se puede considerar como último recurso la retención de animales positivos es menos peligrosa si los animales restantes han sido vacunados. El aislamiento de los animales de resultado positivo es esencial, especialmente durante y después del parto, interrumpiendo así el ciclo biológico (Corbel, 2006).

## 2.14 VACUNACIÓN

A pesar de que las vacunas atenuadas no brindan protección completa contra la brucelosis, el principal método de prevención y control más razonable para la brucelosis es la vacunación. Algunas cepas de vacunas vivas atenuadas pueden usarse para controlar y eliminar infecciones de animales para reducir la incidencia de brucelosis humana. Pero se utilizan diferentes cepas de vacunas en diferentes animales, como *Brucella abortus* S19 y RB51 para el ganado vacuno (Wang *et al.*, 2019).

La Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales estipula que todas las vacunas utilizadas en la campaña serán constatadas y autorizadas por la Secretaría debiendo probarse cada lote producido conforme a las disposiciones de la misma. En la campaña se deben utilizar vacunas vivas, atenuadas y liofilizadas, para prevenir la brucelosis en bovinos, caprinos y ovinos. Todas las vacunas deben aplicarse por vía subcutánea.

La vacunación para bovinos se ajustará a lo siguiente: a) Las vacunas utilizadas para la inmunización deben estar elaboradas con la cepa 19 de *Brucella abortus* u otra que autorice la Secretaría. b) La campaña utiliza 2 tipos de vacuna cepa una considerada como vacuna en dosis clásica para prevenir la enfermedad en becerras de 3 a 6 meses de edad, y otra para hembras mayores de 6 meses, incluso gestantes, denominada vacuna de dosis reducida. Esta última puede aplicarse en hembras a partir de los 18 meses en el caso de que hayan sido vacunadas con la dosis clásica a la edad de 3 a 6 meses. También puede aplicarse en hembras mayores de 6 meses que no recibieron la vacuna con dosis clásica. c) Ninguna vacuna debe utilizarse para prevenir la brucelosis en bovinos machos. d) No debe aplicarse la vacuna cepa 19 a bovinos castrados, sean machos o hembras. e) La vacuna clásica para becerras de 3 a 6 meses de edad debe contener por lo menos  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Brucella* por cada mililitro de vacuna reconstituida. f) Las becerras de 3 a 6 meses de edad, deben ser vacunadas con 5 ml de vacuna cepa 19 en dosis clásica, lo cual representa un mínimo de  $5 \times 10^{10}$  UFC de *Brucella*. g) La vacuna cepa 19 en dosis clásica no debe utilizarse en hembras mayores de 6 meses, ni menores de 3 meses de edad. h) La vacuna cepa 19 en dosis reducida, debe contener un título de  $3 \times 10^8$  a  $3 \times 10^9$  UFC de *Brucella* por cada dosis, equivalente a 2 ml. i) La vacuna cepa 19 en dosis reducida se debe aplicar a hembras mayores de 6 meses de edad, aun gestantes. j) Bajo ninguna circunstancia se permitirá diluir la vacuna en presentación de dosis clásica, para obtener dosis reducidas.

## 2.15 FACTORES DE RIESGO

Esta referida un conjunto de factores de riesgo relacionado a la presencia de brucelosis en los hatos, que se implican de tal modo que propicia la entrada y persistencia de la enfermedad en una población. (Martinez *et al.*, 2018).

Entre ellos se encuentra la procedencia de animales de reemplazo ya que se desconoce la situación epidemiológica de cada zona de su lugar de origen, el encharcamiento de agua en el establo, es mayor la prevalencia en hatos que compran sus reemplazos por lo anterior mencionado en comparación a los que criaron sus propios reemplazos (Ojeda *et al.*, 2016) (Saeed *et al.*, 2019), el número de animales que integran el hato es importante debido a que hay un incremento en el riesgo de contagio en relación directa entre los animales que integran un mismo grupo, la interacción con animales salvajes o incluso domésticas, debido a que algunas especies actúan como reservorio.(Martinez *et al.*, 2018), otro factor que se debe considerar es la edad, ya que son más susceptibles animales mayores , puesto que los animales jóvenes aun poseen inmunidad pasiva adquirida debido a los anticuerpos maternos y que son sexualmente inmaduros; abortos o antecedentes de abortos y algún problema reproductivo, también animales que se encuentran en lactancia (Ullah *et al.*, 2020). El ordeñar a vacas positivas ya sea cerca o incluso antes de animales sanos lo que propicia el contagio (Moreno *et al.*, 2002), el historial de vacunación pese a que se ha informado que el 10% de éstos logra diseminar de igual modo el agente causal, al no desechar a las hijas de madres positivas aumenta la probabilidad de que persistan en el hato hembras que se han contaminado en la gestación o al instante de atravesar el canal de parto pese que la mayor parte de las hembras nacidas exime cierto porcentaje de la enfermedad y ellas continúan contaminadas hasta la adultez, instante en que el agente será reactivado en la primer gestación (Martinez *et al.*, 2018), la utilización de los mismos pastos entre productores (Awah-Ndukum *et al.*, 2018).

Los factores de riesgo que se atribuyen a la brucelosis humana se relacionan con la ocupación, por ejemplo, quienes están más expuestos de adquirir la enfermedad son los propietarios de las unidades de producción como sus trabajadores,

veterinarios, cazadores y trabajadores de mataderos y de laboratorio (Rodrigues *et al.*, 2020). La no utilización del equipo de protección personal durante el trabajo, el área asignada en el que trabajan, la falta de información acerca de brucelosis, el contacto directo con vísceras, úteros y fetos, consumo de alimentos peligrosos como leche y subproductos sin pasteurizar, carne poco cocida, no tener buenos hábitos higiénicos, el no emplear otros instrumentos de bioseguridad como por ejemplo guantes, botas, overol, mandil, protector en alguna herida abierta son factores que influyen en el riesgo de contraer la enfermedad (Awah-Ndukum *et al.*, 2018) (Zambrano *et al.*, 2018).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las actividades agropecuarias han sido de las más importantes para el desarrollo de los países. El ganado bovino se considera de gran aprovechamiento obteniendo numerosos productos que hoy en día se encuentran entre los alimentos básicos de la cadena alimenticia y otras necesidades básicas y secundarias; hablando específicamente de la carne, leche, vestimenta, calzado. En México, la producción de leche de bovino es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico, incluyendo la gran variedad de climas regionales y características de tradiciones y costumbres de las poblaciones. La industria de productos lácteos es la tercera actividad más importante dentro de la rama de la industria de alimentos en México. Un gran número de países en el mundo considera la producción y abasto de leche como una prioridad nacional. La producción lechera ofrece a los pequeños agricultores mayores utilidades que la de cultivos y genera más oportunidades de empleo que otras cadenas de valor del sector alimentario. Según el inventario de población ganadera del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2019, en el Estado de México existían 105,072 cabezas de ganado lechero, posicionándolo entre los diez estados con mayor población.

La región I del Estado de México, está conformada por trece municipios Amecameca, Atlautla, Ayapango, Chalco, Cocotitlán, Ecatingo, Juchitepec, Ozumba, Temamatla, Tenango del Aire, Tepetlixpa, Tlalmanalco y Valled de Chalco Solidaridad de los cuales al menos cuatro por su urbanización, servicios públicos entre otras oportunidades de crecimiento han perdido sus actividades Agropecuarias. Sin embargo, en el resto de los municipios que se encuentran aún en desarrollo, la crianza de animales una de las ocupaciones principales en los habitantes.

La eficiencia reproductiva constituye un conjunto de medidas expresadas en parámetros reproductivos de beneficio rentable, mientras que la ineficiencia reproductiva comprende unos de los problemas más costosos que enfrenta la

ganadería lechera, la infertilidad en el ganado bovino se da principalmente por problemas de manejo de la reproducción (Flores *et al.*, 1998). En las grandes unidades de producción pecuaria se considera aceptable un porcentaje bajo de abortos intermitentes; estos abortos se consideran abortos esporádicos. En las unidades de producción de bovinos de carne y lecheras se aceptan niveles de aborto del 2 al 3%. Todo valor que exceda estos niveles se considera patológico. Sin embargo, rara vez se investiga la causa, cuando se investigan abortos bovinos hay que determinar ciertos elementos comunes entre los episodios de aborto, como el estadio de la gestación, la afección de terneras o de vacas la fecha de llegada de nuevos animales, protocolos de vacunación y las prácticas reproductivas (uso de monta directa).

El aborto puede clasificarse por su origen, en infeccioso y no infeccioso, dentro de los infecciosos los microorganismos pueden ocasionar abortos por distintos mecanismos, la fiebre que originan muchas infecciones sistémicas, puede por sí sola causar aborto, aunque el feto no este infectado. La Brucelosis es una zoonosis reemergente mundial que afecta el ganado y la vida silvestre con pérdida económica, ya que los animales infectados sufren aborto espontáneo e infertilidad. Su principal ruta de transmisión es mediante la ingestión o inhalación de materiales infectados, los abortos como problema reproductivo representa una de las principales causas de pérdidas económicas en los hatos lecheros.

Partiendo del contexto podemos cuestionarnos ¿Qué tanto puede afectar un aborto a un pequeño productor?, ¿Cómo puede la investigación ayudar al crecimiento de la producción láctea local?, ¿Cómo podemos disminuir la transmisión de enfermedades abortivas? El principal objetivo de este trabajo es aportar cifras de animales infectados por esta bacteria en los municipios participantes además de asociar la infección con la aparición de signos clínicos y factores de riesgo, el seguimiento de un animal y la evaluación del comportamiento de las enfermedades. El impacto social que genera el estudio impacta principalmente a los pequeños productores que tienen como actividad principal la producción láctea, y con ella la seguridad agroalimentaria de los consumidores, considerando que el principal destino de la leche es la venta y elaboración de subproductos. Teniendo

antecedentes de estudios realizados en los municipios de Amecameca, Ayapango y Tlalmanalco en 2008, donde se determinó la prevalencia de la enfermedad y los resultados no arrojaron animales positivos, podemos esperar que, en este periodo de tiempo, se siguieran conservando las medidas de prevención y control de *Brucella abortus*.

Martínez Borrego en su estudio de lechería en el Estado de México (2009) menciona que las empresas con menores recursos científico-técnicos y económicos, se orientan a la fabricación de productos de consumo masivo y de bajo valor agregado como leche pasteurizada, ultra pasteurizada y quesos artesanales, mientras que las empresas transnacionales y las nacionales de mayor desarrollo y competencia distribuyen, además, productos más elaborados y de mayor valor agregado como quesos, yogurt.



#### IV. JUSTIFICACIÓN

La región I del Estado de México tiene una significativa producción lechera, representada en su mayoría por un sistema de producción a pequeña escala, en la cual predominan el trabajo familiar y la falta de recursos y tecnología. A pesar de estas limitaciones es una de las principales actividades económicas. El aborto es la causa que mayor pérdida económica representa en los hatos, los animales contagiados de *Brucella abortus* pueden propagar su transmisión, continuando el ciclo de infección. La investigación respecto a prevalencia de brucelosis bovina es de gran importancia económica y social, especialmente en zonas donde el destino de la leche es la transformación a productos para el consumo humano. La toma de acciones sobre aquellos hatos que resultaran con animales positivos, el reconocimiento de los factores de riesgo ante esta enfermedad y las buenas prácticas para mejorar la eficiencia reproductiva, deberían ser el propósito de los estudios en estas unidades de producción pecuaria.

## V. HIPOTESIS

La prevalencia de *Brucella abortus* en bovinos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango Estado de México es menor a 0.5% y está asociado a factores de riesgo potenciales presentes en las unidades de producción.

## **VI. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Evaluar la prevalencia y los factores de riesgo de *Brucella abortus* en hatos lecheros en los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.

### **ESPECÍFICOS**

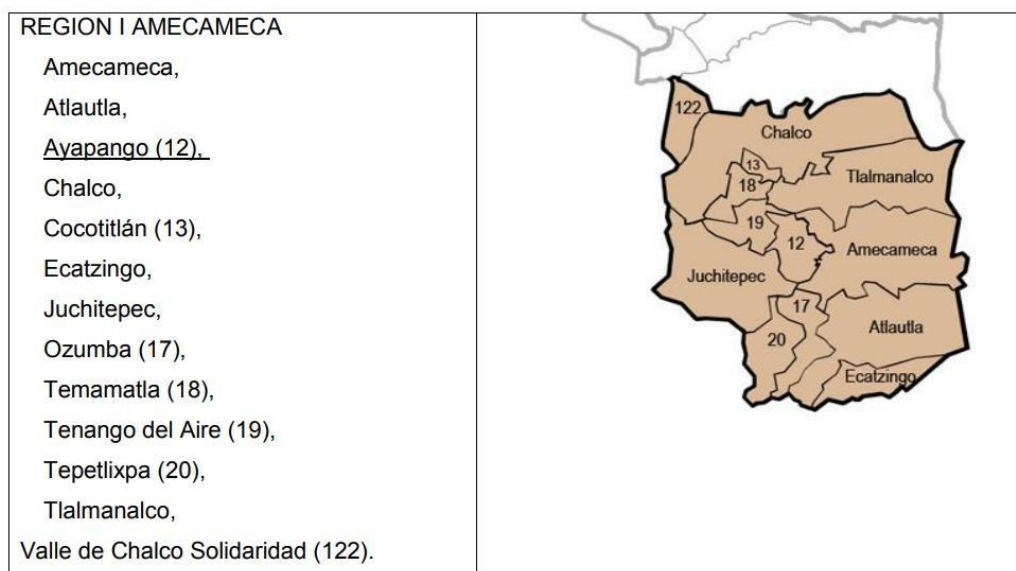
1. Determinar la prevalencia de *Brucella abortus* en muestras de suero de bovinos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango a través de la prueba de tarjeta, rivanol e inmunodifusión radial.
2. Establecer los factores de riesgo frente a *Brucella* en las unidades de producción bovina lechera de los municipios de Amecameca y Ayapango.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### Zona de Estudio

La Región I Amecameca se localiza al oriente del Estado de México y la conforman los municipios de Amecameca, Atlautla, Ayapango, Cocotitlán, Chalco, Ecatzingo, Juchitepec, Ozumba, Temamatla, Tenango del Aire, Tepetlixpa, Tlalmanalco y Valle de Chalco Solidaridad (Figura 5).

El municipio de Amecameca se localiza en las coordenadas geográficas 98°45'46" O de longitud y 19°07'40" N de latitud. Según datos del último censo del INEGI (2020), en Amecameca habitan 53,441 personas, siendo 28,001 mujeres y 25,440 hombres. Ayapango de Gabriel Ramos Millán se localiza en las coordenadas geográficas 98°48'10" O de longitud y 19°07'35" N de latitud. Según datos del último censo del INEGI (2020), en Ayapango habitan 10,053 personas, siendo 5,243 mujeres y 4,810 hombres. (INEGI, 2020).



**Figura 5.** Integración de los municipios de la región 1 Amecameca.

Fuente tomada de Programa trianual de asistencia social del sistema municipal del DIF en Ayapango 2013-2015.

Se realizó un estudio de tipo observacional, descriptivo y transversal.

Se recabó la toma de muestras en las unidades de producción pecuaria mediante un estudio dirigido y por invitación a los propietarios de las UPP de los municipios de Amecameca (Zentlalpan) y Ayapango (Poxtla). Previo a la invitación se realizó la aplicación de una encuesta estructurada con el objetivo de conocer las características sanitarias de la unidad de producción pecuaria, para evaluar los probables factores de riesgo ante brucelosis bovina (Anexo 1).

### **Animales**

Fueron incluidas las UPP que no tengan antecedentes de vacunación contra brucelosis. Se tomaron en cuenta vacas no gestantes y gestantes, en edad adulta y novillas próximas a la monta, así como machos mayores a 12 meses.

### **Toma de muestras y almacenamiento**

Se recolectaron un total de 259 muestras, cifra que rebasaría la cantidad resultante de la fórmula para cálculo de tamaño de muestra representativo de acuerdo a la cantidad de animales existentes en la región. Se tomaron muestras de la vena coccígea con la desinfección y limpieza previa de la zona y se recolectaron en tubos vacutainer sin anticoagulante, se identificaron y rotularon con sus datos correspondientes. Para su transporte, se conservaron a 4° C, inmediatamente después de haber obtenido la muestra de sangre, se colocó en un plano inclinado para aumentar la superficie de coagulación, teniendo cuidado de no exponerlas a temperaturas extremas ni movimientos bruscos. Una vez obtenidas las muestras, se llevaron al laboratorio del Centro Universitario UAEM Amecameca para la obtención de sueros. No fueron consideradas para el estudio las muestras hemolizadas. Se identificó la presencia de *B. abortus* mediante las técnicas de tarjeta, rivanol e inmunodifusión radial.

### **Preparación de sueros.**

En las instalaciones del Centro Universitario UAEM Amecameca se llevó a cabo la obtención de los sueros; para ello, las muestras sanguíneas colectadas fueron centrifugadas a 1318g/5 minutos, posteriormente fueron depositados en tubos de eppendorf previamente rotulados y se conservaron a -20° C para su análisis.

### **Pruebas de Diagnóstico.**

Las pruebas de tarjeta y rivanol son consideradas como pruebas oficiales para el diagnóstico de la brucelosis bovina en México (NOM-041-ZOO-1995).

### **Prueba de tarjeta.**

Con muestras de suero sanguíneo no hemolizado. Con antígeno autorizado por la Secretaría, que reúna las siguientes características: a) Elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*. b) Teñido con rosa de bengala en ácido láctico. c) pH de 3.65 ( $\pm 0.05$ ). d) Concentración celular del 8% para bovinos. Los resultados de la prueba de tarjeta arrojarán sólo dos clasificaciones: positivos y negativos, dependiendo de la presencia o ausencia de aglutinación, según sea el caso (NOM-041-ZOO-1995).

Es un procedimiento cualitativo, rápido, de aglutinación macroscópica que se efectúa en una sola dilución y que detecta principalmente anticuerpos IgG1 y en menor grado IgM. Sirve como prueba tamiz por su alta sensibilidad y permite reducir el número de pruebas diagnósticas necesarias para controlar y/o erradicar la brucelosis en un rebaño o hato. Se fundamenta en que las IgG1 específicas contra *Brucella* todavía actúan a un pH de 3.8, lo que determina la especificidad de la prueba.

### **Equipo e instrumentos**

1.- Aglutinoscopio con fondo negro mate e iluminación indirecta interna. 2.- Cronómetro. 3.- Micropipeta de volumen constante o variable que mida 30 microlitros, con sus respectivas puntillas.

### **Materiales**

1.- Gotero calibrado a un volumen de gota de 0.03 ml (30 microlitros). 2.- Palillos de madera. 3.- Pipetas de Bang o pipetas de 0.2 ml (en caso de no contar con micropipeta). 4.- Placa de acrílico blanco de las mismas dimensiones del aglutinoscopio. 5.- Placa de vidrio o acrílico transparente, preferentemente del tamaño del aglutinoscopio, con cuadrícula de 3 x 3 cm. 6.- Puntas para micropipeta.

#### Reactivos Biológicos.

1.- Antígeno oficial el cual deberá reunir las siguientes características: a) Elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*. b) Teñido con rosa de bengala amortiguado con ácido láctico. c) pH de 3.65 (+/- 0.05). d) Concentración celular del 8% para bovinos.

2.- Suero testigo positivo (Sueros cedidos por el CENID Microbiología, INIFAP, Palo Alto. Ciudad de México).

3.- Suero testigo negativo (Sueros cedidos por el CENID Microbiología, INIFAP, Palo Alto. Ciudad de México).

4.- Muestras de suero de animales sospechosos. Los sueros deberán ser frescos o haber sido mantenidos en refrigeración a 4°C, no deben presentar hemólisis ni estar contaminados.

#### Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 22-25 °C.

#### Procedimiento

1.- Se colocó una gota de 30 microlitros (ul) de cada muestra de suero en un cuadro sucesivo de la placa, siguiendo un orden de izquierda a derecha y de arriba abajo.

2.- Colocar una gota de 30 ul de antígeno a un lado de cada gota de suero; esto es recomendable para evitar que empiece la reacción antígeno-anticuerpo antes de realizar la mezcla. 3.- Se mezcló el suero y el antígeno por rotación con un palillo por suero, a fin de obtener una mezcla homogénea. 4.- Durante 4 minutos se mezcló por rotación manual suave de la placa, evitando que las muestras de los cuadros

adyacentes se pongan en contacto entre sí. 5.- Se realizó la lectura sobre el aglutinoscopio.

### Interpretación de resultados

La prueba se consideró negativa cuando no se observa aglutinación. Se consideró positiva, cuando se observó algún grado de aglutinación, la cual se observa con formación de grumos color rosa. En esta prueba no existen los sospechosos. Si la prueba es positiva, debe realizarse una prueba complementaria, como la de rivanol o de fijación de complemento.

### Rivanol

La prueba de rivanol se debe realizar sólo en suero de bovino: Con sueros no hemolizados, positivos a la prueba de tarjeta. Con antígeno autorizado por la Secretaría y con reactivo de rivanol (lactato de 2 etoxi 6,9 diamino acridina). El antígeno debe ser elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus* y debe reunir las siguientes características: a) Teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta. b) pH 5.8 a 6.2. c) Concentración celular 8% Los resultados se clasificaron en sueros positivos y negativos. Se consideran positivos, todos aquellos sueros de animales no vacunados que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de las diluciones, desde 1/25 a 1/400. En el caso de ganado vacunado, la aglutinación completa en una dilución mayor o igual a 1/50 será una prueba positiva (NOM-041-ZOO-1995).

Es una prueba serológica complementaria cuantitativa, altamente específica, ya que se basa en la precipitación selectiva de las IgM en el suero por el reactivo de rivanol. Este precipitado se retira por centrifugación y con el sobrenadante se realiza una aglutinación en placa.

### Equipo e instrumentos

1.- Aglutinoscopio con fondo negro mate e iluminación indirecta interna. 2.- Centrífuga clínica, como mínimos de 2,000 rpm. 3.- Cronómetro. 4.- Micropipeta de volumen variable entre 5 a 80 microlitros.



## Materiales

1.- Gotero calibrado a un volumen de gota de 0.03 ml (30 ul). 2.- Gradilla. 3.- Palillos de madera. 4.- Pipetas de 1 ml con graduación de 1/10 en 1/100. 5.- Pipetas de Bang o pipetas de 0.2 ml. de 1/10 en 1/100. 6.- Placas de vidrio o acrílico transparente, preferentemente del tamaño del aglutinoscopio, con cuadrícula de 3 x3 cm. 7.- Puntas para micropipetas. 8.- Tubos de vidrio de 12 por 75 mm o 13 x 100 mm.

## Reactivos Biológicos

Antígeno oficial el cual deberá reunir las siguientes características: a) Elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*. b) Teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta. c) pH de 5.8 a 6.2. d) Concentración celular de 4%.

## Reactivos y soluciones

Solución de rivanol al 1%, peso sobre volumen (P/V)

El reactivo de rivanol (lactato de 2-etoxi-6,9-diamino acridina) es un derivado del naranja de acridina (colorante), que una vez preparado, debe guardarse en un recipiente estéril y conservarse en refrigeración a 4°C protegido contra la luz, ya sea en frasco color ámbar o cubierto con papel aluminio.

## Condiciones ambientales

De laboratorio con temperatura óptima de 22-25°C.

## Procedimiento

1.- Con las pipetas se depositó 0.4 ml de solución de rivanol en un tubo por cada muestra. 2.- Utilizando una pipeta o punta por cada suero problema, se agregó a cada tubo 0.4 ml de suero. 3.- Se mezcló de inmediato por agitación del tubo, evitando que el contenido entre en contacto con la piel. 4.- Se dejó reposar los tubos a temperatura ambiente por espacio de 20 a 30 minutos. 5.- Posteriormente se centrifugo aproximadamente a 1318g por 5 minutos para obtener un paquete a partir

del precipitado. 6.- Con la micropipeta o con una pipeta de 0.2 ml, se midió del sobrenadante 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml (equivalentes a 80, 40, 20, 10 y 5  $\mu$ l, respectivamente), se colocó cada una de dichas cantidades en un cuadro de la placa de vidrio, procurando llevar un orden de izquierda a derecha y de arriba a abajo, dejando un cuadro sin utilizar entre las cinco gotas de una muestra y de las de otra. 7.- Con el gotero o micropipeta, se agregó 0.03 ml (30  $\mu$ l) del antígeno a cada una las gotas sobre la placa. 8.- Se mezcló con palillos, extendiendo cada muestra 2 cm de diámetro aproximadamente. 9.- En seguida se mezcló por rotación inclinando la placa suavemente hacia un lado y a otro, 4 veces. Se dejó reposar 6 minutos. 10.- Nuevamente se movió la placa por rotación suave 4 veces y se dejó reposar otros 6 minutos. 11.- Al término del tiempo, se agito la placa por rotación 4 veces más y se procedió a realizar la lectura sobre el aglutinoscopio.

Las diluciones corresponden con los títulos como sigue:

Volumen de la gota Dilución: 0.080 1:25, 0.040 1:50, 0.020 1:100, 0.010 1:200 y 0.005 1:400.

#### Interpretación de resultados

La prueba se considera positiva cuando hay aglutinación de cualquier grado. La prueba se considera negativa cuando no existe aglutinación.

En animales no vacunados se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:25 y en animales vacunados se considera positiva una aglutinación igual o mayor a 1:50. (NOM-056-ZOO-1995).

#### **Prueba de inmunodifusión radial**

Los sueros que resultaron positivos a la prueba de rivanol fueron enviados al INIFAP CENID MICROBIOLOGÍA donde se realizó la prueba de inmunodifusión radial cuyo objetivo es determinar la presencia de anticuerpos contra antígenos del grupo de *Brucella abortus* en bovinos vacunados o que han sufrido esta enfermedad.

La prueba de inmunodifusión radial (IDR) es realizada para el diagnóstico confirmatorio y diferencial de vacas infectadas con *B. abortus* o vacunadas con la cepa S19, presenta 96% de sensibilidad y entre 80 a 100% de especificidad. Usando el hapteno nativo es un antígeno de tipo intracelular, por lo que solamente una exposición prolongada de la bacteria *Brucella* al sistema inmune, como es el caso de una infección de campo, produce anticuerpos contra este antígeno, y no cuando se trate de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de la vacunación con cepa S19 (González *et al.*, 2006).

**Cuadro 1.** Fundamento, sensibilidad y especificidad de las pruebas: Tarjeta, Rivanol e Inmunodifusión radial.

PRUEBA	FUNDAMENTO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
<b>PARA ESPECIES LISAS</b>			
<b>TARJETA</b>	Detecta las inmunoglobulinas IgG1.	96.2 %	95.8 % (Freitas y Craviotto, 2019)
<b>RIVANOL</b>	Detecta las inmunoglobulinas IgG e IgM.	83%	93 % (Freitas y Craviotto, 2019)
<b>INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR)</b>	Únicamente cuando hay una exposición prolongada de <i>Brucella</i> al sistema inmune, como es el caso de una infección de campo, se producen anticuerpos contra este antígeno, y no cuando se trate de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de la vacunación.	96%	80-100% (González <i>et al.</i> , 2006)

(Freitas *et al.*, 2019) (González *et al.*, 2006).

### **Obtención de datos.**

Para llevar a cabo el análisis estadístico, se aplicó un cuestionario estructurado (Anexo 1) dirigido a los productores y encargados de las unidades de producción pecuaria; mediante este instrumento, se recolectó información acerca del manejo reproductivo, el ritmo de producción láctea y las condiciones sanitarias de la unidad de producción pecuaria. La definición de las variables y su recategorización para el estudio se presentan en el Cuadro 2.

### **Análisis estadístico**

La información recabada se capturó en una hoja de Excel para su análisis estadístico (Anexo 2). Mediante estadística descriptiva se analizaron las variables de las unidades de producción pecuaria muestreadas, para lo cual se emplearon tabulados de frecuencias muestrales y de positividad de *B. abortus* por prueba de diagnósticos empleadas. A través de los resultados obtenidos de la prueba de Rivanol e Inmunodifusión radial se obtuvo la frecuencia y prevalencia en los hatos muestreados (Prevalencia = casos positivos / total de animales muestreados). Se calculó la prevalencia, el riesgo relativo, la razón de probabilidades (*Odds ratio*), la diferencia de riesgo y riesgo atribuible a la población, para determinar los factores de riesgo asociados entre la afectación por brucelosis, el manejo reproductivo y los intervalos gestación/lactancia en los animales muestreados.

**Cuadro 2.** Descripción de variables colectadas para el análisis estadístico y su reclasificación de las unidades de producción pecuaria lechera de Amecameca y Ayapango, Estado de México.

Variable	Definición de la variable	Tipo de variable	Reclasificación
<b>Estado de gestación</b>	Es el período de desarrollo del ternero en crecimiento dentro del vientre de la vaca, la duración promedio es de 285 días (Rossner y Vispo, 2018).	Dicotómica	Gestante No gestante
<b>Edad</b>	Es un dato esencial en la producción animal, dada su relación con las funciones fisiológicas, su cuantía e intensidad varía con ella; determinadas enfermedades tienen edades propensas para su aparición y desarrollo (Cañete y Fernández, 2017).	Cuantitativa discreta	Mayor a 3 años Menor a 3años
<b>Aborto</b>	Es definido como la pérdida del producto de la concepción a partir del periodo fetal (aprox. 42 días) hasta antes de los 260 días en caso del bovino (Rivera, 2001).	Cuantitativa discreta	Con abortos Sin abortos
<b>Problemas reproductivos</b>	Los problemas reproductivos, caracterizados por infertilidad, muerte embrionaria, abortos, malformaciones congénitas y nacimiento de crías débiles son prevalentes en el ganado bovino (Rivera <i>et al.</i> , 2004).	Nominal	Con problemas reproductivos Sin problemas reproductivos
<b>Gestación/ Lactancia intensiva</b>	Gestación y lactancia anual continúa.	Cuantitativa discreta	Si No
<b>Gestación/Lactancia moderada</b>	Se define así al ritmo de gestación y lactancia que presenta periodos mayores de 6 meses entre gestación/gestación y lactancia/lactancia.	Cuantitativa discreta	Si No

## VIII. RESULTADOS

Se llevó a cabo la toma de muestras en 16 unidades de producción pecuaria lecheras en las localidades de Amecameca y Ayapango, Estado de México, para determinar la seroprevalencia de *Brucella abortus* en un total de 259 bovinos.

A partir de una encuesta estructurada se obtuvo la siguiente información de las 16 unidades de producción pecuaria; para conocimiento de las condiciones sanitarias, manejo y uso de tecnologías. Se trabajó con un total de 254 hembras que representa el 98.06% de la población muestreada y 5 machos (1.93%). El 100% de la población utilizan inseminación artificial y solo 2 (12.5%) de las 16 unidades de producción siguen utilizando monta directa. Otro dato interesante obtenido del cuestionario fue que todas las UPP destinan la leche a la venta, 4 de ellas destinan una cantidad para la elaboración de productos lácteos (25%). Cabe resaltar que 11 de las 16 UPP registran antecedentes de aborto, representando el 68.75%. Con antecedentes de vacunación solo se encontró un hato en el municipio de Ayapango que representa apenas el 6.25% y un 0% de UPP realizan pruebas diagnósticas. En cuanto a la infraestructura e implementación de tecnologías el 100% de las UPP cuenta con instalaciones de sistema de producción a pequeña escala y solo 3 de ellas han implementado el uso de ordeñadora, que representa un 18.75% (Tabla 6).

**Tabla 6.** Datos obtenidos en la encuesta de las condiciones sanitarias, manejo y uso de tecnologías en las unidades de producción pecuaria.

	Amecameca	Ayapango	Total	Porcentaje
Unidades de producción pecuaria	11	5	16	
Animales muestreados	187	72	259	
Hembras	183	71	254	98.06
Machos	4	1	5	1.93
Inseminación artificial	11	5	16	100
Monta directa	2	0	2	12.5
Abortos	8	3	11	68.75
Problema reproductivo (repetidoras, celo silencioso)	10	0	10	62.5
Venta de leche	11	5	16	100
Elaboración de productos lácteos	4	0	4	25
Vacunación contra Brucelosis	0	1	1	6.25
Pruebas realizadas	0	0	0	0
Sistema de producción a pequeña escala	11	5	16	100
Uso de ordeñadora	3	0	3	18.75



Mediante la prueba de tarjeta 13/259 sueros resultaron positivos, lo que representó una prevalencia del 5.01%. A través de la prueba de rivanol 9/259 sueros resultaron positivos, dando una prevalencia del 3.47%. Ante la prueba de Inmunodifusión radial 5/259 sueros presentaron anticuerpos generados tras padecer la enfermedad, con una prevalencia del 1.93% de *Brucella abortus* en los hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México (Tabla 7). Cabe destacar que ningún macho mostró reactividad frente a la prueba de inmunodifusión radial.

**Tabla 7.** Prevalencia de *Brucella abortus* a través de la prueba de tarjeta, rivanol e inmunodifusión radial en unidades de producción de bovinos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.

Prueba	Positivos	Porcentaje	Negativos	Porcentaje
Tarjeta	13	5.01%	246	94.98%
Rivanol	9	3.47%	250	96.52%
Inmunodifusión radial	5	1.93%	254	98.06%

En las unidades de producción pecuaria del municipio de Amecameca se confirmaron 5 casos positivos de *Brucella abortus* mediante la prueba de inmunodifusión radial, que representa el 2.67% de prevalencia en la población muestreada; mientras que en el municipio de Ayapango la prevalencia fue del 0% (Tabla 8).

**Tabla 8.** Prevalencia de *Brucella abortus* en hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.

Municipio	Tarjeta	Rivanol	Inmunodifusión radial
Amecameca	5.34% (10/187)	4.81% (9/187)	2.67% (5/187)
Ayapango	4.16% (3/72)	0%	0%

Referente a la prevalencia de *Brucella abortus* en las unidades de producción pecuaria. La unidad de producción identificada con el número 6, obtuvo 3 muestras positivas a la prueba de inmunodifusión radial de un total de 61 animales muestreados. Las unidades identificadas con los números 3 y 7 mostraron un animal positivo con la prueba de inmunodifusión radial; cabe mencionar que las tres unidades pertenecen al municipio de Amecameca de Juárez, Estado de México.

**Tabla 9.** Prevalencia de *Brucella abortus* en unidades de producción animal en Amecameca y Ayapango, Estado de México.

Unidad de producción animal	Tarjeta	Rivanol	Inmunodifusión radial
<b>Amecameca</b>			
UPP 1	0	0	0
UPP 2	0	0	0
UPP 3	11.11% (1/9)	11.11% (1/9)	11.11% (1/9)
UPP 4	20% (2/10)	20% (2/10)	0
UPP 5	0	0	0
UPP 6	8.19 % (5/61)	6.55% (4/61)	4.91% (3/61)
UPP 7	10% (2/20)	10% (2/20)	5% (1/20)
UPP 8	0	0	0
UPP 9	0	0	0
UPP 10	0	0	0
UPP 11	0	0	0
<b>Ayapango</b>			
UPP 12	0	0	0
UPP 13	0	0	0
UPP 14	0	0	0
UPP 15	10.71% (3/28)	0	0
UPP 16	0	0	0

Se realizó un estudio descriptivo de causalidad tomando en cuenta medidas de la fuerza de asociación, para analizar aquellas variables que estuvieran relacionadas a casos positivos y se consideraron factores de riesgo. El riesgo relativo a través de la prueba de rivanol frente a la brucelosis en animales gestantes fue de 0.3 veces mayor respecto a los animales no gestantes; de 0.6 veces más en animales mayores a 3 años de edad; de 3.7 veces más es el riesgo de infección en animales que muestran problemas de aborto respecto a los que no abortan y el ritmo gestación/lactancia intensiva y gestación/lactancia media 7.9 y 4.0 respectivamente de riesgo relativo de infección. Sin embargo, cuando se realizó el ejercicio con los resultados de inmunodifusión radial se encontraron los siguientes resultados; 0.7 veces mayor el riesgo en animales gestantes a los no gestantes; 2.2 veces mayor en animales mayores de 3 años de aquellos menores; en las variables aborto y problemas reproductivos no se encontraron cifras significativas; mientras que para gestación/lactancia intensiva y gestación/lactancia media fue de 6.6 y 4.6 respectivamente. Las variables que representan un riesgo atribuible a la población fueron; edad específicamente aquellos animales mayores de 3 años con una cifra de 44.3%, con la prueba de IDR y gestación/lactancia intensiva con 62.5%. Frente a la prueba de rivanol, las cifras mayores de riesgo atribuible a la población fueron las siguientes variables; aborto con 16.3% y gestación/lactancia moderada con 58.4%, como se observa en la tabla 10.

**Tabla 10.** Factores de riesgo asociados a la presencia de *Brucella abortu* en hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México.

		Prevalencia (%)	Riesgo Relativo	Odds ratio	Diferencia de riesgo	Riesgo Atribuible a la Población
		R*/IDR				
<b>Gestación</b>	Gestante	1.8/1.7	0.3/0.7	0.281/0.740	-4.4%/-0.6%	-79.9%/-13.7%
	No gestante	6.3/2.2				
<b>Edad</b>	>3 años	6.1/2.4	0.6/2.2	0.543/2.272	-4.6%/1.3%	-50.0%/44.3%
	<3 años	10.7/1.1				
<b>Aborto</b>	Si aborto	11.1/-	3.7/-	4.089/-	8.1%/-	16.3%/-
	No aborto	3.0/-				
<b>Problema Reproductivo</b>	Si presenta	3.2/-	1.0/-	1.048/-	0.1%/-	0.6%/-
	No presenta	3.1/-				
<b>Gestación/Lactancia intensiva</b>	Si presenta	17.4/3.4	7.9/6.6	9.389/4.708	15.2%/2.7%	38.8%/62.5%
	No presenta	2.2/0.7				
<b>Gestación/Lactancia moderada</b>	Si presenta	6.0/8.7	4.0/4.6	4.200/7.143	4.5%/7.4%	58.4%/33.9%
	No presenta	1.5/1.3				

R= Prueba de Rivanol. IDR= Prueba de Inmunodifusión Radial. \* (P>0.05). - (valor no determinado por tener un número de muestra pequeño).

## IX. DISCUSIÓN

La brucelosis en bovinos es un padecimiento bacteriano ocasionada principalmente por *Brucella abortus* (Khurana *et al.*, 2021); enfermedad que afecta a los animales domésticos, animales de fauna silvestre y constituye una de las zoonosis más prevalentes (OIE, 2021).

La situación actual de brucelosis bovina en México, demuestra que los estados de Baja California Sur y Sonora están identificados como libre de brucelosis causada por especies lisas. En fase de erradicación se encuentra el 28.99% del territorio nacional, en los cuales se sitúan los estados de Campeche, Colima, Guerrero, Nayarit, Quintana Roo y Yucatán. También se encuentran en fase de erradicación las regiones "A" de Aguascalientes, Baja California, Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Querétaro (SENASICA, 2021).

En el Estado de México la región "A" de Tierra Caliente, que comprende a Almoloya de Alquisiras, Amatepec, Ixtapan del Oro, Luvianos, Otzoloapan, San Simón, Sultepec, Santo Tomás de los Plátanos, Tejupilco, Temascaltepec, Texcaltitlán, Tlatlaya, Zacazonapan y Zacualpan; la brucelosis bovina se encuentra en erradicación; y la región "A1" que comprende a Coatepec de Harinas, Ixtapan de la Sal, Tonicato y Villa Guerrero, también se encuentra en fase de erradicación (SENASICA, 2021).

Para el caso de los municipios de Amecameca y Ayapango, se encuentran en fase de control. Esto consiste en la elaboración de un padrón estatal de productores, control de movilización, vacunación obligatoria, cuenta con el sistema nacional de vigilancia epidemiológica (SIVE), contar con un programa continuo de promoción de la campaña, incorporación de los hatos a los programas de la campaña, infraestructura de servicio veterinario, técnicos y de diagnóstico, eliminación de reactores mediante su envío a sacrificio y en caso de subprogramas de control, a erradicación a unidades de producción controlada, existencia de unidades de producción controlada, prevalencia de hato mayor al 3% o desconocida (NOM 041-Z00,1995).

La brucelosis en humanos tiene alto impacto sanitario al ser una enfermedad que disminuye la productividad de las personas, los costos del tratamiento son altos y el ausentismo laboral se incrementa. La fuente principal de la brucelosis humana son los productos de origen animal contaminados con el agente infeccioso. El riesgo de infección por *Brucella abortus* en México está asociado al consumo de productos lácteos no pasteurizados, principalmente quesos frescos (Guzmán-Hernández *et al.*, 2016). Un brote de brucelosis en el estado de Guanajuato, considerada como región endémica, permitió aislar *Brucella sp* de muestras de sangre humana, leche cruda de vaca y cabra y quesos frescos. Mediante procedimientos bacteriológicos y PCR múltiple se identificó *Brucella melitensis* en humanos, cabras infectadas y quesos frescos de cabra; mientras que *Brucella abortus* fue aislada de vacas (Morales-García *et al.*, 2015). Según la Secretaría de Salud en el 2017 se reportaron 13,677 casos en México, con una tasa de 2.00 a 2.64 por cada 100,000 habitantes. La evaluación serológica de muestras de un total de 77 pacientes sospechosos de padecer la enfermedad en el estado de Puebla, México; permitió identificar 39 (50,6%) como positivos, 21 (27,3%) como casos sin infección, 9 (11,7%) negativos y 8 (10,4%) definidos con memoria inmunológica. De los casos positivos, 32 (82,1%) se encontraron en el grupo de adultos y 30 (76,9%) fueron del sexo femenino (Arciga-Vázquez *et al.*, 2021). Otro estudio analizó el algoritmo diagnóstico de la brucelosis mediante el uso de las pruebas ELISA, Brucellacapt® y la prueba de flujo lateral (LFT), para la evaluación de muestras de 473 individuos de dos poblaciones endémicas mexicanas. Todos los pacientes fueron atendidos en unidades médicas de primer nivel por presentar sintomatología compatible con brucelosis y sin antecedentes de la enfermedad. Mediante la prueba de Rosa de Bengala, se encontraron 165 muestras negativas y 308 reactivas positivas, de las cuales se confirmaron 222 casos y 234 fueron positivos en al menos un marcador (IgG o IgM) o LFT. Cuando se utilizó Brucellacapt®, se encontraron resultados similares a los observados con el algoritmo convencional a juzgar por el coeficiente kappa de Cohen ( $\kappa$ ) (0.813, 95% IC 0.7788-0.8472). Se encontraron índices  $\kappa$  similares entre el algoritmo convencional y el par ELISA, 0.7038 (IC 95% 0.6555-0.7521), lo que representa una alta similitud entre ambos grupos de diagnóstico. En este trabajo se

demonstró que los serodiagnósticos convencionales, Brucellacapt® y LFT, presentaron resultados no concluyentes y con pobre correlación entre ellos. Por el contrario, la prueba ELISA par (IgG + IgM) presentó alta correlación con el algoritmo convencional y mayor capacidad de correcta clasificación de positivos y negativos (Guzmán-Bracho *et al.*, 2020).

Un estudio realizado en Estados Unidos detecta brotes de brucelosis en su población humana a causa del consumo de quesos elaborados con leche no pasteurizada, y se asociaron con quesos blandos importados de México y Centroamérica (Gould *et al.*, 2014).

El presente trabajo permitió establecer la prevalencia de brucelosis en unidades de producción lechera en los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México. En las unidades de producción pecuaria del municipio de Amecameca se confirmaron 5 casos positivos de *Brucella abortus* que representa un 2.67% de prevalencia en la población muestreada; mientras que en el municipio de Ayapango la prevalencia fue del 0%.

Los resultados de prevalencia detectados en nuestro estudio, no corresponden con lo planteado en la hipótesis, debido a que el porcentaje de prevalencia general de *Brucella abortus* en los hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México, realizando la prueba de tarjeta (prueba de tamiz) y rivanol (pruebas oficiales en la campaña nacional de control y erradicación de la brucelosis en México) y confirmados con la prueba de inmunodifusión radial, es mayor al 0.5%. Estos resultados son relevantes, ya que ponen en evidencia casos positivos de brucelosis bovina en unidades de producción bovina lechera en el municipio de Amecameca de Juárez, Estado de México; área pecuaria muy importante para la producción de leche y derivados lácteos como quesos, crema, mantequilla, requesón, nata, helados, chongos zamoranos y yogures de consumo regional.

Para el presente estudio se realizaron las técnicas de aglutinación en tarjeta, la prueba de rivanol y la prueba de inmunodifusión radial. Las dos primeras técnicas



establecidas como oficiales en la campaña zoonosanitaria de erradicación de la brucelosis en México (NOM 041-Z00,1995). La prueba de inmunodifusión radial, establece la diferenciación entre anticuerpos de animales infectados de anticuerpos de animales vacunados (González *et al.*, 2006). La prevalencia general observada en el estudio con la prueba de aglutinación en tarjeta fue del 5.01% (13/259), la de rivanol del 3.49% (9/259) y la de inmunodifusión radial del 1.93% (5/259).

Las diferencias en los valores obtenidos en este estudio se asocian con la sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas. La prueba de aglutinación en tarjeta es elaborada con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, detecta las inmunoglobulinas IgG1, muestra una sensibilidad y especificidad del 96.2% y del 95.8% respectivamente y se considera una prueba tamiz. Todos los sueros positivos con la prueba de tarjeta, deben ser confirmados con la prueba de rivanol. En la prueba de rivanol el antígeno es elaborado con la cepa 1119-3 de *Brucella abortus*, teñido con verde brillante y cristal violeta, concentración celular 8% y con reactivo de rivanol (lactato de 2 etoxi 6,9 diamino acridina). Los sueros positivos se consideran a todos aquellos sueros de animales no vacunados que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de las diluciones, desde 1/25 a 1/400. En el caso de ganado vacunado, la aglutinación completa en una dilución mayor o igual a 1/50 será una prueba positiva (NOM-041-ZOO-1995). Es una prueba serológica complementaria cuantitativa, altamente específica, ya que se basa en la precipitación selectiva de las IgM en el suero por el reactivo de rivanol. Este precipitado se retira por centrifugación y con el sobrenadante se realiza una aglutinación en placa. Detecta las inmunoglobulinas IgG. La prueba de rivanol tiene una sensibilidad y especificidad del 83% y 93% respectivamente. La prueba de inmunodifusión radial (IDR) es realizada para el diagnóstico confirmatorio y diferencial de vacas infectadas con *Brucella abortus* o vacunadas con la cepa S19; presenta 96% de sensibilidad y entre 80 a 100% de especificidad. Usando el hapteno nativo es un antígeno de tipo intracelular, por lo que solamente una exposición prolongada de la bacteria *Brucella abortus* al sistema inmune, como es el caso de una infección de campo, produce anticuerpos contra este antígeno, y no cuando se trate de una exposición temporal al microorganismo, como es el caso de

la vacunación con cepa S19 (González *et al.*, 2006). Por ello, es importante emplear las técnicas recomendadas en campaña bajo la norma oficial mexicana y su comprobación con la prueba de inmunodifusión radial, para establecer un diagnóstico de brucelosis certero en las unidades de producción bovina.

Otros métodos diagnósticos pueden ser utilizados como la prueba Rosa Bengala (RB) y la prueba de seroaglutinación (SAT)-EDTA. La sensibilidad y especificidad diagnóstica de estas pruebas utilizando un enfoque bayesiano se empleó para el diagnóstico de 22,592 muestras de sangre de bovinos de 2733 hatos de 19 provincias del Ecuador (Paucar *et al.*, 2021). Además, se utilizó el análisis de factores de riesgo para los rebaños según su estado de prueba de brucelosis. La prevalencia real (PT) en los rebaños se estimó mediante pruebas en grupo. La seroprevalencia nacional de granjas fue del 7,9 % (IC 95 %: 6,79-9,03) y la PT fue del 12,2 % (IC 95 %: 7,8-17,9). La prevalencia aparente (PA) en animales fue del 2,2 % (IC 95 %: 1,82-2,67) y la PT fue del 1,6 % (IC 95 %: 1,0-2,4). Asimismo, la sensibilidad de la BR se estimó en un 64,6% (95% CrI: 42,6-85,3) y una especificidad del 98,9% (95% CrI: 98,6-99,0); para la prueba SAT-EDTA la sensibilidad fue del 62,3% (95% CrI: 40,0-84,8) y la especificidad del 98,9% (95% CrI: 98,6-99,1) (Paucar *et al.*, 2021).

Tras la vacunación en bovinos con la cepa S19 y RB51 se induce a una fuerte y compleja respuesta inmune Th1; caracterizada por la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>; la producción de IFN- $\gamma$  y IL-17A por las células T CD4<sup>+</sup>; células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas; la secreción de IL-6; Células T de memoria T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> (referencia). El patrón de inmunoglobulinas predominante tras la vacunación es de la clase IgG1; en humanos, bovinos y ratones el isotipo IgG1 se asocia a la respuesta Th2, mientras que el isotipo IgG2 está más relacionado a la respuesta Th1 (Estes and Brown, 2002). Los hallazgos casi opuestos observados a la respuesta inmune celular y humoral después de la vacunación y revacunación contra la brucelosis deben entenderse teniendo en cuenta que la contribución exacta de la inmunidad humoral en la resistencia a la infección por *Brucella abortus* no está bien establecida, mientras que la respuesta mediada por las células ha

demostrado ser crucial para superar la infección natural y experimental. Además, no se sabe si la polarización Th1/Th2 muy bien conocida en el modelo murino también ocurre de la misma manera en bovinos. La compleja interacción entre el hospedero y *Brucella abortus* generalmente exige un equilibrio entre la respuesta Th1 y Th2. El conocimiento de la respuesta inmune es fundamental para conocer el comportamiento de la enfermedad y el diagnóstico serológico o molecular (Dorneles *et al.*, 2015).

Para el control de la brucelosis bovina en México se elabora y aplica desde 1951 la vacuna S19, y en la campaña oficial de 1997 se dejó de utilizar y fue reemplazada por la vacuna RB51. En 2006 se empezó a producir nuevamente la vacuna S19 y en la actualidad son aplicadas ambas vacunas.

La vacuna S19 (Brucel N-19) se aplica en dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC de *Brucella abortus*/ml de vacuna reconstituida y se aplica a becerras de tres a seis meses de edad en dosis de 2 ml. La vacuna de dosis reducida (Brucel R-19) la cual se aplica a hembras mayores de seis meses de edad que no recibieron la vacunación con la dosis clásica, incluso aunque estén gestantes. La dosis reducida debe contener un título de  $3 \times 10^8$  a  $3 \times 10^9$  UFC de *Brucella abortus* por cada dosis, equivalente a 2 ml. La cepa S19 es muy estable en su virulencia o inmunogenicidad y con su empleo de esta en la vacunación se ha logrado erradicar la brucelosis en varios países. Los riesgos del empleo de esta vacuna son en animales adultos la persistencia de títulos serológicos contra una fracción de LSP dificulta el diagnóstico de la enfermedad, el riesgo de que provoque abortos es de 2 a 3% y en vacas en lactación se ha observado infecciones mamarias persistentes debido a la excreción activa en la leche (ProNaBiVe, 2019).

La cepa RB51 es de morfología rugosa, carece de la cadena "O" del lipopolisacárido. No induce la presencia de anticuerpos que puedan ser detectados durante los muestreos de las campañas oficiales para el diagnóstico de la enfermedad; por tanto, es posible diferenciar los animales vacunados de los infectados. Otra ventaja de esta vacuna es su escasa virulencia residual, aunque las desventajas que muestra son que la revacunación puede causar aborto y

excreción de la bacteria en la leche y el exudado vaginal. La dosis para becerras contiene  $1-3 \times 10^{10}$  UFC, mientras que la dosis reducida para vacas mayores de 12 meses de edad contiene  $1-3 \times 10^9$  UFC (ProNaBiVe, 2019).

En nuestro trabajo, la prevalencia general con la prueba de aglutinación en tarjeta fue del 5.01% (13/259), la de rivanol del 3.49% (9/259) y la de inmunodifusión radial del 1.93% (5/259). Es decir, que es posible que varios de los animales reactores positivos mediante las pruebas de aglutinación en placa y con la prueba de rivanol muestren anticuerpos vacunales, los cuales son diferenciables a través de la prueba de inmunodifusión radial. En nuestra encuesta aplicada a los productores participantes, solo uno refiere a la vacunación como método de control de la enfermedad; sin embargo, se sabe que en la región se emplea a la vacunación en las estrategias de control de la brucelosis. Aunado a lo anterior, los productores no llevan registros de salud y de producción de las Unidades pecuarias y el reemplazo de los animales fundamentalmente son por compra de animales sin registro. Por ello, en futuros trabajos debe aplicarse otras técnicas de diagnóstico para precisar la presencia de cepas vacunales o cepas de campo en la respuesta serológica mediante la técnica de PCR.

Nuestros resultados de prevalencia no guardan relación con los encontrados previamente por Domínguez (2012), en su trabajo de investigación en esta misma región en el que fueron muestreados 184 animales en los municipios de Amecameca, Ayapango y Tlalmanalco; en el cual se descartó la presencia de anticuerpos frente a *Brucella abortus*, mediante la prueba de ELISA con un kit comercial (CHEKIT-Brucellose-Serum de IDEXX Laboratories®). El encontrar cinco animales positivos de tres unidades de producción en nuestro estudio es relevante en virtud a que se considera a los bovinos como la fuente de infección de brucelosis más importante para el hombre y otros animales.

La brucelosis está presente en todo el mundo con excepción de Canadá, Australia, Chipre, Noruega, Finlandia, Países Bajos, Dinamarca, Suecia, Nueva Zelanda y Reino Unido; por el contrario, aún está en curso en países como Europa mediterránea, América Central y del Sur, México, África, países del Cercano

Oriente, Asia Central, India e Italia con una importante prevalencia (Khurana *et al.*, 2021).

En México a pesar de la vigencia de la NOM-ZOO-041 Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales, y los esfuerzos por el control y la erradicación de la Brucelosis, sigue siendo una enfermedad endémica en muchos estados (Oseguera *et al.* 2013; SENASICA 2021). Los trabajos sobre Brucelosis en animales suelen desarrollarse en estados de alta producción bovina y caprina; sin embargo, se enfocan en describir la prevalencia y hay menos documentación de aislamiento e identificación de las especies de *Brucella sp.* Morales y Peña confirman la presencia de *Brucella abortus* en sus trabajos en Jalisco y Guanajuato (Morales- García *et al.*, 2015; Peña *et al.*, 2014; Oseguera *et al.*, 2013).

En el 2014 en el estado de Querétaro se realizó un estudio para la detección de Brucelosis, en el cual se llevó a cabo la prueba de tarjeta e inmunodifusión radial en becerras menores de tres meses de edad en 2 hatos diferentes, el hato 1 reveló que la tasa de prevalencia de vacas positivas a *B. abortus* fue de 13.6% a los tres meses de edad, con la prueba confirmatoria (IDR), mediante 20 pruebas de leche se aisló y confirmó *Brucella abortus* y por medio de PCR se confirmó que la cepa coincidía con cepas de campo y no cepas vacunales. El hato 2 presentó una prevalencia de 1.94% (35/1800); sin embargo, más adelante con este mismo hato, pero con solo 1170 muestras se realizó la prueba, de enero de 2009 a junio de 2010 el cual registró una prevalencia de 2.1% (Carrisoza-Urbina *et al.*, 2014). De aquí se desprende que es importante el diagnóstico frecuente, la eliminación de animales reactivos y la implementación de buenas prácticas pecuarias en las unidades de producción animal.

En México debido a que no se realizan pruebas para detectar brucelosis en edades tempranas pueden originar que las becerras que nacen o se contagian en la etapa de lactancia pasen inadvertidas hasta que alcanzan la edad reproductiva. Es de suma importancia realizar el diagnóstico en becerras nacidas en hatos que han presentado prevalencia de la enfermedad para así poder prevenir que persistan animales positivos en el establo, debido a que la presencia de anticuerpos después

de la vacunación dificultaría determinar la enfermedad, provocando así manifestaciones más adelante como el aborto en la primera gestación y manteniendo la brucelosis en el hato (Carrisoza-Urbina *et al.*, 2014).

En otros países con prevalencia media y alta frente a brucelosis, los resultados son variables. En el Distrito de Iganga, al este de Uganda, se evaluó la presencia de brucela mediante serodiagnóstico en muestras de sangre humana, bovina y caprina, mediante ELISA indirecto. De un total de 451 muestras de sangre humana, 20 (4,4%) fueron positivas, de 345 muestras de sangre de bovino, 4 (1,2%) fueron positivas y entre 351 muestras de sangre de cabra, solo 1 (0,3%) fue positiva (Nguna *et al.*, 2019). Un análisis de la situación epidemiológica en los países del Este de África permitió establecer que el ganado tiene una prevalencia a nivel animal de 0,2% a 43,8%, siendo de 0,0% a 20,0% para bovinos, 0,0% a 13,8% paracaprinos y ovinos, respectivamente. En humanos, la prevalencia varió mayoritariamente entre 0,0% y 35,8%, concluyendo que la brucelosis muestra alta prevalencia en la región (Djangwani *et al.*, 2021).

En el caso de Ruanda, un total de 330 muestras de leche a granel de 198 granjas sin pastoreo y 132 granjas de pastoreo abierto, fueron evaluadas mediante un ensayo de ELISA. También se aplicó un cuestionario a los ganaderos para determinar los factores de riesgo de contaminación de la leche con *Brucella sp.* Los anticuerpos anti-*Brucella sp* prevalecieron en el 19,7 % (intervalo de confianza (IC) del 95 %, 15,5-24,4) de las 330 muestras, siendo la seroprevalencia significativamente superior ( $p < 0,05$ ) en las granjas de pastoreo abierto (37,9 % [50/132]) que en las granjas sin pastoreo (7,6 % [15/198]). Practicar el sistema de pastoreo abierto, los antecedentes de aborto y la retención de placenta fueron los factores de riesgos significativos para la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* en la leche (Djangwani *et al.*, 2021b).

La seroprevalencia a nivel de rebaño y los factores de riesgo para la seropositividad de *Brucella* en el ganado, fueron estimados en la región de Morogoro, Tanzania. La proporción de hatos seropositivos para *Brucella* fue del 44,4 % (55/124, IC del 95 %: 35,5-53,5) (Asakura *et al.*, 2018). En el Área metropolitana de Bangladesh se

recolectaron muestras de suero (n = 158) de seis granjas lecheras seleccionadas al azar. Se utilizaron la prueba de placa de rosa de bengala (RBPT) y un ELISA competitivo (cELISA) como pruebas de detección y confirmación respectivamente. Las seroprevalencias generales de anticuerpos contra la brucelosis en el ganado bovino fueron del 21,5 % (34/158) y del 7,6 % (12/158). Se encontró que aproximadamente el 7,6% (12/158) y el 1,3% (2/158) del ganado estaban infectados con brucelosis aguda y crónica, respectivamente.

Los factores de riesgos asociados a la transmisión de la brucelosis en las unidades de producción son diversos; por ello, las buenas prácticas pecuarias son fundamentales para disminuir la transmisión de los agentes patógenos.

En nuestro trabajo se estudiaron los siguientes factores de riesgo en las unidades de producción bovina como edad, gestación, aborto, otros problemas reproductivos como infertilidad, repetición de calores y lactancia. En la zona predominan las unidades de producción a pequeña escala, encontrando hatos desde 6 a 50 animales, trabajadas únicamente por miembros de la familia, donde también resaltan como su única o principal fuente de ingresos.

En el presente trabajo la variable gestación como factor de riesgo frente a brucelosis bovina presento una prevalencia del 1.8% en comparación con los animales no gestantes con 6.3% de acuerdo a los resultados obtenidos a través de la prueba confirmatoria de rivanol, cifras que no coinciden con trabajos previos (Demiso *et al.*, 2021; Coelho *et al.*, 2014). Coelho y Demiso refieren que los animales jóvenes son bastante resistentes a la infección, mientras que los animales gestantes son los más susceptibles (debido a la producción de eritritol en la placenta), la susceptibilidad aumenta después de la madurez sexual, ocurriendo principalmente, durante la gestación. Esto podría explicarse por el hecho de que el azúcar de eritritol en la placenta y el líquido fetal aumenta durante el período de gestación, estimulando el crecimiento y la multiplicación de bacterias en los órganos reproductivos (Asgedom *et al.*, 2016; Walker, 1999).

Por otro lado, la asociación entre la edad y la infección por *Brucella* fue estadísticamente significativa, esto coincide y se respalda con trabajos anteriores donde los animales adultos presentaban hasta siete veces mayor riesgo de infección que los animales jóvenes, se puede atribuir a la naturaleza crónica de la enfermedad, las posibilidades de exposición al patógeno con el aumento de la edad y el apareamiento con animales seropositivos (Khan *et al.*, 2021). Ullah y colaboradores (2020a) y Asgedom y colaboradores (2016), también identificaron mayor prevalencia en animales adultos específicamente en >4 años, atribuible a una mayor frecuencia de contacto con otros animales con respecto a la edad, mayores posibilidades de coito y madurez sexual en comparación con animales más jóvenes. Con la edad aumentan las posibilidades de infección por *Brucella* y es considerada una enfermedad de animales adultos (Coelho *et al.*, 2014).

Así mismo en el presente trabajo no se encontró asociación estadística significativa entre la presentación de problemas reproductivos (vacas repetidoras, calor silencioso, retención placentaria) y el riesgo de infección; cabe resaltar que existe mayor prevalencia entre las que los presentaron que aquellas que no muestran problemas reproductivos. Sin embargo, la diferencia de riesgo fue de apenas 0.1%, contrastando completamente con Asgedom *et al.* (2016), quien confirmó asociación entre el número de servicios por concepción y la seropositividad de la brucelosis, describiendo que el número de servicios por concepción aumenta cuando el ganado experimenta repetidamente aborta, membrana fetal retenida, distocia y otros problemas de salud reproductiva. Otros trabajos también comparten estos resultados y asocian los mismos trastornos reproductivos como signos característicos de Brucelosis (Ullah *et al.*, 2020a; Asgedom *et al.*, 2016). Sin embargo, a pesar de estos hallazgos no debemos pasar por alto el hecho de que la brucelosis puede permanecer asintomática y no presentar signos clínicos reproductivos (Khan *et al.*, 2021).

Por otro lado, se identificó que había una mayor prevalencia en animales que tenían aborto o antecedentes de abortos en comparación con los que no habían



presentado, con una prevalencia de 11.1% y un riesgo atribuible a la población de 16.3% esto con la prueba de rivanol. Con respecto a la prueba de IDR no se pudieron obtener datos relevantes, esto debido fundamentalmente al pequeño tamaño de muestra empleada en nuestro trabajo. La asociación de aborto con brucelosis también se ha referido en estudios previos (Ullah *et al.*, 2020b, Saeed *et al.*, 2019 y Rashid *et al.*, 2021). El aborto en el último tercio de la gestación es un signo particular de la brucelosis, que también puede producir otros problemas reproductivos, como retención placentaria, endometritis e infertilidad (Saeed *et al.*, 2019).

La brucelosis tiene una correlación por el útero gestante; desarrolla una infección crónica, multiplicándose principalmente dentro de los trofoblastos corioalantoideos de la placenta, provocando placentitis, muerte fetal y aborto. Una vez que *brucella* entra al organismo, esta se localiza en otros tejidos linfoides como el bazo y los nódulos linfáticos iliacos, mesentéricos y supramamarios, el cual origina una respuesta granulomatosa. La invasión de las células trofoblásticas de la placenta frecuentemente sucede al mismo tiempo que el aborto. Debido a que la placenta en los rumiantes está compuesta por un gran número de placentomas que se originan por la fusión del endometrio caruncular materno y el cotiledón fetal (Poester *et al.*, 2013). El eritritol desempeña una función esencial en el tropismo de *Brucella* ya que le ayuda a sobrevivir y multiplicarse dentro del hospedero y es el principal abastecedor de carbono para la mayoría de las *Brucellas*, este azúcar es abundante en la placenta y los órganos genitales de los rumiantes y cerdos y se localiza al interior de las células trofoblásticas (Barbier *et al.*, 2017). Anderson y Smith (1965) mencionan que una elevada cantidad de eritritol en la placenta y el líquido fetal en el quinto mes de gestación es el factor primordial para el aborto en los animales.

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo se observó que los animales con mayor prevalencia a brucelosis eran aquellos que se encontraban con una producción láctea intensiva (17.4%, rivanol) en comparación a los animales en producción láctea moderada (6.0%, rivanol); estos resultados guardan relación con lo que se informó en un estudio en Pakistán (Ullah *et al.*, 2020b), en donde el riesgo

fue mayor en animales que se encontraban en lactancia. La asociación de la alta prevalencia en cuanto a la producción láctea intensiva, aún no está muy bien definida, pero Ullah *et al.* (2020b), refiere que esto puede estar ligado con el estrés de producción, el cual provoca la infección de brucelosis ya que permanecen en los nódulos linfáticos supramamarios.

Sin embargo, con respecto a la prueba de IDR la prevalencia fue mayor en animales en producción láctea moderada con 8.7% y 3.4% en animales con producción láctea intensiva. Esto guarda relación con un estudio realizado en el que se ve afectada la producción láctea en animales positivos a brucelosis (Mellado *et al.*, 2021). Otro estudio realizado en Bangladesh revelo que los animales con mayor prevalencia a *brucella abortus* eran aquellos que tenían una producción láctea baja. Esto está relacionado ya que unos de los signos clínicos de brucelosis es la disminución de la producción láctea (Islam *et al.*, 2021).

## X. CONCLUSIONES

La prevalencia general de *Brucella abortus* en hatos lecheros de los municipios de Amecameca y Ayapango, Estado de México con la prueba de aglutinación en tarjeta fue del 5.01% (13/259), la de rivanol del 3.49% (9/259) y la de inmunodifusión radial del 1.93% (5/259).

En tres de las unidades de producción pecuaria del municipio de Amecameca se confirmaron 5 casos positivos de *Brucella abortus* que representa un 2.67% de prevalencia en la población muestreada; mientras que en el municipio de Ayapango la prevalencia fue del 0%.

El riesgo relativo frente a la brucelosis mediante la prueba de rivanol en animales gestantes fue de 0.3 veces mayor respecto a los animales no gestantes; de 0.6 veces más en animales mayores a 3 años de edad; de 3.7 veces más es el riesgo de infección en animales que muestran problemas de aborto respecto a los que no abortan y la lactancia temprana y media mostraron 7.9 y 4.0 respectivamente de riesgo relativo de infección, respecto a los animales que no presentan lactancia.

El riesgo relativo frente a brucelosis mediante la prueba de inmunodifusión radial en animales, fue significativamente menor, respecto a la prueba de rivanol.

## XI. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	2019	2020												2021									2022			
	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	
Elaboración de protocolo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
Registro																										
Colección de muestras	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
Proceso de muestras															X	X										
Análisis de resultados																X	X									
Integración de tesis																	X	X	X	X	X	X	X	X		
Titulación																									X	

## **XII. IMPLICACIONES ÉTICAS**

Todos los procedimientos realizados con los animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación con Animales del Centro Universitario UAEM Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México. En todos los casos, los dueños de los hatos firmaron el acta de consentimiento informado.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez, N.E., Díaz, y Ortiz, M. (2015). Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Revista de Medicina e Investigación*. 3 (2), 129-133. DOI: 10.1016/j.mei.2015.07.002.
2. Anderson, J. D. y Smith, H. (1965). The Metabolism of Erythritol by *Brucella abortus*. *Journal of General Microbiology*, 38(1). 109-124 doi:10.1099/00221287-38-1-109
3. Arciga-Vázquez, G., Santos-López, G., Catañeda-Roldán, E. I., Cedillo-Ramírez, M. L., Cano-Vázquez, E. N., Monroy-Azura, M. G, López-Méndez, A. I., Ayón-Aguilar, J. y Méndez-Martínez. (2021). Estudios de casos confirmados de brucelosis humana en Puebla, México. *Revista Chilena de Infectología*. 38 (2). <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182021000200281>.
4. Arenas, N., y Moreno, V. (2016). Estudio económico de la infección por *Brucella abortus* en ganado bovino en la región del Sumapaz, Cundinamarca. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 63(3). doi:10.15446/rfmvz.v63n3.62751
5. Asakura, S., Makingi, G., Kazwala, R. y Makita, K. (2018). Herd-level risk factors associated with *Brucella* sero-positivity in cattle, and perception and behaviours on the disease control among agro-pastoralists in Tanzania. *Acta Tropica*. 187. 99-107. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.07.010.
6. Asgedom, H., Damena D., Duguma R. (2016). Seroprevalence of bovine brucellosis and associated risk factors in and around Alage district, Ethiopia. *SpringerPlus* 5. 851. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2547-0>.
7. Ávila, L.M., García, D.G., Zambrano, J.L., Arenas, A.M. (2019). Brucellosis in Colombia: Current Status and Challenges in the Control of an Endemic Disease. *Frontiers in Veterinary Science*. 6, 321.
8. Awah-Ndukum, J., Mouiche, M., Kouonmo-Ngnoyem, L., Bayang, H., Manchang, T., Poueme, R., Kouamo, J., Ngu-Ngwa, V., Assana, E., Feussom, K., y Zoli, A. (2018). Seroprevalence and risk factors of brucellosis among slaughtered indigenous cattle, abattoir personnel and pregnant women in Ngaoundéré, Cameroon. *BMC Infectious Diseases*, 18(1). 611. doi:10.1186/s12879-018-3522-x.
9. Barbier, T., Machelart, A., Zuñiga-Ripa, A., Plovier, H., Hougardy, C., Lobet, E., Willemart, K., De Bolle, X., Van Schaftingen, E., Moriyon, I. y Letesson, J.J. (2017). Erythritol Availability in Bovine, Murine and Human Models Highlights a Potential Role for the Host Aldose Reductase during *Brucella* Infection. *Frontiers in Microbiology*. 8. 1088-. doi:10.3389/fmicb.2017.01088 .
10. Byndloss, M. X., y Tsolis, R. M. (2016). *Brucella* spp. Virulence Factors and Immunity. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 111-127 doi: 10.1146/annurev-animal-021815-111326.
11. Carrisoza, I., Medina, M., Palomares, E.G. y Díaz, 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 el

21 de abril de 2020, de  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922014000200002&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922014000200002&lng=es&tlng=es).

12. Carrisoza-Urbina, I., Medina-Cruz, M., Palomares-Reséndiz, E. G. y Díaz-Aparicio, 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.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922014000200002](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922014000200002)
13. Castro, H.A., González S.R. y Prat, M.I. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(2), 203-216.
14. Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro, J., Moreno, E., y Gorvel, J. P. (2003). *Brucella* evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine*, 198(4), 545-556. doi.org/10.1084/jem.20030088.
15. Coelho, A, García J, Coelho A, C. (2014) Brucelosis en pequeños rumiantes: etiología, epidemiología, sintomatología, diagnóstico, prevención y control. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 15, núm. 5, mayo-junio, 2014, pp. 1-31 Veterinaria Organización Málaga, España.
16. Corbel, M. J. (1997). Brucellosis: an overview. *Emerging infectious diseases*, 3(2), 213-221. doi.org/10.3201/eid0302.970219.
17. Corbel, M.J. (2006). World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations y World Organisation for Animal Health. *Brucellosis in humans and animals*. Editorial © World Health Organization. Suiza.
18. Cutler, S. J., Whatmore, A. M., y Commander, N. J. (2005). Brucellosis - new aspects of an old disease. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1270- 1281. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02622.x.
19. De, B. K., Stauffer, L., Koylass, M. S., Sharp, S. E., Gee, J. E., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Vega, R., Clark, T. A., Daneshvar, M. I., Wilkins, P. P., y Whatmore, A. M. (2008). Novel *Brucella* strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection. *Journal of clinical microbiology*, 46(1), 43-49. <https://doi.org/10.1128/JCM.01494-07>.
20. Dean, A.S., Crump, L., Greter, H., Schelling, E. y Zinsstag, J. (2012). Global burden of human brucellosis: a systematic review of disease frequency. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 6 (10).
21. Degos, C., Hysenaj, L., Gonzalez, G., Arce, V., Gagnaire A, Papadopoulos, A., Pasquevich, K.A., Méresse, S., Cassataro, J., Mémet, S. y Gorvel, J.P. (2020). Omp25-dependent engagement of SLAMF1 by *Brucella abortus* in dendritic cells limits acute inflammation and favours bacterial persistence in vivo. *Cellular Microbiology*. doi:10.1111/cmi.13164.
22. Demiso M. S., Debela A. I., Akililu L. M., Eyob H. T. (2021) Seroprevalence of Bovine Brucellosis and Associated Risk Factors in Western Ethiopia. *Veterinary Medicine: Research and Reports*.

23. Djangwani, J., Ooko Abong', G., Gicuku Njue, L., y Kaindi, D. W. M. (2021). Brucellosis: Prevalence with reference to East African community countries – A rapid review. *Veterinary Medicine and Science*, 7(3), 851- 867. doi: 10.12834/vetit.305.3393.1. doi:10.1002/vms3.425.
24. Domínguez, A. M. T. (2012). Determinación de la seroprevalencia de Brucelosis bovina en los municipios de Amecameca, Ayapango y Tlalmanalco, Estado de México, mediante dos pruebas serológicas. Centro Universitario UAEM Amecameca. Universidad Autónoma del Estado de México.
25. Dorneles, E. M., Sriranganathan, N., & Lage, A. P. (2015). Recent advances in *Brucella abortus* vaccines. *Veterinary research*, 46(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0199-7>.
26. Eisenberg T., Ribe K., Schauerte N., Geiger C., Blom J., Scholz H. C. (2016). Isolation of a novel “atypical” *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). *Antonie Van Leeuwenhoek* 110 221-234. 10.1007/s10482-016-0792-4.
27. Eisenberg, T., Hamann, H. P., Kaim, U., Schlez, K., Seeger, H., Schauerte, N., Melzer, F., Tomaso, H., Scholz, H. C., Koylass, M. S., Whatmore, A. M., y Zschöck, M. (2012). Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and environmental microbiology*, 78(10), 3753-3755. doi.org/10.1128/AEM.07509-11.
28. Estes, D. M. y Brown, W. C. (2002). Type 1 and 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 90, 1-10.
29. Flores, V., Contreras, B., Correa, S., Antmann, M. (1998). *Archivos de Medicina Veterinaria*. 2da edición. Valdivia, Chile.
30. Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I. y Cloeckert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and evolutionary Microbiology*. 57(11), 2688-93.
31. Freitas, E.M. y Craviotto, H.F. (2019). Caracterización de la brucelosis bovina en Uruguay en el 2014- 2018(tesis de doctorado). Universidad de la República de Uruguay. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/25433/1/FV-34079.pdf>.
32. Glowacka, P., Żakowska, D., Naylor, K., Niemcewicz, M., y Bielawska-Drózd, A. (2018). *Brucella* Virulence Factors, Pathogenesis and Treatment. *Polish journal of Microbiology*, 67(2), 151-161. doi.org/10.21307/pjm-2018-029.
33. González, M.E., Hernández, A.L. y Diaz, A.E. (2006). Prueba de inmunodifusión radial con hapteno nativo para diferenciar bovinos con revacunaciones repetidas con la cepa S19 de *Brucella abortus*. *Técnica Pecuaria en México*. 44 (2). 269-276. [file:///C:/Users/HP/Downloads/art12%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/HP/Downloads/art12%20(3).pdf)



34. Gorvel, J. P., y Moreno, E. (2002). *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*, 90(1-4), 281-297. doi: 10.1016/s0378-1135(02)00214-6.
35. Gould, L.H., Mungai, E. y Behravesh, C.B. (2014) Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathogens and Disease*. 11(7), 545-551
36. Guzmán, C., Chaves, E., von Eichel, C., López, I., Thelestam, M., Arvidson, S., Gorvel, J.P. y Moreno, E. (2001). GTPases of the Rho Subfamily Are Required for *Brucella abortus* Internalization in Nonprofessional Phagocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 44435-44443. doi:10.1074/jbc.m105606200
37. Guzmán-Bracho, C., Salgado-Jiménez, B., Beltrán-Parra, L.G., Hernández-Monroy, I., Vargas-Pino, F., Rodríguez, D., López-Martínez, I., Pastén-Sánchez, S., González-Roldán, J.F., Membrillo-Hernández, J. y Díaz-Quiñónez, J.A. (2020). Evaluation of serological diagnostic tests of human brucellosis for prevention and control in Mexico. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: official publication of European Society of Clinical Microbiology*. 39(3),575-581. doi: 10.1007/s10096-019-03760-3.
38. Guzmán-Hernández, R.L., Contreras-Rodríguez, A., Ávila-Calderón, E. A. y Moreles-García, M. R. (2016). Brucellosis: zoonosis de importancia en México. *Revista Chilena de Infectología*. 33(6), 656-662. doi:10.4067/s0716-10182016000600007.
39. Harrison, E. R., y Posada, R. (2018). Brucellosis. *Pediatrics in Review*, 39(4), 222-224. doi:10.1542/pir.2017-0126
40. Hull, N. C., y Schumaker, B. A. (2018). Comparisons of brucellosis between human and veterinary medicine. *Infection ecology & epidemiology*, 8(1), 1500846. <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1500846>.
41. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020). INEGI. [División municipal. Estado de México \(inegi.org.mx\)](https://inegi.org.mx)
42. Islam, S., Ranjan, S., Parvin, S., Islam, A., Anisur, A. K. M. y Chowdhury, S. (2021). Seroprevalence and risk factors for bovine brucellosis in the Chittagong Metropolitan Area of Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science*. 7(1):86-98. doi: 10.1002/vms3.348.
43. Jamil, T., Melzer, F., Saqib, M., Shahzad, A., Khan Kasi, K., Hammad Hussain, M., Rashid, I., Tahir, U., Khan, I., Haleem Tayyab, M., Ullah, S., Mohsin, M., Mansoor, M. K., Schwarz, S., & Neubauer, H. (2020). Serological and Molecular Detection of Bovine Brucellosis at Institutional Livestock Farms in Punjab, Pakistan. *International journal of environmental research and public health*, 17(4), 1412. doi.org/10.3390/ijerph17041412.
44. Jaý, M., Girault, G., Perrot, L., Taunay, B., Vuilmet, T., Rossignol, F., Pitel, P. H., Picard, E., Ponsart, C., y Mick, V. (2018). Phenotypic and Molecular Characterization of *Brucella microti*-Like Bacteria From a Domestic Marsh Frog (*Pelophylax ridibundus*). *Frontiers in veterinary science*, 5. 283. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00283>.
45. Khan M., Rehman A., Khalid S., Ahmad M., Avais M., Sarwar M., Awan F., Melzer, F., Neubauer H., Jamil T. (2021) Seroprevalencia y Factores de

Riesgo Asociados de Bovinos Brucelosis en el distrito de Gujranwala, Punjab, Pakistán. Distrito Gujranwala, Punjab, Pakistán. *Animales* 2021, 11, 1744. <https://doi.org/10.3390/ani11061744>.

46. Khurana, S. K., Sehrawat, A., Tiwari, R., Prasad, M., Gulati, B., Shabbir, M. Z., Chhabra, R., Karthik, K., Patel, S.K., Pathak, M., Yattoo, M. I., Gupta, V. K., Dhama, K., Sah, R. y Chaicumpa, W. (2021). Bovine brucellosis – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 61-88. doi:10.1080/01652176.2020.1868616.
47. Ko, J., y Splitter, G. A. (2003). Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans. *Clinical microbiology reviews*, 16(1), 65-78. doi.org/10.1128/cmr.16.1.65-78.2003.
48. Mantur, B.G., Amarnath, S.K. y Shinde, R.S. (2007). Review of clinical and laboratory features of human brucellosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 25(3), 188-202. DOI: 10.4103/0255-0857.34758
49. Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad animal. (2018). [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRU\\_CELL.pdf?fbclid=IwAR2S95oQEIPF2NGrRHvBSfDV3q1ObUWAFcB2Q8N-aHyCVCo10J92d\\_-2qSk](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.04_BRU_CELL.pdf?fbclid=IwAR2S95oQEIPF2NGrRHvBSfDV3q1ObUWAFcB2Q8N-aHyCVCo10J92d_-2qSk).
50. Martinez, D.E., Cipolini, M.F., Storani, C.A., Russo, A.M. y Martinez, E.I.(2018). Brucellosis: prevalencia y factores de riesgo asociados en bovinos, bubalinos, caprinos y ovinos de Formosa, Argentina. *Revista Veterinaria*. 29(1). 40-44. DOI: <http://dx.doi.org/10.30972/vet.2912789>.
51. Martirosyan, A., Moreno, E., y Gorvel, J.-P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunological Reviews*, 240(1), 211-234. doi:10.1111/j.1600-065x.2010.00982.x.
52. Medig, J., Mathias, L. A., y Robles, C. A. (2010). Manifestaciones clínicas de la brucelosis en animales domésticos y seres humanos. *The Open Veterinary Science Journal*. (4), 119-126. DOI: 10.2174 / 1874318801004010119.
53. Mellado, M., Treviño, N., Véliz, F.G., Macías-Cruz, U., Avendaño-Reyes, L., De Santiago, A. y García, J.E. (2021). Effect of co-positivity for brucellosis and tuberculosis on milk yield and fertility of Holstein cows. *Tropical Animal Health Production*. 53(5). 504. doi.org/10.1007/s11250-021-02952-4
54. Méndez, M., Rodríguez, E.J., Sánchez, L.M. (2015). Brucellosis, a zoonotic disease present in the population: A time series study in México. *Salud Pública México*. 57(6):519-27.
55. Morales-García, M.R., Lopez-Mendez, J., Pless, R., Garcia-Morales, E., Kosanke, H., Hernandez-Castro, R., Bedi, J., Lopez-Merino, A., Velazquez-Guadarram, N., Jimenez-Rojas, L. y Rontreras-Rodriguez, A. (2015). Brucellosis outbreak in a rural endemic region of Mexico - a comprehensive investigation. *Veterinaria Italiana*. 51(3), 185-90. doi: 10.12834/vetit.305.3393.1.
56. Moreno, E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Frontiers in microbiology*, 5, 213. doi.org/10.3389/fmicb.2014.00213

57. Moreno, E. y Gorvel, J. (2004). - Invasion, intracellular trafficking and replication of *Brucella* organisms in professional and non-professional Phagocytes. *Brucella: Molecular and Cellular Biology*. 287-312.
58. Moreno, J., Rentería, T., Searcy, R. y Montaña, M. (2002). Seroprevalencia y factores de riesgos asociados a la Brucelosis Bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. *Revista Técnica pecuaria México*. 40(3),243-249. <file:///C:/Users/HP/Downloads/art3.pdf>.
59. Nguna, J., Dione, M., Apamaku, M., Majalija, S., Rwabita, D., Odoch, T., Drago, C., Tumwine, G., Kabaasa, J D., Curtis, K., Graham, M., Ejobi, F. y Graham, T. (2019). Seroprevalence of brucellosis and risk factors associated with its seropositivity in cattle, goats and humans in Iganga District, Uganda. *Pan African Medical Journal*. 33(99). doi: [10.11604/pamj.2019.33.99.16960](https://doi.org/10.11604/pamj.2019.33.99.16960).
60. NOM-022-SSA2-2012. Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano.
61. NOM-041-ZOO-1995 SAGARPA. “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales,”. Diario Oficial de la Federación el 20 de agosto de 1996, una Aclaración el 20 enero de 1997 y su Modificación el 6 de febrero de 2004. [www.dof.gob.mx](http://www.dof.gob.mx). <http://publico.senasica.gob.mx/?doc=506>.
62. NOM-056-ZOO-1995 SAGARPA. Norma oficial mexicana, especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.
63. Ojeda-Carrasco, J. J., Espinosa-Ayala, E., Hernández-García, P. A., Rojas-Martínez, C. y Álvarez-Martínez, J.A. (2016). Seroprevalencia de enfermedades que afectan la producción de bovinos para leche con énfasis en neosporosis. *Ecosistemas y recursos agropecuario*. 3(8). [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-90282016000200243&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282016000200243&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
64. Organización Mundial de Sanidad Animal. (OIE) (2019). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2019.
65. Organización Mundial de Sanidad Animal. (OIE) (2020). Brucelosis.
66. Organización Mundial de Sanidad Animal. (OIE) (2021). Brucelosis.
67. Oseguera, M., Frankena, K., Udo, H., Keilbach, BNM., Zijpp A. (2013). Prevalencia y factores de riesgo de brucelosis en caprinos de zonas de México con y sin Campaña de control de la brucelosis. *Producto de salud TropAnim*. 45.1383-1389.
68. Padrón, O., Martínez, D.I., Peniche, A. y López, L. (2011). Historia de la brucelosis. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad Veracruzana*. 24(2). <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol24num2/articulos/brucelosis/>
69. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L. y Tsianos, E.V. (2006). The new global map of human brucellosis. *The Lancet. Infectious Diseases*. 6(2), 91-9.
70. Paucar, V., Ron-Román, J., Benítez-Ortiz, W., Celi, M., Berkvens, D., Saegerman, C. y Ron-Garrido, L. (2021). Bayesian Estimation of the Prevalence and Test Characteristics (Sensitivity and Specificity) of Two Serological Tests (RB and SAT-EDTA) for the Diagnosis of Bovine Brucellosis

- in Small and Medium Cattle Holders in Ecuador. *Microorganisms*. 9(9), 1815. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091815>.
71. Peña, A., Cervini, J., Padilla, L. y Delgadillo, J. (2014) Prevalencia de brucelosis bovina en la región de producción lechera de Jalisco, México. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 1 (2), 2334-2501.
  72. Poester, F. P., Samartino, L. E. y Santos, R. L. (2013). Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 3 (2). 105-15. doi: 10.20506/rst.32.1.2193.
  73. Porte, F., Naroeni, A., Ouahrani-Bettache, S., y Liautard, J. P. (2003). Role of the *Brucella suis* lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome-lysosome fusion in murine macrophages. *Infection and immunity*, 71(3), 1481-1490. doi.org/10.1128/iai.71.3.1481-1490.2003.
  74. Preis, I. S., Moura, A., de Souza, P. G., Filho, P. M. S., & Fonseca Júnior, A. A. (2019). Comparison of six methods of DNA extraction for the diagnosis of bovine brucellosis by real-time PCR. *Archives of Microbiology*. 201(8) ,1025-1028. doi: 10.1007/s00203-019-01675-3.
  75. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. (2019). (ProNaBiVe). <https://www.gob.mx/pronabive/es/articulos/vacunas-utilizadas-en-la-campana-nacional-contra-la-brucelosis-en-los-animales?idiom=es#:~:text=No%20existe%20vacuna%20para%20prevenir,melitensis>.
  76. Programa trianual de asistencia social del sistema municipal del DIF en Ayapango 2013-2015. Ipomex.org.mx. [https://www.ipomex.org.mx/recursos/ipo/files\\_ipo/2013/20/10/dc845b2a269698f6213e50a7e2118a5f.pdf](https://www.ipomex.org.mx/recursos/ipo/files_ipo/2013/20/10/dc845b2a269698f6213e50a7e2118a5f.pdf)
  77. Rashid, M., Rehman, A., Khlid, S., Ud Din, M., Avais, M., Sarwar, M., Nazir, F., Melzer, F., Neubauer, H. y Jamil, T. (2021). Seroprevalence and Associated Risk Factors of Bovine Brucellosis in District Gujranwala, Punjab, Pakistan. *Animals*. 11 (6). doi.org/10.3390/ani11061744.
  78. Robinson-Dunn, B. (2002). The microbiology laboratory's role in response to bioterrorism. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 126(3):291-4. DOI:10.1043/0003-9985(2002)126<0291:TMLSRI>2.0.CO;2.
  79. Rodrigues, C., Fernandes, J. V., Cardoso, I. R., Faria de Olivares, L., Pereira, L. J., Zangerônimo, M. G., Pereira, A. y Seles, E. M. (2020). Occupational exposure to *Brucella* spp.: A systematic review and meta-analysis. *Plos Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008164>.
  80. Roop, R. M., 2nd, Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C., y Martin, D. W. (2009). Survival of the fittest: how *Brucella* strains adapt to their intracellular niche in the host. *Medical microbiology and immunology*, 198(4), 221-238. doi.org/10.1007/s00430-009-0123-8.
  81. Saeed, U., Ali, S., Mahmood, T., El-Adawy, H., Melzer, F., Ullah, A., Iftikhar, A. y Neubauer, H. (2019). Seroepidemiology and the Molecular Detection of Animal Brucellosis in Punjab, Pakistan. *Microorganisms*.7 (10), 449. doi:10.3390/microorganisms7100449.
  82. Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L. y Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in

- the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 17(1), 7-15.
83. Scholz, H. C., Banai, M., Cloeckaert, A., Kämpfer, P., y Whatmore, A. M. (2018). *Brucella*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-38. doi:10.1002/9781118960608.gbm00807.pub2.
  84. Scholz, H.C., Nöckler, K., Göllner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Kämpfer, P., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J. y De, B.K. (2010, abril). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(4) ,801-8. doi: 10.1099/ijs.0.011148-0.
  85. Scholz, H.C., Revilla, S., Dahouk, S.A., Hammerl, J.A., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., Koylass, M., Whatmore, A.M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K., y Hofer, E. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66(5), 2090-2098. doi: 10.1099/ijs.0.000998.
  86. Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk, S., Melzer, F., Kämpfer, P., Neubauer, H., Cloeckaert, A., Maquart, M., Zygmunt, M.S., Whatmore, A.M., Falsen, E., Bahn, P., Göllner, C., Pfeffer, M., Huber, B., Busse, H.J., Nöckler, K. (2008). *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(2):375-82. doi: 10.1099/ijs.0.65356-0.
  87. Segura, J.C. (2005). Brucelosis. *Guías Clínicas*. 5(25), 1-6.
  88. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (SENASICA) (2020a). Situación actual del control de la brucelosis en México.
  89. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (SENASICA) (2020b). Situación actual del control de la brucelosis en México.
  90. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (SENASICA) (2021). Situación actual del control de la brucelosis en México.
  91. Shabana, I. I., y Krimly, R. A. (2019). Seroprevalence of some viral and bacterial zoonoses in domestic ruminants in Medina. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 7(1), 42-50. doi.org/10.5455/javar.2020.g391.
  92. Sola, A., Pizarro, J., Grilló, M.J., Moreno, E., Moriyón, I., Blasco, J.M., Gorvel, J.P. y López, I. (1998). A two-component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in *Brucella abortus* and controls cell invasion and virulence. *Molecular Microbiology*, 29(1) ,125-138. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00913.x.
  93. Songer, J. y Post, K. (2004). *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Editorial Elsevier Saunders.
  94. Starr, T., Child, R., Wehrly, T. D., Hansen, B., Hwang, S., López, C., Virgin, H. W., y Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the *Brucella* intracellular cycle. *Cell host & microbe*, 11(1), 33-45. doi.org/10.1016/j.chom.2011.12.002.

95. Stoenner, H.G, y Lackman, D.B. (1957) A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, *Neotoma lepida* Thomas. American Journal of veterinary Research. 18(69) ,947-51.
96. Tiller, R. V., Gee, J. E., Lonsway, D. R., Gribble, S., Bell, S. C., Jennison, A. V., Bates, J., Coulter, C., Hoffmaster, A. R., y De, B. K. (2010). Identification of an unusual *Brucella* strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia. BMC microbiology, 10, 23. doi.org/10.1186/1471-2180-10-23.
97. Ullah U., Jamil T., Melzer F., Saquib M., Hammad, M., Aamir M., Amjad M., Tahir U., Ullah S., Iqbal Z., Schwarz S., Neubauer H. (2020a). Epidemiology and Associated Risk Factors for Brucellosis in Small Ruminants Kept at Institutional Livestock Farms in Punjab, Pakistan. Frontiers in Veterinary Science. 2(7). 526. doi: 10.3389/fvets.2020.00526. eCollection 2020.
98. Ullah, A., Melzer, F., Hendam, A., Sayour, A. E., Khan, I., Elschner, M. C., Younus, M., Ehtisham-ul-Haque, S., Waheed, Usman., Farooq, M., Ali, S., Neubauer, H. y El-Adawy, H. (2020b). Seroprevalence and Molecular Identification of *Brucella* spp. in Bovines in Pakistan—Investigating Association with Risk Factors Using Machine Learning. Frontiers in Veterinary Science. doi.org/10.3389/fvets.2020.594498
99. Vega, C.A., Ariza, R. y Rodríguez, F.L. (2008). Brucelosis. Una infección vigente. Acta Médica Grupo Ángeles. 6(4).
100. Von Bargen, K., Gorvel, J.-P., Salcedo, S. P. (2012). Internal affairs: investigating the *Brucella* intracellular lifestyle. FEMS Microbiology Reviews, 36(3), 533-562. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00334.x.
101. Walker, L.R. (1999) *Brucella*. En: Wight D, Hirsh C, Yuan Chung Z (eds) Microbiología veterinaria. Blackwell Science, Hoboken, págs. 196-202.
102. Wang, H., Xu, W.M., Zhu, K.J., Zhu, S.J., Zhang, H.F., Wang, J., Yang, Y., Shao, F.Y., Jiang, N.M., Tao, Z.Y., Jin, H.Y., Tang, Y., Huo, L.L., Dong, F., Li, Z.J., Ding, H., Liu, Z.G.(2020). Molecular investigation of infection sources and transmission chains of brucellosis in Zhejiang, China. Emerging Microbes and Infections, 1-322. doi:10.1080/22221751.2020.1754137.
103. Wang, S., Wang, W., Sun, K., Bateer, H., y Zhao, X. (2019). Comparative genomic analysis between newly sequenced *Brucella abortus* vaccine strain A19 and another *Brucella abortus* vaccine S19. Genomics. doi:10.1016/j.ygeno.2019.08.015.
104. Whatmore, A. M., Davison, N., Cloeckaert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M. S., Brew, S. D., Perrett, L. L., Koylass, M. S., Vergnaud, G., Quance, C., Scholz, H. C., Dick, E. J., Jr, Hubbard, G., y Schlabritz-Loutsevitch, N. E. (2014). *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 64(12). 4120-4128. doi.org/10.1099/ijs.0.065482-0
105. Yang, X., Skyberg, J. A., Cao, L., Clapp, B., Thornburg, T., y Pascual, D. W. (2013). Progress in *Brucella* vaccine development. Frontiers in biology, 8(1), 60-77. https://doi.org/10.1007/s11515-012-1196-0.

106. Zambrano, M.D., Pérez, M. (2015). Seroprevalencia de brucelosis en ganado bovino y en humanos vinculados a la ganadería bovina en las zonas norte y centro de la provincia Manabí, Ecuador. *Revista Salud Animal*. 37(3), 164-172.
107. Zhang, W. Y., Guo, W. D., Sun, S. H., Jiang, J. F., Sun, H. L., Li, S. L., Liu, W., y Cao, W. C. (2010). Human brucellosis, Inner Mongolia, China. *Emerging infectious diseases*, 16(12), 2001-2003. doi.org/10.3201/eid1612.091081.

#### XIV. ANEXOS

**Anexo 1.** ENCUESTA DE PARA IDENTIFICACIÓN DE PROBLEMAS REPRODUCTIVOS EN HATOS LECHEROS DE AMECAMECA Y AYAPANGO, ESTADO DE MÉXICO.

Folio: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

<b>1. Identificación de la unidad de producción pecuaria</b>		
Municipio		
<b>2. Registros del hato</b>		
N° de animales (Total)	Hembras	Machos
Edades	Entre 0 meses y un año	
	Entre 13 y 24 meses	
	Entre 25 y 36 meses	
	Entre 37 y 48 meses	
	Mayor de 6 años	
Superficie destinada a los animales		
Corrales m2		
Comederos m2		
Praderas m2		
<b>3. Registro de Producción</b>		
Litros de leche producidos por día		
Destino de la leche	<b>Venta</b>	<b>Elaboración de subproductos</b>
<b>4. Registros de producción</b>		
<b>Monta directa ( ) Inseminación artificial ( )</b>		



Partos por año			
En su establo ¿se han presentado problemas reproductivos?			
<b>Infertilidad ( )</b>	<b>Abortos ( )</b>	<b>Partos prematuros ( )</b>	
En casos de abortos			
Etapas de la gestación que se presentó el aborto			
Primer tercio ( )	Segundo tercio ( )	Tercer tercio ( )	
	<b>SI</b>	<b>NO</b>	¿Cuál?
¿Se ha realizado alguna prueba de diagnóstico para determinar la causa del aborto?			
¿Se ha administrado algún tratamiento a las vacas que han presentado aborto?			
¿Cuál es el destino de los vientres que presentaron aborto?			
<b>Observaciones</b>			