

Centro de Investigación en Alimentación Y Desarrollo, A. C.

Recuperación, incidencia y Biotipificación de Brucella sp
en Queso Fresco Regional

Por

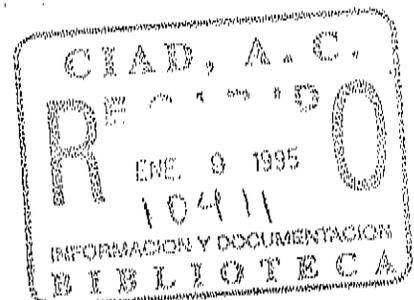
EVELIA ACEDO FELIX

Tesis aprobada por la

DIRECCION DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE LOS ALIMENTOS

Como Requisito Parcial para Obtener
El Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
EN NUTRICION Y ALIMENTOS



CENTRO DE INVESTIGACION EN ALIMENTACION Y DESARROLLO, A. C.

**Recuperación, Incidencia y Biotipificación de Brucella sp
en Queso Fresco Regional.**

Por

EVELIA ACEDO FELIX

Tesis Aprobada por la

**DIRECCION DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
DE LOS ALIMENTOS**

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS ESPECIALIDAD
EN NUTRICIÓN Y ALIMENTOS.**

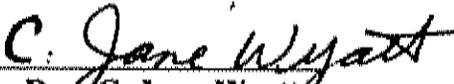
Hermosillo, Sonora.

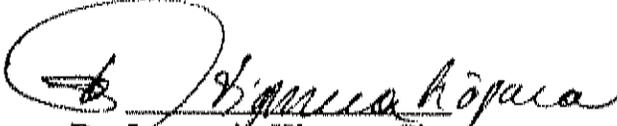
Mayo 24 de 1994

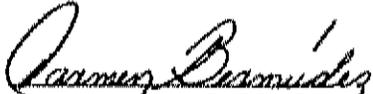
APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Evelia Acedo Félix, han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias con especialidad en Nutrición y Alimentos.


M.C. Martha E. Díaz Cinco.
Directora de Tesis


Dra. C. Jane Wyatt


Dr. Inocencio Higuera Ciapara


M.C. Ma. del Carmen Bermúdez

DECLARACION DEL AUTOR

Se pemiten citas breves del material contenido en ésta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente.

Se podrá solicitar permiso del Director del Centro o Jefe del Departamento de Ciencia de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Apartado postal 1735, Hermosillo, Sonora, 83,000, México, para citas o consultas o para la reproducción íntegra del documento para fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.

AUTOR


EVELIA ACEDO FELIX

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo financiero para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., en forma especial a su director Dr. Inocencio Higuera C., quien a la vez formó parte del comité evaluador del presente trabajo de tesis.

A la M. C. Martha E. Díaz C. por su dirección y apoyo en la realización del trabajo de investigación, así como también a la Dra. Jane Wyatt y M.C. Ma. del Carmen Bermúdez, por sus aportaciones en la revisión del presente documento.

En forma muy especial quiero agradecer a Berenice León D. por su amistad y apoyo durante el transcurso del trabajo. De igual forma agradezco a mi maestra Dra. Ma. Isabel Silveira A. su ayuda en el manejo estadístico de la información generada en el trabajo.

A todos mis compañeros de generación de la Maestría, a la Unidad de Servicios de Apoyo Académico, especialmente a Héctor Cota y Andrés Beltran.

A todas las personas que me apoyaron directa o indirectamente.

DEDICATORIA

A DIOS

A MI MADRE
Por la oportunidad de ser.

A MIS HERMANOS
Tuly, Cornelio, Elvia, Marcos y Bernardo.

A MIS SOBRINOS Y FAMILIA

A LA MEMORIA DE MI PADRE Y HERMANOS

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	4
La leche	4
El Queso	8
Aspectos nutricionales del queso	10
Proteínas	10
Carbohidratos	11
Grasa	12
Vitaminas	12
Minerales	13
La tecnología en la elaboración del queso	13
Preparación de la leche	13
Coagulación	14
Corte o quebrado de la cuajada	15
Salado	15
Madurado	16
Elaboración artesanal del queso	16
Consumo de queso	18
Contaminación del queso	19
Mastitis	20
Brucella en queso	20
Epidemiología de la brucelosis	24
Nivel mundial	24
En México	26
En Sonora	27

CONTENIDO (continuación)

<u>Brucella</u>	30
Antecedentes históricos	30
Descripción del género <u>Brucella</u>	31
Taxonomía del género <u>Brucella</u>	31
Diferencia entre las especies	33
1. Número de biotipos	33
2. Morfología colonial	34
3. Comportamiento metabólico	35
4. Crecimiento en presencia de colorantes	35
5. Requerimientos atmosféricos y de suero	35
6. Susceptibilidad a los bacteriófagos	36
7. Tipificación con antisueros	36
8. Comportamiento biológico en la naturaleza	36
Resistencia al medio ambiente	38
Comportamiento antigénico y determinantes de virulencia del género <u>Brucella</u>	38
Lipopolisacárido	40
Hapteno nativo	42
Polisacárido B	42
Proteínas de la membrana externa	42
Porinas	43
Antígenos internos	43
Lípidos	43
Inmunidad contra <u>Brucella</u>	44
Inmunidad celular	45
Inmunidad humoral	45
Resistencia natural o no específica	46
Barreras físicas	46
Fagocitosis	46
Macrófagos	47
Patogénesis	48
Patogénesis de la brucelosis humana	49
Patogénesis de la brucelosis bovina	50
Modo de transmisión	53

CONTENIDO (continuación)

Diagnóstico de la brucelosis	55
Determinación serológica	55
Reacción falsa negativa	57
Reacción falsa positiva	57
Pruebas serológicas	57
Fijación del complemento	57
Prozona	58
Pruebas de aglutinación en tubo o en portaobjetos .	58
Prueba de Rosa de Bengala	58
Prueba de antiglobulina de Coombs	58
Prueba de hemólisis indirecta	59
Otras pruebas	59
ELISA	59
Prueba de anillo en leche	59
Pruebas bacteriológicas	60
Aislamiento del organismo	62
Cultivo directo	62
Cultivo con pre-enriquecimiento	63
Identificación	65
Métodos de control	67
Medidas preventivas	67
Campañas de erradicación	68
MATERIALES Y METODOS	70
RESULTADOS Y DISCUSION	78
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	98
BIBLIOGRAFIA	101

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Comparación entre los constituyentes químicos promedio de la leche de bovino y caprino (g/100 ml)	5
2. Comportamiento epidemiológico de la brucelosis en el Estado de Sonora, de 1980-1993	29
3. Características diferenciales de las especies y biotipos de <u>Brucella</u>	32
4. Sobrevivencia de <u>Brucella</u> en muestras ambientales y de alimentos	39
5. Características metabólicas oxidativas de las especies de <u>Brucella</u> y sus biotipos	66

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Promedios de recuperación para <u>Brucella abortus</u> y <u>Brucella melitensis</u>, empleando los dos métodos de cultivo	79
2. Log_{10} de las cuentas bacteriológicas promedio de los medios de cultivo empleados en la recuperación de <u>Brucella abortus</u> y <u>Brucella melitensis</u>	90
3. Resultados de las características químicas de los quesos empleados en la recuperación de <u>Brucella abortus</u> (A) y <u>Brucella melitensis</u> (B)	92
4. Especies de <u>Brucella</u> aisladas de queso fresco regional, provenientes del Municipio de Cajeme y Guaymas, Son	96

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Recuperación de <u>Brucella melitensis</u> , comparando los dos métodos de cultivo, cuenta directa (■) y por el método con pre-enriquecimiento (+)	81
2. Recuperación de <u>Brucella abortus</u> , comparando los los dos métodos de cultivo, cuenta directa (■) y por el método con pre-enriquecimiento (+)	82
3. Recuperación de <u>Brucella melitensis</u> , usando el método con pre-enriquecido y medios de cultivo con suero de caballo + dextrosa (3A) y con glicerol + dextrosa (3B)	85
4. Recuperación de <u>Brucella melitensis</u> , usando el método de cuenta directa y medios de cultivo enriquecidos con suero de caballo + dextrosa (4A) y Glicerol + dextrosa (4B)	86
5. Recuperación de <u>Brucella abortus</u> , por el método de pre-enriquecimiento y medios de cultivo enriquecidos con suero de caballo + dextrosa (5A) y glicerol + dextrosa (5B)	87
6. Recuperación de <u>Brucella abortus</u> , por el método de cuenta directa y medios de cultivo enriquecidos con suero de caballo + dextrosa (6A) y glicerol + dextrosa (6B)	88

RESUMEN

El queso es un alimento exquisito, con alto valor nutricional, elaborado a partir de la leche de tres especies de mamíferos, vaca, borrego y cabra, en forma individual, o mezclada. En México, existe preferencia por el consumo de queso fresco, cuya elaboración es a partir de leche cruda, situación que se torna grave, si se elabora a partir de leche proveniente de animales enfermos, el queso así elaborado es un vehículo para la transmisión de bacterias patógenas para el hombre, como es el caso de Brucella sp.

En México, la brucelosis ha sido encontrada en la mayoría de los estados del país. En Sonora, se presentan los primeros casos hacia el año de 1977, y a partir de entonces se ha venido propagando y aumentando su incidencia en forma alarmante, principalmente en la zona Sur del estado.

Se realizó el presente trabajo, para determinar la recuperación y la incidencia de Brucella sp en queso fresco regional, así como los biotipos presentes, empleando el método de siembra directa y con pre-enriquecimiento, además, se llevaron a cabo los análisis fisicoquímicos de los quesos, para determinar su influencia en la recuperación de la bacteria.

Se encontró que con pre-enriquecimiento se obtenía una mayor recuperación (mayor del 50%), con respecto al método directo, tanto para Brucella melitensis, como para Brucella abortus, siendo indistinta la utilización de los enriquecimientos

empleados, suero de caballo + dextrosa y glicerol + dextrosa, aún cuando en la literatura se reporta un porcentaje de recuperación mayor empleando suero de caballo como enriquecimiento. De los medios de cultivo empleados, el Agar Brucella y el Agar Infusión de Papa presentaron mejor recuperación.

Entre los parámetros químicos que presentaron influencia para la recuperación de B. abortus estuvieron el contenido de grasa y cloruros, en cambio, para la recuperación de B. melitensis, no influyó ningún parámetro.

De las 335 muestras de queso analizadas 25 (7.5%) fueron positivas a Brucella, predominando Brucella abortus con 16 cepas, de las cuáles, 7 son biotipo 1, se aislaron además los biotipos 4, 5 y 7 de la misma especie. Se aislaron 5 cepas de Brucella melitensis biotipo 1 y 4 cepas de Brucella atípicas.

INTRODUCCION

El queso es un alimento exquisito, consumido a nivel mundial y producido a partir de leche de mamíferos, siendo principalmente vaca, borrega y cabra, ya sea en forma individual o bien mezclada. Es un excelente producto para mejorar la dieta diaria, sobre todo en la población infantil, 100 grs. de un buen queso maduro, aportan a un niño de 5 años más de la mitad de la energía y proteína de un día por lo que está considerado entre los mejores alimentos del hombre (Peraza-Castro, 1987a).

En México, existe una preferencia por el consumo de queso fresco, cuya elaboración es a partir de leche cruda, situación que no sería grave, si fuera elaborado a partir de leche proveniente de animales sanos y con los medios higiénicos adecuados, lo que lo hace un producto sumamente saludable, situaciones que desafortunadamente no son las comunes, ya que no hay un manejo adecuado, puesto que la leche se ve sometida a la acción ambiental, las vacas sanas no se separan de las enfermas, la leche no recibe ningún tratamiento térmico para la elaboración del queso, cuyo proceso es a nivel artesanal y en condiciones sanitarias inadecuadas, tanto del artesano como del medio ambiente. El queso así elaborado puede llegar a ser un vehículo para la transmisión de diferentes tipos de bacterias patógenas para el hombre, tales como Brucella sp (Eckman, 1975; Teclaw y col., 1985). El sitio de predilección de Brucella en las vacas es la ubre y nodulos

linfáticos supramamarios, los cuáles son afectados en un 60 - 93% de los animales infectados. Se ha estimado que del 15 al 35% de las vacas en hatos sin vacunar excretan números detectables de Brucella en su leche, incluyendo vacas que no han abortado (Kaplan y col., 1962; Corner y col., 1987)

En México, la brucelosis ha sido encontrada en todos los Estados, siendo los principales Guanajuato, Coahuila, Durango, Zacatecas, Chihuahua, Distrito Federal, Nuevo León, Tamaulipas y Sonora. Particularmente, en Sonora, la brucelosis presenta los primeros antecedentes hacia el año de 1977 en Etchojoa, Son. y a partir de entonces, ésta se ha venido propagando y aumentando su incidencia en forma alarmante, principalmente en la zona Sur del estado, la cuál es considerada una zona endémica de brucelosis, centrándose principalmente en los municipios de Obregón y Guaymas (SEMESON, 1987).

En 1984, en una mesa redonda sobre la estandarización de los métodos de diagnóstico para Brucella, coordinado por la Comunidad Económica Europea, M. J. Corbel enfatizó las necesidades de la estandarización de los procedimientos de cultivo e identificación de las especies de Brucella, acerca de los medios de cultivo apropiados para su aislamiento, así como la generación de información en grado comparativo sobre las ventajas de las técnicas de enriquecimiento contra las técnicas de cultivo directo (Verger y Plommet, 1984).

Debido a que en Sonora no se conoce la incidencia de Brucella en productos lácteos, como tampoco las especies y biotipos que prevalecen en el estado, en éste trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

1. **Determinar la recuperación de Brucella sp en queso fresco regional elaborado en el Laboratorio de Microbiología y comparar dos métodos de aislamiento empleados en la detección de Brucella sp en productos lácteos.**
2. **Determinar la incidencia de Brucella sp en queso regional expandido en el Municipio de Cajeme y Guaymas, Sonora.**
3. **Identificar las especies, así como los biotipos del género Brucellae, presentes en el queso fresco regional expandido en Cajeme y Guaymas, Sonora.**

REVISION BIBLIOGRAFICA

La leche

La leche es esencial para el desarrollo y crecimiento de los mamíferos jóvenes, está considerada como elemento básico en la nutrición infantil, para las mujeres embarazadas y aquellos en período de lactancia. Proporciona un excelente suplemento de energía, anticuerpos, vitaminas y minerales. Los constituyentes de la leche pueden ser sintetizados en glándula mamaria, o transportados del torrente sanguíneo por mecanismos específicos. Entre los constituyentes sintetizados se incluyen la grasa, lactosa, caseína, alfa y beta lactoalbúminas. En el Cuadro I, se encuentran los valores promedio de los constituyentes de la leche de las dos especies de mamíferos más comunes en la industria lechera. La función principal de la lactosa y de la grasa en la leche es la de proporcionar energía; la proteína es un suplemento de aminoácidos, para su incorporación en proteínas. La lactosa, al igual que otros carbohidratos, promueve la absorción de calcio en el intestino, al producirse un complejo con el calcio. La función principal de la caseína es la de proporcionar aminoácidos para acarrear calcio y fosfatos (Jenness, 1986; Battistotti y col, 1985; Anónimo, 1989).

La leche también es un medio de cultivo bacteriano muy rico, incluyendo a los organismos fastidiosos y patógenos para el humano. Antes

Cuadro 1. Comparación entre los constituyentes químicos promedio de la leche de bovino y caprino (g/100 mL).

CONSTITUYENTE	BOVINO	CAPRINO
Agua	87.5	86-88
Grasa/lípidos y sust. relacionadas	3.4-5.0 de los cuales: 3.0-3.4 triglicéridos 0.007-0.04 fosfolípidos ⁽¹⁾ 0.03-0.04 Sust. asociadas ⁽²⁾	4.05
Compuestos nitrogenados	2.9-3.5 de los cuales: 2.3-2.8 caseína 0.5-0.7 albúmina ⁽³⁾ 0.04-0.8 globulinas 0.03-0.05 enzimas 0.02-0.03 nitrógeno no proteico ⁽⁴⁾	3.75
Carbohidratos	4.4-4.8 como lactosa ⁽⁵⁾	4.4-4.5
Sal	0.9	0.9-1.0
Vitaminas hidrosolubles ⁽⁶⁾	Trazas	Trazas
Gases ⁽⁷⁾	Trazas	Trazas

⁽¹⁾ Lecitinas, cafalosporinas, fosfatilserina, esfingomielina, cerebrósidos, silicones y monoglicéridos.

⁽²⁾ Ac. grasos libres, colesterol, varios esteroides, Vit. A, D y K, hidrocarburos y escualeno.

⁽³⁾ Beta lactoglobulina, alfa lactoalbúmina y albúmina de suero.

⁽⁴⁾ Nitrógeno: amoniacal, urico, orotico, hipurico, indigo y tiocianinas.

⁽⁵⁾ Trazas de glucosa y galactosa.

⁽⁶⁾ Tiamina, lactoflavina, vit. B6, ac. pantoténico, biotina, ac. fólico, colina, vit. B12, inositol y ac. ascórbico.

⁽⁷⁾ Bióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno.

Fuente: Renner, 1987; Battistotti y col., 1985; Síntesis Lechera, 1989.

del uso generalizado de la pasteurización en los años 30's, la leche y los productos lácteos fueron el principal vehículo de transmisión de enfermedades. Entre las bacterias patógenas mas comunmente transmitidas por la leche cruda están: Salmonella sp, la cuál coloniza la ubre y ocasiona mastitis asintomática en el animal y enfermedades gastrointestinales en el humano (Flowers y col., 1992; Johnston, 1990), Listeria monocytogenes, que puede ocasionar infecciones en animales tales como "infección de los silos", pudiendo llegar a desechar de 2,000 a 20,000 CFU/ml de leche y en mastitis, donde puede llegar a presentar cuentas desde 1.4×10^6 hasta 5×10^6 células/ml de leche (Flowers y col., 1992; Roberts, 1990; Johnstons, 1990), Campylobacter sp, tiene como reservorios naturales la ubre y tracto gastrointestinal del ganado bovino, pero en cantidades mínimas (2 - 3 cel/ml de leche), pueden ocasionar gastroenteritis en el humano (Flowers y col., 1992; Johnstons, 1990), Yersinia enterocolitica, que es comensal del tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente y cuyas cepas patógenas pueden ocasionar yersiniosis en el hombre (Flowers y col., 1992; Roberts, 1990; Johnstons, 1990), Escherichia coli enteropatógena, que contamina la leche a través de materia fecal y además, puede ocasionar mastitis en el animal e infecciones gastrointestinales en el humano, principalmente en infantes (Flowers y col., 1992; Johnstons, 1990), Staphylococcus aureus ocasiona mastitis en el animal y en leche proveniente de animales sanos, se pueden detectar de 25 - 3,300 CFU/ml de leche, las cepas enterotoxigénicas

producen toxinas termoestables, que no se destruyen con la pasteurización, aún cuando la bacteria sí se destruye (Flowers y col., 1992; Roberts, 1990; Johnstons, 1990), Streptococcus agalactiae y Streptococcus zooepidemicus, reconocidas como bacterias productoras de mastitis bovina, desechándose en grandes cantidades en la leche de los animales infectados y está implicado en algunas infecciones humanas, principalmente en individuos que se encuentran inmunocomprometidos (Flowers y col., 1992), Corynebacterium diphtheriae, contaminación ocasionada por la presencia de ulceraciones superficiales de la ubre, o por medio del personal portador de la bacteria, que es la forma mas común de transmisión (Flowers y col., 1992), Coxiella burnetti, parásito obligado que puede infectar a los animales domésticos y propagarse a los humanos por medio de la leche o bien en forma indirecta, por medio de inhalación de desechos, ocasionando la enfermedad conocida como fiebre Q (Flowers y col., 1992), Brucella sp., la brucelosis continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial, pudiéndose encontrar cantidades que van desde 10,000 a 20,000 CFU/ ml de leche en animales aparentemente sanos, siendo el calostro la porción de la leche mas afectada, ya que pueden llegar a encontrarse hasta 200,000 CFU/ ml de leche en animales recién paridos o que han abortado. También pueden encontrarse otros microorganismos patógenos, tales como Pseudomona aeruginosa, Clostridium perfringes, Bacillus cereus, Mycobacterium bovis, Corynebacterium pseudotuberculosis, algunos virus y micotoxinas (Flowers

y col., 1992; Roberts, 1990). Contrario al resto de las bacterias, que pueden desarrollarse dentro del queso, Brucella no cuenta con ésta capacidad en forma apreciable, su aparente aumento dentro de la cuajada, se debe principalmente a que la mayor parte es atrapada dentro del coagulo y la cantidad mas pequeña se desecha en el suero de la leche (Auclair y col., 1981; Collins y Kennedy, 1987; Johnson y col., 1990a, Anónimo, 1990).

La leche que ha sido tratada (por pasteurización, ultrapasteurización o esterilización), es un producto seguro, la leche cruda de un animal sano, recién ordeñada presenta cuentas bacterianas muy bajas, entre las que se encuentran las bacterias lácticas, colipropiónicas, butíricas, proteolíticas y las patógenas, mismas que también se pueden adquirir de otros animales, del medio ambiente y del equipo de ordeña. Los productos lácteos preparados con leche sin pasteurizar, son mas fácilmente identificados como portadores de enfermedades, que los elaborados con leche que ha recibido algún tratamiento térmico (Auclair y col., 1981; Roberts, 1990; Anónimo, 1989 y Anónimo, 1990).

El Queso

Los antiguos productores de queso, eran muy cuidadosos con la elaboración del queso y su proceso era pasado de generación en generación, ya que estaba considerado como un regalo de los dioses (Anónimo, 1985). Los tipos de queso que eran mas populares fueron

adoptados - y adaptados- por los productores industriales, para satisfacer a las grandes masas de consumidores, mientras los quesos de elaboración casera o artesanal seguían produciéndose, pero a pequeña escala (Torres y Chandan, 1981; Battistotti y col. 1985).

Muchos de los métodos posteriores de acidificación y fermentación de la leche para producir otros productos destruyen o inhiben la mayoría de los organismos patógenos, pero otros organismos pueden sobrevivir, además se presenta la oportunidad para la reintroducción de microorganismos presentes en los ingredientes no tratados, con que se lleva a cabo la elaboración de los productos lácteos, como es el caso de los cuajos naturales, el proceso de elaboración cuando no se siguen las normas sanitarias mas elementales o del medio ambiente (Roberts, 1990).

Existen factores que contribuyen a la disminución de la contaminación de los quesos, para lograr productos saludables y seguros. La sal incorporada en la cuajada o en el queso (2 - 5%), se suma al pH ácido y contribuye a la formación de un ambiente hostil para los microorganismos patogénicos. La duración del proceso de maduración, produce una acción destructiva, cuya acción es dependiente del tiempo que dura la maduración, aún si se presenta un aumento en el pH, como resultado de la proteólisis de la cuajada. Para los quesos elaborados con leche sin tratar, la seguridad depende unicamente de la calidad higiénica de la leche, del nivel de producción, procesamiento, pH ácido, sal agregada y un pequeño período

de maduración. Además, la tecnología de la preparación debe mantener una regla, para los quesos frescos, la cuajada es mantenida entre 20 y 30°C durante la preparación, para los quesos que contienen humedad alrededor de 50% y cortos periodos de maduración, los cambios en la sobrevivencia de los microorganismos patogénicos es mayor que para los quesos tratados térmicamente (50°C/1 hora) y madurados (15-20°C/4-6 meses), donde el riesgo de transmitir infecciones no existe o es extremadamente pequeño (Auclair y col., 1981; Johnsons y col, 1990b).

Aspectos nutricionales del queso.

Proteínas. La mayoría de los constituyentes de la leche permanecen durante el coagulado, en la elaboración del queso, aunque en diferentes cantidades y proporciones; con la maduración de los quesos, muchos de los constituyentes producen cambios químicos, produciendo sustancias que determinan la acidez, sabor y aroma del producto terminado (Battistotti y col., 1985).

La importancia nutricional de los quesos se encuentra en su alto contenido de proteínas biológicamente disponibles, que varía entre 30 y 35%, en forma inversa al contenido de grasa. Se calcula que 100 g de un queso fresco provee de 30 - 40% de los requerimientos diarios de proteína de un adulto y 100 g de queso duro o madurado, proporciona de 40 - 50% de la proteína requerida diaria (Renner, 1987). La caseína es la proteína mas

importante de la leche, representa del 75 - 80% del total de proteínas de la leche, se considera que la caseína es la única proteína de la leche presente en el queso, que se transfiere en un 95%, el resto son totalmente solubles y forman parte de las proteínas del suero. El valor biológico de las proteínas del queso no se afecta por la acción de la renina o de otras enzimas activas durante el madurado o por la formación de ácido. Cuando se utiliza la ultrafiltración para concentrar la leche y elaborar el queso, hay un aumento en la materia seca del queso, ya que no hay producción de suero y las proteínas séricas se incorporan en el queso, por tanto, se aumenta el valor nutritivo de la proteína (Renner, 1987; Hansen y Carlson, 1986; Battistotti y col., 1985, Anónimo, 1989).

Carbohidratos. En muchos tipos de queso no existe o se encuentra en muy bajas concentraciones el carbohidrato presente en la leche, la lactosa (1-3 g/100 g), ya que la mayoría pasa al suero y la que permanece en la cuajada es parcialmente convertida a ácido láctico, durante la maduración. El queso usualmente contiene los dos isómeros de ácido láctico, L(+) y D(-). El isómero D(-) Acido láctico, varía en diferentes tipos de queso, el queso fresco tiene de 4 - 15% y los quesos maduros de 10-50%, lo que depende del tipo de coagulante empleado en la elaboración del queso. La cuajada formada por ácido láctico es usada para la elaboración de quesos blandos con sabor ácido (Muir, 1990; Renner, 1987; Hansen y Carlson, 1986; Anónimo, 1989).

Grasa. Existe gran cantidad de grasa en la leche, conocida bajo el nombre de lípidos, que incluyen ácidos grasos saturados e insaturados, en una relación tolerablemente saludable de 60% saturados y 40% insaturados (Hansen y Carlson, 1986). Durante la elaboración del queso, casi toda la grasa es precipitada dentro de la cuajada y por tanto, en el queso. Los quesos frescos presentan un contenido de grasa mayor del 12%, mientras que los quesos madurados, en general, contienen entre 20-30% de grasa (expresados en materia seca) y es preferido por los consumidores con un mayor contenido de grasa, ya que ésta ayuda significativamente en la calidad del sabor y el aroma (Renner, 1987). El contenido de colesterol es muy bajo en relación al contenido de grasa (0-100 mg/100 g), contribuyendo solo con un 3-4% de la ingesta total de colesterol. Se ha reportado que el coeficiente de digestibilidad de la grasa de diferentes variedades de queso es de 88-94% (Renner, 1987; Hansen y Carlson, 1986; Anónimo, 1989).

Minerales. En la leche están presentes una gran variedad de minerales, de los cuales, los más importantes son el calcio y el fósforo, 100 g de un queso blando proporciona del 30-40% de los requerimientos diarios de calcio y del 12-20% del requerimiento de fósforo. Además de aumentar el valor nutritivo del queso, esos minerales son muy importantes en el proceso de elaboración, ya que sin su presencia, la cuajada no se separaría del suero, debido a que son esenciales para precipitar las micelas de caseína (Anónimo, 1989; Renner, 1987).

Vitaminas. Las vitaminas liposolubles de la leche y que se encuentran presentes en el queso, dependen de su contenido de grasa. La mayor parte del contenido de vitamina A de la leche pasa al queso, siendo menor el contenido de vitaminas hidrosolubles, ya que son desechadas en el suero. Las concentraciones de vitamina dependen del tipo de coagulante empleado, ya que si se utilizan cultivos lácticos, la concentración de vitaminas aumenta grandemente, dependiendo del tiempo de maduración (Hansen y Carlson, 1986; Anónimo, 1989; Renner, 1987).

La Tecnología en la Elaboración del Queso.

El queso es un derivado sólido de la leche, producido por el proceso de la coagulación de la proteína de la leche (caseína) y el drenado de líquido o agua (suero). El cuajado de la leche y la separación del suero de los sólidos son los dos procesos fundamentales de la industria quesera, a los que se le suman diversos pasos para elaborar las variedades de queso existentes. La calidad del producto final está determinado por el proceso de elaboración (Fox, 1987; Kosikowski, 1982; Harper y Kristofferson, 1985; Battistotti y col., 1985).

- **Preparación de la leche.** Puede incluir calentamiento, pasteurización y la adición de cultivos de ácido láctico. En algunas variedades de queso, la leche puede llevar un tratamiento térmico ligero, calentándola a la temperatura a la cual la renina va a actuar, lo que da lugar a una cuajada

blanda, suave, con gran contenido de lactosa. En la producción casera tradicional, solo se usa la leche cruda, ya sea coagulada inmediatamente después de la ordeña o mantenida a temperatura ambiente (Kosikowski, 1982; Battistotti y col., 1985, Harper y Kristofferson, 1985). Actualmente, la leche cruda es usada principalmente para los quesos que tienen largos tiempos de maduración, mientras que para los quesos que tienen cortos períodos de maduración, se usa leche pasteurizada (Johnsons y col., 1990b).

- Coagulación. Es la base de la producción de quesos, provocando cambios físicos y químicos en los constituyentes de la leche, ocasionados por la separación del suero y la cuajada. La cuajada varía en sabor, composición y apariencia, dependiendo del cuajo o agente coagulante empleado y las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la coagulación. El método de coagulación puede realizarse con ácido o con enzimas, la coagulación láctica es llevada en forma natural en la leche (Kosikowski, 1982). Para inducir la coagulación enzimática, es necesaria la presencia de renina, la cual es encontrada en un extracto obtenido del estómago de animales lactantes, siendo ésta la que produce los mejores quesos, en cuanto a sabor, textura y producción. La renina así obtenida, contiene dos tipos de enzimas: Quimosina (75 - 95%) y pepsina bovina (5 - 25%) (Pszczola, 1989). La actividad coagulante es mayor en la quimosina, con muy poca descomposición de la caseína, por otro lado, la pepsina bovina tiene menor actividad proteolítica, evitando el debilitamiento de la red de proteínas

necesaria para atrapar la grasa de la leche y aumentar la producción de proteína (Kosikowski, 1982; Battistotti y col., 1985). Tradicionalmente la renina era preparada en las granjas o en las industrias queseras, usando el forro del estómago salado y seco de esos animales, remojado en agua o en suero, actualmente su producción se lleva a cabo en laboratorios industriales, lo que proporciona un producto cuya actividad enzimática e higiene están garantizados (Schirmeister, 1986). Se elaboran varias formas de renina: líquida, en polvo o sólida y algunos tipos de enzimas son preparadas artificialmente. El cuajado con ácido o renina difieren en sabor y textura, el primero es de consistencia desmoronable y porosa, el segundo es mas firme, densa, elástica e impermeable (Pszczola, 1989).

- Corte o quebrado de la cuajada. Algunas veces se incluye el cocimiento o escaldado de la cuajada y drenado del suero. Esto es acompañado de un prensado, moldeado o amasado para facilitar la pérdida del suero. Cuando la cuajada se corta en trozos tan pequeños que semejan granos de arroz, se producen quesos muy secos (parmesano) y en trozos mas grandes, se producen quesos con alto contenido de humedad. La cuajada destinada a formar quesos duros, con bajo contenido de humedad, se calienta entre 45-65° C, éste proceso ayuda a que se expela mayor cantidad de suero (Kosikowski, 1982; Battistitti y col., 1985; Harper y Kristofferson, 1985).

- Salado. Este proceso es seguido del drenado el suero, dependiendo del tipo y tamaño del queso, se hará antes o después de colocar la cuajada en

moldes, ésto ayuda a que haya mayor pérdida de suero y el proceso puede ser llevado a cabo por tres métodos: asperjando la sal dentro de la cuajada drenada; asperjándola sobre la superficie del queso o por inmersión del queso completo en salmuera. Aparte de mejorar el sabor del queso, la sal inhibe el desarrollo de ciertas bacterias que pueden ser dañinas al queso y causar descomposición, especialmente en la superficie. Además ayuda en el proceso de disolución de la caseína, en la formación de corteza, así como en la disminución de la actividad enzimática. El contenido de sal total generalmente fluctúa entre 1-3%, siendo menor en quesos suaves que en quesos duros (Kosikowski, 1982; Battistitti y col., 1985; Harper y Kristofferson, 1985).

- **Madurado.** Es un proceso de cambios físicos y químicos, a través de los cuales el queso adquiere su textura, aroma y sabor, está determinado por los constituyentes de la leche y a la acción bacteriológica y varían con el proceso de elaboración del queso y de la microflora presente (Kosikowski, 1982; Battistitti y col., 1985; Harper y Kristofferson, 1985).

Elaboración artesanal del queso.

En nuestro medio, el tipo de queso que mas se consume, por sus características económicas y organolépticas, es elaborado en forma casera en la mayoría de las granjas, a partir de leche cruda o "bronca". Debido a que no se encontró literatura que citara su procesamiento, se vió la

necesidad de acudir a presenciar su elaboración en el patio de una casa habitación, donde diariamente se produce éste alimento, el procesamiento se lleva a cabo en condiciones precarias de higiene (López, 1990).

El procedimiento general es como sigue:

La leche es mantenida a temperatura ambiente desde el lugar de la ordeña hasta el sitio donde se procesa, en un recipiente cubierto por una manta que sirvió de colador al momento de la ordeña. Al llegar a su destino, la leche es cuajada con renina, la cual se obtiene de las farmacias veterinarias en forma de pastillas o en su presentación líquida y es agregada a la leche en forma directa, a razón de 1:200 aproximadamente (250 ml de cuajo: 50 litros de leche), se agita manualmente y se reposa por 2 horas.

Al cabo de las dos horas, se corta la cuajada (siempre y cuando no este tierna), se deja reposar por unos quince minutos, para que haya una separación del suero, ya que la cuajada precipita. Transcurrido éste tiempo, se decanta la mayor cantidad del suero y el resto se separa por filtración en una manta, haciendo presión suavemente, para evitar la pérdida de cuajada. Una vez extraído el suero, se procede a hacer la molienda de la cuajada, así como el salado, que es al gusto. La cuajada se moldea en una manta, empleando una piedra como prensa, donde permanece por 2-3 horas, tiempo que depende de lo seco que se quiera el queso. En éste último proceso, también hay pérdida de suero, pero en menores cantidades y mas blanco y cremoso.

Debido al poco o nulo cuidado que se tiene en la elaboración del queso, éste constantemente está contaminado con diferentes tipos de microorganismos, que pueden provenir directamente del animal, en la leche, o bien contaminarse durante el proceso de elaboración. En algunas poblaciones y ranchos, es una práctica común hacer mezcla de leche de vaca y de cabra, la cuál no se somete a ningún tratamiento térmico antes de la elaboración del queso, tampoco se deja madurar el producto, por lo que generalmente se encuentran quesos en el comercio con un gran número de contaminantes bacterianos, mismos que proliferan fácilmente, ya que la costumbre de exposición al público de éstos alimentos es a temperatura ambiente (Peraza-Castro, 1987a; Anónimo, 1985; Armenta, 1992; Peralta, 1991).

Consumo de queso.

El queso es un alimento consumido a nivel mundial, producido a partir de leche de tres especies de mamíferos principalmente, como son, vaca, borrega y cabra, ya sea en forma individual o bien mezclada. Es un excelente producto para mejorar la dieta diaria, sobre todo en la población infantil, 100 grs. de un buen queso maduro, aportan a un niño de 5 años más de la mitad de la energía y proteína de un día (Peraza-Castro, 1987a).

En México, existe un bajo consumo de queso, aproximadamente 5 Kg. per capita anuales, comparado con otros países que presentan un alto

consumo, como Francia con 17.8 Kg., Italia con 13.8 Kg., Israel con 14.8 Kg. y Estados Unidos con 10 Kg. (Higuera-Ciapara, 1987; Peraza Castro, 1987a).

En nuestro país, existe una preferencia por el consumo de queso fresco, cuya elaboración es a partir de leche cruda y sin llevar a cabo una maduración previa al consumo. En Sonora, el queso fresco es un producto muy popular, consumiéndose anualmente un promedio de 4.6 Kg/persona (Ballesteros, 1989), situación que no sería grave, si su elaboración fuera a partir de leche proveniente de animales sanos y con los medios higiénicos adecuados, lo que lo hace un producto sumamente saludable, situaciones que desafortunadamente no son las comunes, ya que no hay un manejo adecuado, la cuál se ve sometida a la acción ambiental, las vacas sanas no se separan de las enfermas, la leche no recibe ningún tratamiento térmico para la elaboración del queso, cuyo proceso es a nivel artesanal y en condiciones sanitarias inadecuadas, tanto del artesano como del medio ambiente. A pesar de que en México existe una regulación sanitaria para la elaboración de los diferentes tipos de queso, los productores no cumplen con los requisitos (Diario Oficial, 1988).

Contaminación del queso.

El queso elaborado con leche cruda y con malas condiciones higiénicas, puede llegar a ser un vehículo para la transmisión de diferentes tipos de bacterias patógenas para el hombre, las cuales pueden estar

presentes en la leche o bien por medio de contaminación posterior, tales como Staphylococcus aureus, Salmonella sp., Escherichia coli enteropatógena, y otras Enterobacterias, las cuáles son las especies mas comunmente involucradas en intoxicaciones alimentarias causadas por queso, donde también se han encontrado algunos Enterococos, pero su papel no ha sido claramente demostrado, lo mismo que en el caso de Clostridium botulinum (Flowers y col., 1992; Auclair y col., 1981). En los laboratorios del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., se han llevado a cabo varios estudios para determinar la calidad sanitaria de quesos frescos, encontrándose cuentas bacterianas elevadas, que rebasan las normas de calidad de la Ley General de Salud, en su Diario Oficial de la Federación (1988), predominando la presencia de bacterias contaminantes de piel y mucosa, como Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Enterococos y bacterias coliformes, además de las provenientes de los animales y del medio ambiente (Peralta, 1991; Armenta, 1992). En la literatura, se ha reportado la transmisión de Brucella sp por medio de queso fresco que no ha recibido ningún tratamiento térmico (Auclair y col., 1981; Peraza-Castro 1987b; Flowers, 1992; Eckman, 1975).

Mastitis.

Entre las infecciones mas comúnmente transmitidas a los humanos por medio de la leche y queso, están aquellas que se encuentran colonizando

la ubre de los mamíferos, ya sea por que está ocasionando una mastitis o bien, por que sea el habitat normal del microorganismo (Hamman, 1991). Los patógenos que afectan la ubre son importantes porque pueden excretarse en la leche. La mastitis puede ser aguda, con un alto grado de morbilidad y mortalidad; subaguda, en la cual se presentan algunos cambios en la ubre, con coagulación y gran número de leucocitos en la leche; crónica, que se presenta después de una infección aguda, pueden observarse cambios fuertes en la ubre y una gran cantidad de cambios en la leche y subclínica, donde no se observa ningún cambio en ubre y leche, pudiendo pasar desapercibida (Hamman, 1991; Johnston, 1990).

Brucella en queso.

Debido a que el sitio de predilección de las especies de Brucella en los mamíferos son ubre y nódulos linfáticos supramamarios, en animales infectados; se ha estimado que una vez que la infección ha cedido en los animales, un 15 - 35% excreta números detectables de Brucella en su leche, incluyendo a los animales que han abortado (Corner y col., 1987; Kaplan y col., 1962; Meador y Deyoe, 1989). La excreción de la bacteria es variable, pero es mayor los primeros días después de la parición o del aborto, pudiéndose encontrar hasta 200,000 organismos de Brucella/ml en el calostro, disminuyendo hasta 10,000 - 20,000/ml y pasado un mes baja hasta 500 bacterias/ml, cuentas que pueden durar hasta por un año. La infección

de la ubre ocasionada por Brucella raramente causa mastitis clínica y no se observan cambios en la apariencia y sabor de la leche o en el contenido de cloruros y catalasa. En ocasiones la ubre produce una secreción sanguinolenta que contiene grandes números de microorganismos (Kaplan y col., 1962, Flowers, 1992).

La presencia de Brucella en leche cruda provoca que se pueda encontrar en productos lácteos, principalmente si son elaborados sin tratamiento térmico. El cuajado de la leche inhibe los organismos de Brucella, pero no los elimina completamente (Kaplan y col., 1962). Como se ha reportado que la sobrevivencia de Brucella presenta diferencias de acuerdo a las propiedades físicas y químicas del queso, se han desarrollado trabajos para determinar dicho comportamiento. En 1961, Vershilova y colaboradores (Kaplan, 1962), encontraron que en leche acidificada, a pH de 4-5 y con 125-200° de acidez y almacenada entre 11 - 14° C, Brucella melitensis permanecía viable hasta por 15 días. En koumiss (leche equina cuajada), con 120 - 140° de acidez y 3.5 - 3.7% de alcohol, el organismo permanece viable por mas de 3 días. En 1977, Salem y col. probaron la sobrevivencia de Brucella abortus en queso blanco, elaborado con una mezcla de leche de búfalo y de vaca, la cual se infectó con un cultivo de B. abortus y se prepararon los tres tipos de queso mas consumidos en Egipto, Domiati, Tallaga y Kareish. El período de sobrevivencia de Brucella a temperatura ambiente fué de 12 días en queso Domiati, 16 días en queso

Tallaga y 6 días en queso Kareish, mientras que el queso almacenado en el refrigerador (2 - 4° C), presentó sobrevivencia de 24, 32 y 8 días en el mismo orden, observándose que al haber un aumento en la acidez (porcentaje de ácido láctico), la sobrevivencia disminuye hasta hacerse imposible obtenerla por medios bacteriológicos o por inoculación animal, del mismo modo, observaron que el porcentaje de sal, contenido de grasa y la temperatura de almacenamiento, pueden afectar la sobrevivencia del organismo en el queso. En el queso Kareish, los organismos sobrevivieron el menor período de tiempo, lo que puede deberse al bajo contenido de grasa, lo que protege los organismos de Brucella. Eckman (1975), reportó tres casos de brucelosis en personas que habían consumido queso fresco adquirido en México. De los hemocultivos de los pacientes se aisló B. melitensis. En 1985, Cosseddu y Pisanu reportan 45 días de sobrevivencia de B. melitensis biotipo 2 en queso fresco de cabra, elaborado con leche naturalmente infectada.

La crema de la leche infectada normalmente presenta mayor contaminación que la leche, de tal forma, que la bacteria puede ser recuperada más fácilmente del sedimento. Se ha publicado la sobrevivencia de Brucella en varios productos lácteos, presentándose mucha variación en el período de sobrevivencia, debido a una gran cantidad de variables, incluyendo métodos de preparación de los productos, pero en general, se puede concluir que la crema y mantequilla preparadas con leche cruda sin fermentar y sin pasteurizar y los quesos frescos son los más dañinos, desde

el punto de vista de la infección (Alton y col., 1975; Kaplan, 1962). Los productos lácteos que requieren de cuajado y maduración por largos períodos de tiempo, son los que presentan menores cuentas de la bacteria, aún por períodos de 180 días, por lo que para obtener un producto absolutamente seguro es necesaria la pasteurización (Alton, 1987; Kaplan y col., 1962).

Los organismos de Brucella son menos resistentes al calentamiento que los organismos de la tuberculosis, y se ha reportado que son fácilmente destruidos por tratamiento térmico. En 1954 Kronenwett y col. determinaron las curvas de muerte térmica de Brucella abortus quedaban por debajo de las curvas de pasteurización recomendadas por el Departamento de Salud de Estados Unidos de América, dando un margen de seguridad de 12 segundos a la temperatura de 71.7° C utilizados en la pasteurización comercial (Johnsons y col., 1990c, Kronenwett y col., 1954).

Además del tratamiento térmico, cuajado y maduración de los productos lácteos, los organismos de Brucella se pueden eliminar, especialmente si los productos se almacenan por varios meses antes de consumirlos (Kaplan y col., 1962).

Epidemiología de la brucelosis

Nivel mundial. Desde los inicios del presente siglo, la incidencia de brucelosis ha ido en aumento gradual, principalmente en las zonas del

Mediterráneo, de donde fué expandiéndose hacia los países europeos y sudafricanos, siendo Italia el más afectado del mundo (Ortona y col., 1988), siguiéndole Grecia, Turquía, Argel, Túnez y Egipto, donde se estableció la infección en forma endémica a partir de 1925 (Abdussalam y Fein, 1976; Ruíz-Castañeda, 1986). En España, la enfermedad se confirma en 1905, pero se supone que se había establecido desde el Siglo XVI, siendo en Málaga, Cádiz, Murcia y Toledo donde primeramente se reconoce un elevado porcentaje de la infección en el ganado caprino. En 1930 se importaron a México, procedentes de Murcia, varios lotes de cabras con propósitos de mejoramiento genético y se observó un incremento de la infección en el país (Ruíz-Castañeda, 1986, Abdussalam y Fein, 1976).

En los países Nórdicos, se padecen mas casos de B. abortus que de B. melitensis, mientras que en la Europa Central se han presentado ambos tipos en igual proporción, de igual forma, ha ocurrido en la región del Nilo, mientras que en Rusia, la infección por B. melitensis parece ser la más frecuente, principalmente en la época de mayor incidencia de aborto en borregas y cabras (NRC, 1977; Abdussalam y Reid, 1976; Kambal y col., 1983).

En los Estados Unidos, se cree que se presenta por primera vez en 1885, cuando se importan cabras de la Isla de Malta, lo que se demostró hasta 1905, cuando se aisló B. abortus y posteriormente, Huddleson aisló B. suis, actualmente se tiene una predominancia de B. abortus sobre B.

melitensis y B. suis, siendo en las zonas rurales y poblaciones pequeñas donde se presenta la mayoría de los casos, mientras que en las grandes ciudades, donde se lleva un estricto control de la leche y sus derivados, la infección por B. abortus ha disminuído en gran proporción y se le ha relacionado con infecciones adquiridas en el campo o en viajes a países donde la enfermedad es endémica (Eckmann, 1975). La infección provocada por B. suis y B. melitensis es más frecuente en las grandes ciudades, sobre todo en los trabajadores de rastro y de la industria empacadora de carne. Además, la infección provocada por B. melitensis no es frecuente en Estados Unidos, ya que rara vez se emplean los productos lácteos y cárnicos de cabra (Abdussalam y Fein, 1976; Wise, 1980; NRC, 1977).

En el resto del Continente Americano, la brucelosis ha existido desde tiempos de la conquista, ya que según Huddleson (Ruíz-Castañeda, 1986), fueron los conquistadores quienes trajeron las primeras cabras infectadas, siendo Argentina y México los países que han presentado la mayor incidencia de brucelosis humana, aún en la actualidad (García-Carrillo y col., 1985; Alarcón y col., 1985; Abdussalam y Fein, 1976).

En México. En 1939, en el I Congreso Nacional de la Brucelosis, llevado a cabo en Torreón, Coahuila, López-Portillo (Ruíz-Castañeda, 1986) reportó que en todos los estados de la República se presentaban problemas de brucelosis, siendo los mas afectados Coahuila, Chihuahua, Querétaro, Guanajuato, Nuevo León y Distrito Federal (Herrera-Alberu, 1984). En un

reporte de INDRE (1992), se reportaron, además de los estados anteriormente mencionados, Zacatecas, Michoacán y San Luis Potosí como estados donde la brucelosis ha hecho su aparición en los últimos años. Cabe señalar, además que en algunos estados como Sonora, Durango, Sinaloa, Tamaulipas y Puebla que antiguamente ocuparon los últimos lugares, actualmente se encuentran entre los primeros y sus tasas de frecuencia van aumentando (Teclaw y col., 1985; Salman y Meyer, 1984). Entre los reportes encontrados acerca de la brucelosis humana en México, se reportó más comunmente la presencia de B. melitensis, con respecto a B. abortus en diferentes Estados de la República y solo 1 caso de B. suis en humanos y 3 en animales. Para las tres especies, el biotipo reportado es el 1 (INDRE, 1992, Luna y col., 1989; Ramírez y col., 1989).

En Sonora. La brucelosis presenta los primeros antecedentes hacia el año de 1977 en Etchojoa, Son. y a partir de entonces, ésta se ha venido propagando y aumentando su incidencia en forma alarmante, lo cual es más alarmante entre la población humana.

En 1982, el Centro de Investigaciones Pecuarías del Estado de Sonora (C.I.P.E.S.), realizó un estudio titulado "Prevalencia de Brucelosis en Bovinos en el Estado de Sonora", cuyo objetivo era conocer el número de casos de bovinos positivos a B. abortus en el área de influencia del CIPES. Para éste estudio se trabajó con 944 sueros de bovinos productores de carne y leche de los municipios de Carbó, Costa de Hermosillo, Cucurpe, Arizpe, Ures,

Alamos, Cajeme, Huasabas, Granados y Huatabampo. Las determinaciones se llevaron a cabo por la técnica de aglutinación rápida en placa, aglutinación lenta en tubo y la prueba de tarjeta o de antígeno tamponado. Los municipios que presentaron mayor incidencia de positividad fué el de Cajeme con 16.6% (108 sueros), Ures con 3% (176 sueros) Carbó 1.08% (320 sueros). En Cajeme, el mayor número de animales muestreados fueron productores de leche, lo que indica que en ese lugar existe una mayor posibilidad de transmitir la enfermedad al hombre mediante el consumo de leche y productos lácteos provenientes de animales enfermos, posibilidad que aumenta cuando la leche no es pasteurizada (CIPES, 1982).

En 1987, se determinó el comportamiento de la brucelosis en el Estado de Sonora, por la Secretaría de Salud Pública y los Servicios Médicos de Sonora, realizando un estudio epidemiológico por medio de un análisis retrospectivo de 1980 a 1987, en todo el Estado de Sonora, ya que desde el año de 1977 se habían estado reportando en forma sistemática casos de brucelosis en el Sur del Estado, disparándose su incidencia a partir del año de 1980 (S.S.A., 1987). A partir de 1987, se ha elaborado un seguimiento de los casos, por el Departamento de Epidemiología de Servicios Médicos de Sonora (Comunicación personal) y los resultados pueden observarse en el Cuadro 2, donde se muestra el comportamiento epidemiológico en el Estado de Sonora, del año de 1980 a 1993. En la mayoría de los casos los pacientes refirieron ser consumidores habituales de lácteos de vaca y cabra.

Cuadro 2. Comportamiento epidemiológico de la brucelosis en el Estado de Sonora, de 1980-1993.

AÑO	CASOS	TAZA x 100,000 HABITANTES
1980	93	6.4
1981	71	4.7
1982	134	8.7
1983	109	6.7
1984	149	9.2
1985	293	17.7
1986	720	38.0
1987	427	21.7
1988	303	14.9
1989	514	24.9
1990	411	18.7
1991	275	14.7
1992	240	12.3
1993	239	12.4

Fuente: Departamento de Epidemiología de los Servicios Médicos de Sonora (1994).

Brucella

Antecedentes históricos.

En 1887, Bruce (Ruiz-Castañeda, 1986; Plommet, 1987), estudiando la brucelosis humana (fiebre de malta, fiebre ondulante, fiebre del mediterráneo o melitococcia), descubrió en el bazo de los cadáveres un microorganismo que llamó Micrococcus melitensis. En 1897, Bang (Ruiz-Castañeda, 1986; Freeman, 1974), aisló el microorganismo responsable del aborto contagioso en el ganado (también llamada enfermedad de Bang) y lo llamó Bacillus abortus. En 1914, Traum (Freeman, 1974) aisló una bacteria de marranas que habían expulsado el feto prematuramente, del cuál ahora se conoce que está muy relacionado con el bacilo de Bang y el de la fiebre ondulante. Estas enfermedades, se estudiaron en forma independiente, y no se relacionaron hasta los trabajos llevados a cabo por Evans en 1918 (Ruiz-Castañeda, 1986), cuando se demostró su similitud en cuanto a morfología celular, cultivos y propiedades bioquímicas y serológicas, además de que esos dos microorganismos tenían la capacidad de producir abortos en animales y fiebre ondulante en el hombre, sugiriendo que éstas bacterias deberían encontrarse dentro del género Bacterium. En 1920, Meyer y Shaw, retomando las características de Brucella abortus y Brucella melitensis y para conmemorar el trabajo llevado a cabo por David Bruce, las separaron en un nuevo género Brucella (Plommet, 1987; Freeman, 1974; Meyer, 1990).

Descripción del Género Brucella.

El género Brucella son pequeños cocobacilos o bacilos cortos, que miden de 0.5 - 0.7 μ de ancho por 0.6 - 1.5 μ de largo, gram negativos, pleomórficos, no móviles. Normalmente no produce arreglos celulares, pudiéndose encontrar en forma aislada, en pares y en ocasiones formando pequeñas cadenas. Son aerobios estrictos, pero algunas especies requieren atmósferas con 5-10% de CO₂ para el crecimiento en aislamiento primario. Son organismos quimio-organotróficos y presentan necesidades nutricionales complejas, que incluyen aminoácidos, tiamina, nicotinamida, biotina y magnesio (Brinley-Morgan y McCullough, 1975). Algunas especies requieren de suero u otros coloides para su crecimiento. La temperatura óptima de crecimiento para las especies de Brucella es de 37° C, con un rango entre 20-40° C y un pH de 6.6 - 7.4. Al igual que la mayoría de las bacterias gram negativas, las especies de Brucella están dotadas de una envoltura celular, constituida de una membrana citoplásmica y una membrana externa, separadas por un espacio periplásmico. En la envoltura celular, se encuentran componentes que les van a proporcionar características diferenciales (Moriyón y col., 1987; Meador y Deyoe, 1989; Verger, y col., 1987).

Taxonomía del Género Brucella.

Las propiedades fenotípicas para caracterizar las especies de Brucella, se muestran en el Cuadro 3. Estas características y la adaptación a varios hospederos se han utilizado para separar al género en las 6 especies ahora reconocidas. Después

Cuadro 3. Características diferenciales de las especies y biotipos de *Brucella*.

Especie/biotipo	Req. de CO ₂	Prod. H ₂ S	Actividad de Ureasa	Oxidasa	Catalasa	Aglutinación ¹			Crecimiento en colorantes ²							
						A	M	R	Acr.	Tionina a	Tionina b	Tionina c	Azül de Tionina	Safranina	Fucsina b	Fucsina c
1	±	+	15 min.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	+	+	45 min.	+	+	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
3	±	+	1-2 h.	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
4	±	+	1 h.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5	-	-	1 h.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
6	-	±	1-2 h.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
7	-	±	2 h.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
8	+	-	1-2 h.	+	+	+	-	-	-	-	nr	nr	nr	nr	nr	nr
9	±	+	3 h.	+	+	+	-	-	-	-	nr	nr	nr	nr	nr	nr
<i>Brucella melitensis</i> 1	-	-	4 h.	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	15 min.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	7 h.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
1	-	-	15 min.	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	15 min.	+	+	+	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-
3	-	-	15 min.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	15 min.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella ovis</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Brucella canis</i>	-	-	15 min.	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	±
<i>Brucella neotomae</i>	-	-	15 min.	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Freeman, 1974; S.S.A., 1987; Ruiz-Castañeda, 1986; Alton y col. 1975; WHO, 1986.

¹ Antisueros monovalentes A, B y M.

² Concentraciones: a 1:25,000; b 1:50,000; c 1:100,000.

nr No reportado.

de 43 años de haber aceptado el género Brucella, con sus dos especies iniciales, se incorporó una tercera, Brucella suis y algunos biotipos, acerca de éstos últimos, se ha presentado cierta controversia, principalmente al tratar de nombrar y numerar los biotipos, como si éstos fueran cepas transicionales, y/o aberrantes o atípicas de Brucella (Meyer, 1990; Ficht y col., 1990). A partir de 1966 se adicionaron tres nuevas especies, Brucella neotomae, Brucella ovis y Brucella canis. Con el advenimiento de las técnicas moleculares se encontró que la homología genética entre las especies de Brucella era mayor del 90% y un tamaño del genoma de 2.6×10^8 pares de bases (Alarcón y col., 1987; Freeman, 1974; Verger y col., 1987; Ruíz-Castañeda, 1986; Verger y Plommet, 1985; Corbel, 1985).

Diferencias entre las especies.

1. Número de Biotipos. Brucella abortus es reportada con ocho biotipos aceptados, Brucella suis con cuatro biotipos reconocidos, Brucella melitensis con tres serotipos. A las otras tres especies no se les ha encontrado ningún biotipo ni serotipo. Se consideran las especies de Brucella abortus genéticamente inestables, con respecto al número de biotipos, mientras que los biotipos conocidos de las otras especies, son relativamente estables. La especie patógena para el hombre son Brucella abortus, Brucella melitensis, Brucella suis y Brucella ovis; la mas comunmente implicada en formas severas y crónicas es Brucella melitensis. Las especies clásicas del género se consideran Brucella melitensis, abortus y suis (Meyer, 1990; Ruíz-Castañeda, 1986; Verger y col., 1985).

2. Morfología Colonial. En el aislamiento primario las especies clásicas y Brucella neotomae son lisas, mientras que Brucella ovis y Brucella canis son mucoides. Las especies de Brucella, están expuestas a variaciones morfológicas de sus colonias, así como de las características bioquímicas y fisiológicas. Entre las variantes que pueden presentarse está el tipo liso ("S") y el rugoso ("R"), con tipos intermedios y tipos mucoides. Las formas "R" son circulares, convexas, opacas, de aspecto granular y color amarillo rojizo en el centro, con borde azulado. Las colonias mucoides son de aspecto opaco, consistencia mucoide con bordes ligeramente levantados, a veces con una depresión anular, otras con prolongaciones triangulares que destacan sobre fondo azulado de la misma colonia. Se conocen algunas de las causas de la disociación, se ha encontrado que a partir del cultivo "S" se provoca con relativa rapidéz en medio líquido y con incubación prolongada; con el envejecimiento de cultivos hay acumulación de metabolitos, principalmente alanina, que va a suspender el desarrollo de cepas "S" y favorece la aparición de las variantes. De la misma forma, se ha llegado a determinar que el suero de animales susceptibles a la Brucella, presenta un efecto protector en la disociación de las variantes "S", efecto que se ha relacionado a sustancias proteicas asociadas a las globulinas del suero (Meyer, 1990; Corbel, 1985; Moreira-Jacob, 1970). Respecto a la virulencia de todas las cepas, se ha demostrado que las variantes "S" conservan su virulencia, mientras que las variantes "R" van siendo cada vez menos agresivas y las cepas "M" son avirulentas (Ruíz-Castañeda, 1986).

3. Comportamiento Metabólico. Cada una de las especies tienen un patrón característico de oxidación de un promedio de 14 aminoácidos y carbohidratos. Existe una discrepancia respecto a la fermentación de los azúcares por las especies de Brucella, ya que una de las características del género es la de alcalinizar los medios en que se desarrollan, debido quizá a la desintegración de proteínas, lo que oculta una acidéz resultante de la descomposición del azúcar, éste fenómeno también puede deberse a la presencia de la enzima ureasa entre algunas de las especies (Cuadro 3, pag. 31) (Meyer, 1990; Moreira-Jacob, 1970).

4. Crecimiento en Presencia de Colorantes. Algunas especies son resistentes a diferentes concentraciones de colorantes de safranina, fucsina básica, tionina y azul de tionina; aún cuando éstos colorantes no son de origen natural, son un buen indicador para llevar a cabo la determinación de los biotipos (Cuadro 3, pag. 31) (Moreira-Jacob, 1970).

5. Requerimiento Atmosférico y/o de Suero. Las brucelas requieren oxígeno como fuente de energía para su desarrollo, mientras que algunas especies del género presentan diferente necesidad de CO₂ y suero sanguíneo durante el aislamiento primario, principalmente para algunos biotipos de Brucella abortus y para Brucella ovis (Meyer, 1990). Se ha sugerido que el CO₂ es utilizado en la construcción de proteínas por las cepas que así lo requieren y cuyo crecimiento se ve acelerado si la atmósfera no es totalmente anaeróbica, sino que se encuentra entre un 5 - 10% (Cuadro 3, pag. 31) (Ruíz-Castañeda, 1986).

6. Susceptibilidad a los Bacteriófagos. Algunos bacteriófagos son capaces de causar lisis en las cepas de Brucella, siendo de gran utilidad si se desea diferenciar las biovariedades 4 y 9 de B. abortus y B. melitensis. La técnica empleada es la RTD (Routine Test Dilution) y el bacteriófago mas comunmente empleado anteriormente era el Tbilisi, pero actualmente existen muchos bacteriófagos bien clasificados, cuya actividad no se restringe a cepas en fase lisa, sino que también existen fagos para cepas rugosas (Meyer, 1990; Gargani y Picetti, 1985).

7. Tipificación con Antisueros. La tipificación con antisueros se lleva a cabo para confirmar la especie, después de realizadas las pruebas bioquímicas y el crecimiento en colorantes. Se emplean sueros poli o monoespecíficos, los sueros monoespecíficos son el A y el M y cuando se sospecha de una cepa rugosa (B. canis), se usa el R. Las reacciones presentadas de los biotipos de Brucella dependerán del antígeno dominante celular que posea cada una de las especie (Cuadro 3, pag. 31) (Dubray, 1987).

8. Comportamiento Biológico en la Naturaleza. Cada una de las seis especies está asociada con diferente reservorio animal:

Brucella abortus, hospedero principal, ganado bovino.

Brucella melitensis, hospedero principal, ganado caprino.

Brucella suis, hospedero principal, porcinos.

Brucella ovis, hospedero principal, ganado lanar.

Brucella canis, hospedero principal, el perro.

Brucella neotomae, hospedero principal, el ratón.

Las tres primeras especies son las más comúnmente implicadas en los casos de brucelosis humana y no presentan un reservorio tan restringido como las tres últimas. No se han encontrado reportes de brucelosis humana ocasionada por Brucella suis biotipo 2, Brucella neotomae, Brucella canis o Brucella abortus biotipo 5 (Meyer, 1990; Ruíz-Castañeda, 1986; Verger y Grayon, 1985). En México, se ha reportado B. melitensis biotipo 1 como endémica en las regiones donde se presenta mayor incidencia de brucelosis humana y animal (Luna y col., 1989).

Ocasionalmente se presentan aislamientos de Brucella con características atípicas, que no concuerdan con ninguno de los esquemas de clasificación característicos, ya que difieren en una o más características para los biovars definidos. Desde el punto de vista de la infección humana, el conocimiento de la disociación en las brucelas es muy importante, ya que pueden presentarse cuadros típicos de brucelosis con reacción de aglutinación negativa si la bacteria es una variante con características antigénicas alteradas, como parece ocurrir con las brucelas antigénicamente alteradas, antiguamente llamadas para-melitensis, para-abortus y para-suis, que son variantes "R" de las cepas tipo (Ruíz-Castañeda, 1986).

Se ha sugerido la presencia de un nuevo biotipo de Brucella abortus, e incluso ha sido motivo de discusión por el subcomité sobre la taxonomía de Brucella, llegando a la conclusión de que el número de aislamientos aún es pequeño como para aceptar la presencia de un nuevo biovar. Las características de ésta cepa atípica son muy parecidas a las presentadas por B. abortus biotipos 2 y 4, de acuerdo a estudios metabólicos oxidativos (Ewalt y Forbes, 1987).

Resistencia al medio ambiente.

En condiciones apropiadas, las especies de Brucella presentan una alta resistencia al medio ambiente. En el Cuadro 4 se pueden observar los días promedio de sobrevivencia en muestras ambientales y de alimentos. Comparando la sobrevivencia de Brucella con patógenos no esporulados, se encontrará que sobreviven al proceso de desecación si se encuentran en medios que presentan un alto contenido de proteínas y en sitios secos y sombreados, es importante tomar en cuenta el peligro de abandonar el material infeccioso en establos y chiqueros, que ocasionaría la diseminación del aborto contagioso e infección entre la población humana (Ruíz-Castañeda, 1975; Alton y col. 1975; Kaplan y col. 1962).

Componentes Antigénicos y Determinantes de Virulencia + **del Género Brucella.**

La estructura celular del género Brucella presenta una envoltura celular característica de las bacterias gram negativas: una envoltura externa, membrana plasmática interna, un espacio periplásmico, una capa de peptidoglican y la membrana externa, siendo algunas de éstas estructuras determinantes de virulencia. La especificidad celular puede ser el resultado de la expresión diferencial de los componentes que contribuyen a la virulencia, los cuáles residen en el genoma y pueden ser respuestas adaptativas a las condiciones existentes en el hospedero; la membrana externa tiene funciones físicas y funcionales, además es la estructura que primeramente está en contacto con el sistema inmune del huésped infectado (Martin

Cuadro 4. Sobrevivencia de *Brucella sp* en muestras ambientales y de alimentos.

Medio Ambiente	Tiempo de Sobrevivencia
Agua potable estéril 25° C	10 días
8° C	57 "
Agua de mar estéril	25 "
Tierra seca	43 "
Tierra húmeda	72 "
Estiércol (sin esterilizar)	20 "
Estiércol 8° C	385 "
Congelación	824 "
Telas	5-78 "
Expuesta al sol	Pocas horas
Productos Cárnicos	
Carne refrigerada	21 días
Salchichas	21 "
Jamón natural	21 "
Jamón ahumado	0
Productos Lácteos	
Leche estéril	17 días
Leche sin pasteurizar 20° C	5-48 horas
0° C	18 meses
Quesos	1-12 semanas
Crema 4° C	4-6 semanas
Helado 0° C	30 días
Mantequilla 8° C	142 días

Fuente: INDRE, 1991.

y Hancock, 1990). La membrana citoplásmica, peptidoglican y algunas proteínas de membrana externa, son muy parecidas a las de Enterobacterias, sin embargo, a diferencia de otros patógenos gram negativos, Brucella no exhibe estructuras complejas, tales como pilis o fimbrias ni material capsular (Moriyon y col., 1987). La membrana externa solo presenta dos componentes que han sido identificados como factores de virulencia, los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana externa (Martín y Hancock, 1990; Moriyon y col., 1987). Las envolturas celulares son muy resistentes a la acción de algunos detergentes, como los cationes quelantes divalentes del ácido etilen diamino tetracético (EDTA), a policationes como la polimixina B, proteólisis enzimática y a la digestión con lisozima. El EDTA no potencializa la acción de Triton X-100 o de zwitteriones (zwittergentes) sobre las micelas de Lipopolisacárido (LPS), ni tampoco pueden actuar ambos en forma independiente para remover los LPS de B. melitensis y de B. abortus (Moriyon y col., 1987; Moriyon y Berman, 1982; Smith y Eicht, 1990; Martín y Hancock, 1990, Perry y Bundle, 1990,).

Lipopolisacárido (LPS). Es el factor de virulencia mas fuertemente expresado, originando cepas rugosas o lisas. Las cepas rugosas carecen de lipopolisacáridos y son de virulencia reducida, en contraste con las cepas lisas que presentan gran cantidad del lipopolisacárido y que son fuertemente virulentas (Martín y Hancock, 1990). El lipopolisacárido se considera la molécula mas abundante dentro de la estructura celular de la bacteria, con un 2.5 - 3.0% del peso seco bacteriano, compuesta de una cadena polisacárida o antígeno "O" específico, también llamado

hapteno nativo, un polisacárido central y el lípido A (Bundle y col., 1987). La molécula está expuesta hacia afuera de la membrana externa, lo que facilita la inducción de anticuerpos (Ac) dirigidos contra el antígeno (Ag) "O" y el polisacárido central, los cuales juegan un papel muy importante en el diagnóstico de la brucelosis y en la identificación serológica de las especies, por la presencia de los Ag A y M, característica empleada en la caracterización diferencial de las especies (Perry y Bundle, 1990). Las cepas lisas de Brucella abortus, y Brucella melitensis presentan los dos antígenos, pero en diferentes cantidades, de tal forma que pueden presentarse 3 tipos de cepas, por medio de la aglutinación, A+M-, A-M+ y A+M+, dependiendo de la distribución del tipo de LPS (Dubray y Limmel, 1987). El aumento en la sobrevivencia de las cepas lisas comparadas con las cepas avirulentas rugosas en los macrófagos sugieren que los LPS tienen un papel muy importante en la fagocitosis y sobrevivencia, se ha establecido que las cepas rugosas presentan una incapacidad para establecer una relación parasítica estable con los macrófagos, ya que no son resistentes a los mecanismos oxidativos del sistema mieloperoxidasa, en cambio, las cepas lisas presentan una gran habilidad para resistir la actividad del complemento. El suero bovino normal tiene la capacidad de destruir a Brucella por medio de la activación del complemento. Este proceso es bloqueado por anticuerpos IgG₁ e IgG₂, la producción de los cuales puede aumentar la fagocitosis de la Brucella. Por otro lado, Brucella se ha adaptado a crecer dentro de los macrófagos, capacidad que le ayuda a burlar la acción bactericida normal del suero (Corbeil y col., 1988; Smith y Ficht, 1990).

Hapteno Nativo (NH). Son polisacáridos relacionados serológicamente a los antígenos A y M, que han sido descritos como productos de B. abortus y B. melitensis, debido a la composición química y su estructura, se ha sugerido que son artefactos derivados de una molécula de LPS obtenido por hidrólisis bajo condiciones de extracción del polisacárido B (Perry y Bundle, 1990; Zygmunt y col., 1988).

Polisacárido B (Poli B). El polisacárido B (PB) es un carbohidrato cíclico de bajo peso molecular, con 17 - 24 residuos de glucosa presente en todas las especies de Brucella y es de gran utilidad para distinguir animales infectados de animales vacunados, pero una vez purificado, no presenta características antigénicas, sobre todo si está completamente libre del hapteno nativo. Puede obtenerse de B. abortus y B. melitensis (Dubray, 1987; INDRE, 1991, Perry y Bundle, 1990).

Proteínas de la Membrana Externa.

La caracterización de las proteínas de la membrana externa como factores de virulencia han representado una serie de problemas, ya que es muy difícil identificar las variantes que han perdido su expresión, así como la presencia de LPS, los que interfieren en la migración de las proteínas de membrana (Santos y col., 1984; INDRE, 1991). El papel en la sobrevivencia y como factor de virulencia de las proteínas de la membrana, solo se puede hipotetizar, ya que su inclusión como componente de virulencia se basa en que la respuesta inmune es principalmente protectora. Los grupos de proteínas en la membrana externa de

Brucella han sido nombradas como: Grupo 1 (88 - 94 KDa), Grupo 2 (35 - 40 KDa) y Grupo 3 (25 - 30 KDa). Los tres grupos de proteínas son reconocidas por el sistema inmune bovino durante el curso de la infección. Se conoce muy poco de las proteínas de los Grupos 1 y 3, mientras que las proteínas del Grupo 2 han sido estudiadas y caracterizadas como Porinas (Winter, 1987; Santos y col., 1984).

Porinas. En 1984, Douglac y col estudiaron las propiedades de las porinas de Brucella (INDRE, 1991), usando el análisis de liposomas aumentados. Encontraron un rango en el tamaño del poro de 37,000 a 42,000 que varía entre las diferentes especies de Brucella. El poro mas grande lo presentó Brucella canis, un tamaño medio lo presentaban algunas cepas lisas y rugosas de Brucella abortus, mientras que el poro mas pequeño lo presentaba Brucella melitensis. Estas diferencias pueden ser las responsables de la permeabilidad variable a los colorantes de fucsina básica y tionina y pueden reflejar los diferentes patrones de los organismos en cuanto a su sensibilidad (Oñate y Folch, 1989; Verstrete y col., 1982; Meyer, 1990).

Antígenos Internos.

Lípidos. Los lípidos forman parte integral de la membrana interna, junto con los LPS y lipoproteínas, aún cuando están químicamente bien caracterizadas, se desconoce su papel como factor de adherencia en la implantación de la infección, pero se le han atribuído propiedades de resistencia de la envoltura celular a las enzimas lisozomales y a su adaptación en el desarrollo intracelular, en forma protectora (INDRE, 1991; Smith y Ficht, 1990).

Inmunidad Contra Brucella.

El estudio del sistema inmune se ha desarrollado para tratar de entender y explicar la respuesta del huésped a la presencia de bacterias, hongos, virus y en general, a sustancias ajenas a los organismos; los mecanismos de defensa del huésped han sido generalizados como específicos y no específicos. La inmunidad específica incluye las defensas del huésped como las barreras físicas, químicas, enzimas y células fagocíticas; la inmunidad específica está caracterizada por una interacción inicial entre un antígeno y un linfocito, donde dicho linfocito, desarrolla una "memoria inmunológica", que capacita al huésped, en una reexposición al Ag, para que responda con las funciones celulares incrementadas, tales como la inmunidad mediada por Ac, hipersensibilidad o rechazo, a éste tipo de inmunidad se le conoce como inmunidad celular. La inmunidad no específica, es la primera línea de defensa del huésped contra los microorganismos, tales mecanismos pueden considerarse como propiedades constitutivas del huésped normal; entre los mecanismos no específicos, se encuentran las barreras físicas (piel, mucosas), secreciones (lisozima, moco, lactoperoxidasa, pH, etc.), fagocitosis (granulocitos, monocitos) y proteínas sanguíneas (interferon, complemento, etc.), inmunidad conocida como humoral (Pestka y Witt, 1985). La infección de Brucella provoca la inducción de ambas respuestas inmunes, celular y humoral, la magnitud y duración de la respuesta puede ser afectada por algunos factores, que incluyen, la virulencia de la cepa infectante, tamaño del inóculo, edad, preñez, sexo, especie y estado inmune del huésped (Serre y col., 1987). Las bacterias intracelulares están

capacitadas para replicarse dentro de los fagocitos mononucleares, cuyas células están bien equipadas para englobar, matar y degradar los organismos invasores. Para la sobrevivencia intracelular, esos patógenos desarrollan potentes mecanismos de evasión (Flesch y Kaufman, 1990; Smith y Ficht, 1990).

Inmunidad Celular. La activación de los linfocitos T del hospedero es la respuesta inmunológica principal contra infecciones por parásitos intracelulares, provocándose una activación de la capacidad bactericida del macrófago, al asociarse al complejo de histocompatibilidad (Smith y Ficht, 1990). Las células T activadas son recirculadas en el huésped y en respuesta a señales inflamatorias, invaden los sitios de implantación bacteriana e interactúan con los fagocitos mononucleares, presentando una señal secundaria al producirse la interleucina-1, como señal de atracción y activación de los monocitos sanguíneos. Se forma un granuloma en el sitio donde se encuentran los focos microbianos, para prevenir la diseminación al resto del organismo, lo que se llama como inmunidad protectora contra las bacterias intracelulares (Flesch y Kauffman, 1990, Pestka y Witt, 1985, Smith, 1990).

Inmunidad Humoral. La inmunidad humoral también es llamada inmunidad mediada por anticuerpos. Cuando las células bacterianas han invadido un organismo superior, durante la primera fase, va a haber una aparición de anticuerpos IgM, alcanzando su mayor concentración durante las primeras 4 semanas; en forma progresiva empiezan a elevarse los títulos de Ig G, que disminuye con el tratamiento. La respuesta de la Ig A es más tardía y finalmente la Ig E, cuya cinética es intermedia entre la de Ig M e Ig G (Pestka y Witt, 1985). En los casos

de brucelosis crónica, al haber una reactivación, la primera semana de infección, aparecen anticuerpos Ig G con actividad bloqueadora, seguida de anticuerpos Ig A, que presentan la misma función bloqueadora. La producción de los anticuerpos es característica empleada en las pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis (Smith, 1990, Plomet y col., 1985; Serre y col., 1987).

Resistencia natural o no específica.

Barreras Físicas. Esta resistencia está bajo control genético y uno de los elementos mas importantes es la integridad de la piel y de las membranas mucosas, de tal forma que al perderse su continuidad, representa una fácil vía de entrada para los parásitos (Templeton y Adams, 1990). La piel es el sitio de unión principal entre Brucella y el huésped, en los bovinos se encuentra el eritritol en las células epiteliales de útero y aparato reproductor, que ha demostrado ser el factor determinante en la localización y proliferación de Brucella, éste alcohol no se encuentra presente en especies diferentes de los bovinos, en cuyas membranas se adhiere a receptores tipo lectina, con especificidad a manosa o a moléculas de configuración semejante, como la que tiene el azúcar de la cadena "O" del LPS y desarrolla una fuerte infección de la placenta con abortos (NRC, 1977). Brucella carece de otros factores de adherencia como pilis o fimbrias o proteínas con actividad de adhesina (Meador y col., 1989a; Meador y col., 1989b; Bosseray, 1987).

Fagocitosis. Uno de los mecanismos de resistencia tempranos en las enfermedades infecciosas es la ingestión y muerte por las células fagocíticas de las células

bacterianas, iniciado por las células polimorfonucleares (PMN), atraídos al sitio de infección por medio de estímulos químicos bacterianos, o por factores del huésped, como es el complemento, que se encarga de opsonizar la bacteria junto con los anticuerpos Ig M e Ig G, para que sea fagocitada por los PMN (Templeton y Adams, 1990; Pestka y Witt, 1985). Dentro del fagocito se acelera el metabolismo, produciendo sustancias bactericidas. Ciertas cepas de B. abortus y de B. melitensis pueden ser resistentes a la acción de los PMN, dependiendo de la virulencia de la cepa, siendo B. melitensis la mas resistente y la mas virulenta para animales y el hombre y se considera al LPS el responsable de dicha evasión, así como otros compuestos y enzimas como catalasa y una superoxido dismutasa dependiente de Cu-Zn, que participan en la regulación de intermediarios tóxicos; de la misma forma, se presentan dos mecanismos en la resistencia de Brucella: una alta hidrofobicidad de la membrana externa y la carencia de sitios de unión para proteínas catiónicas (Smith y Ficht, 1990; Canning y col., 1985).

Macrófagos. Las especies de Brucella sobreviven mejor dentro de los macrófagos, que se activan durante la etapa mas temprana de la enfermedad y está inducida por componentes como LPS, alcanzando su capacidad bactericida máxima a los 14 días después de la infección. La célula produce los mismos componentes bactericidas que los PMN, mientras que Brucella produce las mismas sustancias bloqueadoras. Adicionalmente, la bacteria puede escapar en algún momento del fagolisosoma y continuar viviendo en el citoplasma del fagocito y muy frecuentemente en el retículo endoplásmico rugoso (Smith, 1990; Canning, 1990).

Patogénesis.

Debido a que las especies de Brucella son parásitos intracelulares, se ha hipotetizado que es transportada por diversas vías del torrente sanguíneo a la glándula mamaria, dentro de los leucocitos (Kaplan, 1962). Se cree que los macrófagos y en menor proporción los neutrófilos, transportan células de Brucella de circulación sistémica a la glándula mamaria y por tanto, a la leche y además, proveen el medio para la replicación de la célula. En la glándula mamaria no se desarrolla una infección clínica típica, ya que no se detectan lesiones severas en la ubre ni en la mama, de caprinos o de bovinos. Microscópicamente, se puede observar una mastitis intersticial linfoplasmocítica e histiocítica (Corner y col., 1987; Meador y Deyoe, 1989).

El sitio de replicación primaria preferido por las células Brucella es en macrófagos y neutrófilos; en el lumen mamario alveolar y ductal, razón por la cuál son excretadas por medio de la leche. Al haber un trabajo mecánico, ya sea del proceso de lactación, o bien en la ordeña, presentándose el mayor número de células sanguíneas y bacterias al inicio de la lactancia, después del parto y va disminuyendo con el tiempo (Meador y col., 1989a). El calostro es la fracción de la leche donde se concentra el mayor número de leucocitos y por tanto, de bacterias (Kaplan y col., 1962; Meador y col., 1989a; Meador y col., 1989b).

Patogénesis de la brucelosis humana.

La brucelosis humana se presenta en varias formas, aguda, crónica, intermitente, variable y continua, de inicio agudo e incidiioso, caracterizada por fiebres intermitentes, continuas, o irregulares, de duración variable, con dolor de cabeza, debilidad, sudoración profusa, escalofríos, artralgia, depresión, pérdida de peso y dolor corporal generalizado (CDC, 1990). Se puede presentar infección supurativa generalizada. La infección puede perdurar por algunos días, meses y ocasionalmente por 1 o mas años (Alarcón y col., 1987; Ruíz Castañeda, 1986).

Entre las complicaciones mas comunmente presentadas estan las osteoarticulares; osteomielitis vertebral y mas raramente, bursitis prepatelar (Alarcón y col., 1987). El aparato genitourinario puede estar involucrado en un 2 - 20% de los casos, con orquitis y epididimitis mas comunmente (CDC, 1990). La fatalidad en los casos con tratamiento es de $\leq 2\%$; siendo mayor para la infección producida por Brucella melitensis, que es la especie que provoca mayor toxicidad en el humano. Cuando se produce brucelosis crónica se presentan síntomas complejos de neurosis e invalidéz; el período de incubación es muy impreciso, dependiendo de la virulencia de la cepa, via de entrada y dosis infectante, puede ser de 5 - 60 días o de 1-2 meses comunmente y ocasionalmente puede haber períodos mayores (Ruben y col., 1991). Brucella suis es causante de lesiones destructivas y supurativas y tiende a volverse crónica (Ruíz-Castañeda, 1986). No se ha podido

demostrar que la persona presente un período de infectabilidad, ya que la transmisión de persona a persona no está bien definida (CDC, 1990; Ruben y col., 1991). Brucella abortus puede presentar estado tóxico y provocar lesiones localizadas, pero de menor gravedad que las anteriores (Ruíz-Castañeda, 1986). Existen varios factores relacionados con el huésped, de los cuáles va a depender el período de incubación, como es el estado nutricional, presencia de otras enfermedades, inmunidad del individuo y stress. Una vez que la bacteria penetra al organismo y alcanza torrente sanguíneo, es fagocitada por polimorfonucleares, para ser llevada a células del sistema reticuloendotelial, donde prolifera (Smith, 1990). En el huésped con respuesta inmunológica celular normal hay formación de granulomas, se destruye la bacteria y la lesión desaparecerá meses después. En éste caso, la evolución de la enfermedad dependerá de la capacidad del agente para evadir los mecanismos intracelulares de defensa para su destrucción (Corbeil y col., 1988; Canning y col., 1985)

Patogénesis de la brucelosis bovina.

La transmisión natural entre los animales se da por medio de la ingestión de agua y alimentos contaminados con bacterias que han sido eliminadas a través de placenta, fetos abortados y descargas uterinas, se cree que existen otras formas de transmisión, como es la monta directa con toros infectados, inseminación artificial con semen contaminado, superficies

mucosas como la conjuntiva, boca, piel, tracto respiratorio y en forma parenteral. No se ha determinado la vía de entrada mas común de la bacteria al animal, pero se cree que la boca, mucosa y piel son los sitios de acceso mas utilizados (Lanza, 1987; Vásquez, 1992). Los signos clínicos mas comunes de la enfermedad en los animales son el aborto y la reducción hasta del 20% en la producción de leche, muerte del producto al final de la gestación, retención placentaria y aumento en el número de servicios por concepción, la placenta se encuentra engrosada con lesiones fibrinosas y los líquidos son de color rojo muy fétido. Mientras que en el feto no se encuentran hallazgos específicos; en el macho, la infección ataca las glándulas accesorias, los testículos y el epidídimo, por lo que es eliminada junto con el semen y se transmite durante el coito (Lanza, 1987). El establecimiento de la infección depende de la edad del animal, en crias jóvenes, la Brucella se desecha en pocos meses, independientemente de la forma en que la haya adquirido. Las vaquillas preñadas son extraordinariamente susceptibles a la brucelosis, transformándose en receptáculo de Brucella por tiempo indefinido, pudiendo abortar repetidas veces y una vez establecida la bacteria en animales sexualmente maduros, especialmente en hembras, tiende a persistir indefinidamente (Vásquez, 1992). Como se mencionó anteriormente, el sitio de predilección de Brucella en las vacas es la ubre y nódulos linfáticos supramamarios, los cuales se afectan en un 60-93% de los animales infectados; se ha estimado que del 15

al 35% de las vacas en hatos sin vacunar excretan números detectables de Brucella en su leche, incluyendo a las vacas que no han abortado, el número de organismos excretados varía diariamente, siendo mayor en los primeros días después de la parición o del aborto, pudiéndose encontrar hasta 200,000 organismos/ml en el calostro, disminuyendo posteriormente hasta 10,000 a 20,000 /ml (Kaplan, 1962). La infección raramente causa mastitis clínica en el ganado, por lo que no hay cambio en la apariencia, sabor, color, contenido de catalasas y cloruros en la leche, por lo que la enfermedad puede llegar a pasar inadvertida (Ruíz-Castañeda, 1986). Existen factores que determinan la difusión de la enfermedad, tales como la edad, ya que los recién nacidos no se ven tan fuertemente afectados, como los animales adultos; el estado fisiológico, ya que las hembras gestantes son las que muestran en forma mas clara los signos, principalmente el aborto y en los machos, la orquitis y finalmente, la especie. En bovinos se localiza en útero si está preñada, en caso contrario, en ubre y nódulos linfáticos; en porcinos, se presenta bacteremia prolongada, localizada en mucosas y tejido, mientras que en los caprinos, la bacteremia es de por vida, eliminándose la bacteria en la leche (Lanza, 1987; Vásquez, 1992).

Después que la bacteria ha penetrado al organismo y alcanza el torrente sanguíneo, se produce una bacteremia y reacción de aglutinación positiva en el suero sanguíneo, lo que termina por provocar el aborto, seguida por la localización en la ubre, nódulos linfáticos supramamarios y

otros sitios en el sistema reticuloendotelial (Corner y col., 1987). La característica intracelular de Brucella abortus es un factor importante en la sobrevivencia. El signo mas notable y frecuente de las infecciones del género Brucella es el aborto, aún cuando la enfermedad se caracteriza por una infección generalizada, aun no está claro si el feto muere debido a una endotoxina o a la necrosis placentar producida (NCR, 1977; Vázquez, 1992). La mayoría de las vacas abortan solo una vez, aunque la bacteria se siga excretando por años al momento del parto y el tiempo de eliminación es indefinido, pudiendo ser toda la vida. La susceptibilidad del ganado a la enfermedad es extremosa, algunos adquieren inmunidad natural y nunca desarrollan la enfermedad, mientras que los animales muy susceptibles pueden abortar repetidamente durante toda su vida reproductiva (Corbeil y col., 1988; Smith y Ficht, 1990; Ruiz-Castañeda, 1986).

Modo de Transmisión.

La brucelosis se considera una enfermedad ocupacional, de granjeros, veterinarios, trabajadores de rastro y personal de laboratorios. Los casos esporádicos y brotes epidémicos se producen entre los consumidores de leche y productos lácteos sin pasteurizar, especialmente de vaca, cabra y borregas (Currier, 1989; Aguilar, 1987; CDC, 1990).

La transmisión se lleva a cabo por medio del contacto directo con tejido, sangre, orina, descargas vaginales, fetos abortados y especialmente

placentas, o a través de escoriaciones de la piel y por la ingestión de leche cruda y productos lácteos de animales infectados (Currier, 1989). La infección también puede ser transmitida por medio del aire y es muy común en granjas, pensiones animales, establos y laboratorio, al manejar los desechos secos y aerosoles producidos al flamear las asas bacteriológicas y al llevar a cabo la emulsión de las muestras en licuadora (Piffaretti y col., 1987). Un número menor de casos se dá entre los veterinarios, por inoculación accidental de las cepas 19 y Rev-1, empleadas como vacunas animales (Currier, 1989). La transmisión de persona a persona no está bien clara actualmente, aunque en los últimos años han aparecido reportes de transmisión sexual entre un laboratorista y su esposa, como el reportado por Ruben y col. (1991), infectados ambos con Brucella melitensis biotipo 3, que en ausencia de otros factores de riesgo para la transmisión y aislándose la misma bacteria de ambos hemocultivos se da por hecho la transmisión sexual, aún cuando puede ser especulativo. La transmisión de la infección de una madre a su hijo por medio de la alimentación al pecho, pero la forma de transmisión que hasta la presente provoca mayor preocupación a los investigadores en el área de Salud Pública es a través de los alimentos, como son leche y productos lácteos, manejo de carne, principalmente de cerdo (Aguilar, 1987; Eckman, 1975; Kaplan y col., 1962; Rufz-Castañeda, 1986).

Diagnóstico de Brucelosis.

La brucelosis puede ser diagnosticada detectando los organismos de Brucella, o demostrando una respuesta inmune específica, mediada por células o por la producción de anticuerpos en el suero humano y/o animal y en la leche, el criterio utilizado para la selección de la prueba dependerá del propósito del trabajo, como en los programas epidemiológicos, de erradicación, donde se prefiere utilizar los métodos rápidos, que presenten confiabilidad y seguridad en el diagnóstico y que puedan ser realizados en el campo (Chappel, 1989). Además, como alternativa al método bacteriológico se han desarrollado pruebas de inmunoensaye, hibridización del DNA (Verger y col., 1985) y PCR (Polimerase Chain Reaction) (Fekete y col, 1990; Miller-Hays y col., 1991). La inmunidad celular puede ser detectada in vivo por medio de hipersensibilidad retardada, pero no es una técnica lo suficientemente sensible para diagnóstico individual, o in vitro por transformación de linfocitos, que es una prueba muy especializada y cara para trabajo de campo (S. S. A. 1987; Dohoo y col, 1986; Chappel, 1989).

Determinación Serológica.

La serología tiene su principio en la base de que la presencia o ausencia de anticuerpos en el suero es un reflejo de la presencia o ausencia de infección, lo que no es necesariamente cierto, ya que la concentración y tipo de anticuerpos séricos varía de acuerdo al curso de la infección y entre

los individuos, además de que la vacunación va a provocar error en los resultados y por tanto en el diagnóstico, los anticuerpos producidos en respuesta a los antígenos de Brucella son diferentes durante el desarrollo de la infección, variando en isotipos (Ig G₁, Ig G₂, Ig M e Ig A), afinidad por el antígeno, especificidad antigénica y función (INDRE, 1991). Normalmente, la Ig M se produce al inicio de la infección, provocando posteriormente la producción de Ig G, particularmente la Ig G₁. Con el tiempo, aparece la Ig A en pequeñas cantidades, observándose una tendencia a aumentar la afinidad de los anticuerpos durante el curso de la infección, lo que afecta grandemente la función serológica de los anticuerpos individuales (Chappel, 1989). Se han publicado numerosas pruebas serológicas recientes o bien modificaciones de las ya existentes, lo que es un reflejo inherente de la dificultad del diagnóstico serológico. El mayor desarrollo de las pruebas son diseñadas para el diagnóstico de la brucelosis bovina y los principios de algunas de esas técnicas pueden ser empleadas para el diagnóstico en el humano. Todas las pruebas producen un cierto grado de error, ya sea falsos positivos en individuos sanos o falsos negativos en individuos infectados. La mayoría de las pruebas emplean como antígeno a la bacteria completa e inactivada, las que determinana la presencia de anticuerpos presentes en suero o leche formando un complejo colorido, o bien por medio de aglutinación (Chappel, 1989).

Reacción falsa negativa. Ocurre si un animal infectado no presenta o tiene muy poca cantidad de anticuerpos séricos o en la leche, ya sea porque su infección es muy reciente, porque la infección está latente, o simplemente, porque el individuo ha respondido pobremente al estímulo antigénico, por la presencia de anticuerpo equivocado, una predominancia de Ig M en la infección inicial, que no es detectada por pruebas que fueron diseñadas para detectar Ig G (INDRE, 1991; Chappel, 1989).

Reacción falsa positiva. Puede ser el resultado de la presencia de anticuerpos inducidos por la vacunación o por anticuerpos residuales de bacterias no relacionadas, los cuales son detectadas particularmente con pruebas de aglutinación para Ig M (INDE, 1991; Chappel, 1989).

Pruebas serológicas.

Fijación del complemento (CFT). La prueba CFT detecta anticuerpos Ig G, solamente, la presencia de Ig G₂ en exceso, puede provocar un efecto de prozona o aún reacciones falsas negativas. CFT también presenta alta reactividad para Ig M, pero generalmente se destruye por las condiciones de calentamiento usadas para inactivar el complemento en la prueba y da reacciones falsas positivas debido a anticuerpos residuales. A pesar de ser de gran valor diagnóstico y específico, es de uso muy limitado, debido básicamente a lo tardado de la estandarización, complejidad y costo (Farina, 1985; Larsen y col., 1988; Chappel, 1989; Dohoo y col, 1986; Lanza, 1987).

Prozona. Un exceso de anticuerpos Ig G₂ induce la formación del fenómeno conocido como prozona y por lo tanto, provocar algunas reacciones falsas negativas, se ha sugerido que la causa de un elevado nivel de Ig G₂ se debe a la edad del animal, exposición antigénica repetida, condiciones ambientales estresantes y la transferencia activa de Ig G₁ serica al calostro al momento del parto. El efecto de prozona se puede reducir por medio de una fijación del complemento en frío (Chappel, 1989; Farina, 1985).

Pruebas de aglutinación en tubo o en portaobjeto (SAT). Es una prueba menos sensible para la Ig G que la CFT, pero muy sensible para Ig M. SAT da mas reacciones falsas negativas y positivas debido a la vacunación con la cepa 19 y por reacciones no específicas (Chappel, 1989, Dohoo y col. 1986; Farina, 1985).

Prueba de Rosa de Bengala (RBT). Es una prueba de aglutinación muy sencilla, usa un Ag unido a un colorante, a pH 3.65, presenta la desventaja de producir reacciones falsas positivas por la vacunación con la cepa 19, presenta alta sensibilidad a Ig M. Recomendada como prueba única en áreas con una alta prevalencia de brucelosis, los casos positivos se confirman con CFT (Chappel, 1989; Lanza, 1987; Das y Paranjape, 1987; Farina, 1985).

Prueba de la antiglobulina de Coombs (AGT). Es una modificación sensibilizada de SAT, los Ac no aglutinantes también pueden ser detectados y puede distinguir los isotipos de las inmunoglobulinas (Farina, 1985; Alton y col., 1975; Chappel, 1989).

Prueba de hemólisis indirecta (IHLT). Es una alternativa de CFT y se usa en programas de erradicación (Chappel, 1989; Farina, 1985).

Otras pruebas

ELISA. Es el método que da menos resultados falsos negativos y más reacciones falsas positivas que CFT, se pueden aumentar la especificidad a los isotipos si se desea. Puede usarse como una prueba definitiva, especialmente si se hace específica para Ac Ig G y si se toman los cuidados apropiados para su elaboración. Esta técnica puede ser usada no solamente en muestras séricas, sino que también es de gran valor diagnóstico en leche. Detecta la presencia de Ac de Brucella, aún cuando la muestra se encuentre diluída hasta 100 veces en leche normal, o en forma temprana, cuando las pruebas serológicas son negativas. Puede ser detectado el Ac y sus isotipos (Farina, 1985; Heck y col., 1980; Kerkhofs y col., 1990; Larsen y col., 1988).

Prueba del anillo en leche (MRT). Es la prueba mas comunmente utilizada para detectar la brucelosis en hatos lecheros. La suspensión coloreada de Brucella se concentra principalmente en la capa de crema cuando la leche contiene Ac, mientras que en su ausencia, existe una distribución homogénea en la leche, debajo de la capa de crema. Se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos en la leche de animales infectados, clasifica hatos como positivos o negativos, y su eficacia se debe mas a la frecuencia con que se realice la prueba que a su sensibilidad. Se ha sugerido que los

diferentes isotipos de Ac se encuentran formando parte de la positividad de MRT, incluyendo Ig A e Ig M, a diferentes temperaturas y periodos de incubación. Se puede realizar en forma periódica en hatos lecheros declarados libres de brucelosis o que se encuentran en periodo de certificación (Kerkhofs y col. 1990, Lanza, 1987; Sutra y col., 1986).

Pruebas Bacteriológicas.

Para establecer un diagnóstico específico y certero de la brucelosis, es necesario comprobar su presencia del organismo, por métodos bacteriológicos, aislando e identificando la bacteria en las diversas muestras manejadas en el laboratorio. Entre las muestras mas comunmente empleadas para el diagnóstico de brucelosis humana, se encuentran los cultivos sanguíneos, en individuos con brucelosis activa, mientras que para los casos de brucelosis crónica se realiza el diagnóstico en médula osea, en ambos casos, la siembra de la muestra se lleva a cabo en el medio bifásico descrito por Ruiz-Castañeda (1986). La principal ventaja de las pruebas bacteriológicas, es que puede detectar la bacteria aún cuando la infección sea crónica o silenciosa, situación que no siempre se presenta con los métodos serológicos (Larsen y col., 1988; Alton y col., 1975; INDRE, 1991, Ruiz-Castañeda, 1986).

El diagnóstico bacteriológico de la brucelosis en animales puede llevarse a cabo en diferentes muestras. Como la infección de la ubre puede

estar localizada en uno o mas cuartos, las muestras de leche deberán tomarse de todos los cuartos, se recomienda que para muestras individuales se tome una cantidad mínima de 20 ml de leche de cada cuarto, previa limpieza exterior de la ubre, desinfección con alcohol y secado de las tetas; los organismos de Brucella, también pueden ser obtenidos por medio de exudados vaginales, tomados con hisopo, en un período de 6 semanas posteriores al parto o al aborto (Alton y col., 1975; Corner y col., 1987; Corbel, 1985). Para el cultivo sanguíneo en los animales, la toma de muestra se hace por punción en la yugular del animal (Ruíz-Castañeda, 1986). Es importante llevar a cabo el análisis del material abortado, para descartar todas las posibles causas del aborto, por lo que se deberá trabajar con el feto y la membrana fetal. Las submuestras con que se trabaja del feto son el contenido estomacal, pulmones, bazo y meconio, mientras que de la membrana fetal se utilizan trozos o bien las porciones donde se encuentran los cotiledones, sobre todo aquellos que han perdido su apariencia roja brillante normal y se han vuelto de un color amarillo grisáceo (Meador y Deyoe, 1989; Ruíz-Castañeda, 1986). Otra muestra que puede emplearse en el diagnóstico es la carcasa animal, cuyos tejidos van a variar de acuerdo a la especie, pero en general los mas recomendados son el sistema reticuloendotelial, utero grávido y la ubre (Alton y col., 1975; Ruíz-Castañeda, 1986). El diagnóstico de laboratorio más confiable se hace por el aislamiento apropiado del agente infeccioso, las pruebas serológicas en laboratorios con

experiencia son confiables, especialmente cuando se prueban muestras apareadas y ambas presentan títulos de anticuerpos elevados y la interpretación de las pruebas serológicas para los casos crónicos y recurrentes es especialmente difícil, ya que los títulos de anticuerpos son usualmente bajos y se hace particularmente importante llevar a cabo la cuantificación de Inmunoglobulina G (CDC, 1990).

Aislamiento del organismo. Se han desarrollado diferentes medios de cultivo para el aislamiento e identificación de Brucella a partir de diferentes muestras, tanto biológicas como de alimentos. Excepto para propósitos especiales, los medios sólidos se prefieren para el aislamiento y propagación posterior de los organismos de Brucella. Para el cultivo de ciertos líquidos, principalmente sangre, los medios líquidos permiten el cultivo de grandes volúmenes, cuando se mantienen bajo condiciones controladas de tensión de oxígeno, pH, etc. son de gran utilidad para cultivos masivos de organismos de Brucella, para la producción de antígenos y vacunas. Los procedimientos empleados para el aislamiento pueden llevarse a cabo por medio de cultivo directo en medios selectivos y no selectivos, enriquecimiento y/o inoculación animal (Corbel, 1985; WHO, 1986; Alton y col., 1975).

Cultivos directos. La muestra se va a inocular en forma directa sobre un medio de cultivo sólido, cuando se sospecha que la muestra está poco contaminada, se recomienda emplear un medio de cultivo enriquecido, como

el utilizado por Kuzdas y Morse (Corbel, 1985) o el medio de Farrell (1974) (Moreira-Jacob, 1970; Alton y col. 1975; Ruíz-Castañeda, 1986).

Cultivos con pre-enriquecimiento. Puede llevarse a cabo in vitro en medios líquidos, o in vivo por inoculación animal. En las muestras clínicas se emplea el medio bifásico de Ruíz-Castañeda, mientras que para alimentos se utiliza un enriquecimiento en medio líquido, como Caldo Brucella enriquecido con antibióticos o los medios líquidos de Brodie y Stinton, que posteriormente se resiembran en medios sólidos para el aislamiento e identificación de la bacteria (Corbel, 1985; Alton y col. 1975; Ruíz-Castañeda, 1986).

Algunas cepas de Brucella requieren la presencia de suero en el medio durante el aislamiento primario cuando existe contaminación con otros organismos, se debe emplear un medio selectivo que suprima el crecimiento de las bacterias contaminantes y que no interfiera con el crecimiento de Brucella, puede ser preparado agregando a cualquier medio basal los antibióticos sugeridos por Kuzdas y Morse (1953) (Corbel, 1985), además del colorante Violeta de Etilo sugerido por Renoux (1954) (Corbel, 1985), pero debido a que existen cepas entre las especies de Brucella que son susceptibles a los colorantes, se deberá realizar la siembra por duplicado en medios de antibióticos con o sin colorante. En forma alternativa se puede emplear el medio con glicerol y dextrosa como enriquecedores para llevar a cabo el aislamiento primario de Brucella, y el medio preparado con extracto de papa (Alton y col., 1975; Ruíz-Castañeda, 1986, WHO, 1986).

En 1972, Farrell y Robertson desarrollaron un medio para el aislamiento de Brucella a partir de leche, el cuál contiene 5% de suero de caballo, 1% de dextrosa, 25 U/ml de bacitracina, 20 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina, 5 U/ml de polimixina B, 5 $\mu\text{g/ml}$ de ácido nalidíxico, 100 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida y 100 U/ml de nistatina y lo compararon con varios medios selectivos ya disponibles (Mair, SDA y Ryan). La prueba se llevó a cabo con muestras de leche, a las cuáles se les realizó la prueba de anillo, obteniéndose 560 muestras positivas y se les hizo el análisis bacteriológico, así como la inoculación animal. Se aislaron 307 organismos de Brucella, el aislamiento mayor fué el que se obtuvo en el medio de Farrell (86%), comparado con 69, 72 y 72% en los medios de Mair, SDA y Ryan respectivamente. El porcentaje de aislamiento del medio de Farrell es comparable con el obtenido por el método de inoculación, mientras que el medio de Ryan y Mair inhiben el crecimiento de las cepas de biotipo 2 y los medios SDA y Mair no inhiben el crecimiento de la flora acompañante; los resultados anteriores se confirmaron en el año de 1977 por Hunter y Kearns, al hacer la comparación del medio descrito por Farrell (1974) con el medio SDA y el descrito por Barrow & Peel en 1967 (Hunter y Kearns, 1977), el cuál está compuesto de un agar base, adicionado con 10% de sangre de borrego defibrinada, 1:5000 L-cisteína, 1:4000 de eritritol, 25 U/ml de bacitracina, 6.25 U/ml de polimixina B, 10 U/ml de vancomicina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de actidione (ácido nalidíxico), para lo que emplearon muestras de leche de bovino y

moco vaginal. Se corroboraron los resultados anteriores respecto al medio de Farrell, ya que provó ser el mas efectivo en la recuperación del organismo y en la supresión del crecimiento de organismos contaminantes, aunque en los casos en que B. abortus creció en todos los medios de cultivo, las colonias del medio de Barrow & Peel fueron mas grandes y podían leerse con solo tres dias de incubación, además se confirmó que el medio SDA no suprime la flora acompañante de las muestras empleadas.

Identificación.

Una vez aislada la bacteria, invariablemente, se debe proceder a identificar la especie y el biotipo de la cepa. La clasificación exacta de dichas especies de Brucella en términos de biotipos es de gran importancia clínica, de salud pública y epidemiológica. Las características morfológicas, bioquímicas y serológicas utilizadas para diferenciar las especies, se encuentran en el Cuadro 3 (Página 31). Adicionalmente, es necesario utilizar las características metabólicas oxidativas de algunos compuestos que se enumeran en el Cuadro 5 (Alton y col., 1975, Moreira-Jacob, 1970, Ruiz-Castañeda, 1986; S. S. A., 1987).

Cuadro 5. Características metabólicas oxidativas de las especies de *Brucella* y sus biotipos.

Especie/biotipo	AMINOACIDOS			AMINOACIDOS (CICLO UREA)			CARBOHIDRATOS					
	L-Ala	L-Asp	L-Glu	DL-Orm	DL-Citr	L-Arg	L-Lys	D-Ara	D-Galac	D-Ribo	D-Gluc	i-Erit
1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
7	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
8	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
9	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	±	±	+	+	+	±	+	+	+	+	+
3	±	-	±	+	+	+	+	-	-	+	+	+
4	-	-	±	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Brucella ovis</i>	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brucella canis</i>	±	-	±	+	+	+	+	±	±	+	+	±
<i>Brucella neotomae</i>	±	+	+	-	-	-	±	+	+	±	+	+

Fuente: Alton y col. (1975), Moreira-Jacob (1970), Ruiz-Castañeda (1986).

Métodos de Control

El control de la brucelosis humana descansa en la eliminación de la enfermedad de los animales domésticos, para lo cual, a nivel mundial, se han diseñado una serie de acciones y medidas preventivas, que a continuación se describen brevemente:

Medidas preventivas.

* Programas educacionales al público para concientizarlo sobre el consumo de leche y productos lácteos sin pasteurizar.

* Programas educativos para granjeros y trabajadores del rastro, plantas empacadoras y carnicerías, sobre la naturaleza de la enfermedad y el riesgo en los manejadores de los canales y productos de animales potencialmente infectados y la operación correcta del sacrificio para reducir la exposición.

* Detección de la infección en el ganado por medio de pruebas serológicas y por la prueba del anillo en la leche de las vacas; eliminando animales infectados por segregación o sacrificio. La infección entre los cerdos usualmente requiere el sacrificio de la manada. En áreas de alta prevalencia, la inmunización de terneros y ovejas con bacterias vivas atenuadas de la cepa Rev-1 de Brucella melitensis; y becerros y animales adultos con la cepa 19 de Brucella abortus.

* Las personas inoculadas accidentalmente con las vacunas de la cepa 19 o Rev-1 se les deberá tratar con 200 mg de doxicilina, combinada con 600-900 mg de rifampicina, por 10 días.

* Pasteurización de leche y productos lácteos de vacas, cabras y borregas. Cuando la pasteurización es imposible, el hervir la leche puede ser suficiente.

* Cuidado en el manejo y disposición de placenta, descargas y fetos de animales abortados y desinfección de áreas contaminadas.

* Aumentar la resistencia al hospedero con la vacunación, aplicando un criterio selectivo. En bovinos se vacuna con la Cepa 19 a los animales jóvenes entre los 3 y 6 meses de edad, pero solamente a las hembras (NRC, 1977; Lanza, 1987; CDC, 1990; Alton, 1987; Florida Cattleman, 1987; Davidson y col., 1990).

Campañas de erradicación.

En muchos países, la brucelosis sigue siendo un serio problema de salud pública y se han llevado a la práctica programas de erradicación y control, los que han tenido éxito en mayor o menor grado. En 1987 la Organización Mundial de la Salud (WHO) reportó que de 176 países que respondieron un cuestionario, sólo 15 habían erradicado la enfermedad y en 19 no se había reportado ningún caso, en 2 nunca se había detectado y 140 aún estaban infectados.

En México, se ha venido trabajando en las campañas de erradicación y control de tuberculosis y brucelosis bovina en forma conjunta, asignándosele a cada estado la responsabilidad del manejo y logros de dichos trabajos, sistema establecido inicialmente en la región noroeste del país. En Sonora, Sinaloa y Chihuahua, está operando un sistema de control cuarentenario y de movilización de animales (Gay, 1992). El 12 de Diciembre de 1991, el Ejecutivo del Estado emitió el "DECRETO QUE DECLARA DE INTERES PUBLICO LA REALIZACION DE LA CAMPAÑA DE ERRADICACION DE LA TUBERCULOSIS BOVINA Y DE LA BRUCELOSIS DEL ESTADO DE SONORA, Y CONSTITUYE EL COMITE QUE IMPLEMENTARA DICHA CAMPAÑA", documento publicado en el Boletín Oficial del 19 de Diciembre de 1991 (Campa, 1992a), en el cuál se establece como meta que el Estado de Sonora sea declarado zona limpia de tuberculosis bovina para 1995 (Campa, 1992a; Campa, 1992b).

MATERIALES Y METODOS

Evaluación de la Recuperación.

Descripción de la Muestra

En el laboratorio de microbiología del CIAD, AC se elaboraron quesos frescos regionales para determinar la recuperación de las especies de Brucella melitensis y de Brucella abortus empleados en el presente trabajo. La leche fué proporcionada por la empresa Lácteos de Sonora, escogiéndose la del lote que presentaba las cuentas bacterianas mas bajas, además, por medio de la técnica de anillo en leche, se comprobó que no presentaba títulos de anticuerpos hacia Brucella o algún otro patógeno y se realizó una siembra para detectar su presencia.

Manejo de la Leche. La temperatura a la cual se recogía la leche era de 4° C, por lo que era necesario llevarla a una temperatura de 30 - 36° C para poder adicionar la renina (Marschall, Prod. Nut.,S.A. de C.V., Méx.). La leche se separó en dos lotes en cantidades aproximadas de 10 litros, uno de los lotes era empleado para elaborar el queso control y la otra porción para elaborar un queso contaminado con cada una de las especies. En total se elaboraron 6 quesos: 2 contaminados con Brucella abortus, 2 contaminados con Brucella melitensis y 2 quesos control.

Manejo de los Cultivos. Los cultivos bacterianos empleados consistían de cepas puras y fueron crecidos en caldo Brucella, en cultivos estáticos por 72 horas a 37° C,

Brucella abortus en ambiente con 10% de CO₂ y para Brucella melitensis en aerobiosis. Se agregaron 10 ml del cultivo con cuentas de 3 x 10⁹ CFU/ml para Brucella abortus y de 2 x 10⁹ CFU/ml para Brucella melitensis.

Renina. La renina o cuajo (Marschall, Prod. Nut., S.A. de C.V., Méx.) empleado fué en presentación de pastilla, se agregó siguiendo las instrucciones del fabricante, en cantidades de 3 ml de solución/10 litros de leche a 30 - 36° C, posteriormente se dejó reposar por un período de 4 horas para la formación del coagulo.

Elaboración del Queso. La elaboración del queso se llevó a cabo en forma artesanal, cabe mencionar, que se tuvo control de la contaminación, para lo cuál se trabajó en una campana de flujo laminar y el material empleado se esterilizó en autoclave, mientras que los recipientes se esterilizaron con luz ultravioleta. Una vez formado el coagulo de la leche, se procedió a su "quebrado" con una espátula estéril, se dejó reposar por 15 min para separar el suero y se procedió a filtrarla en una manta quesera. La molienda de la cuajada se hizo en forma manual y el salado "al gusto". Se envolvió con una manta y se prensó con una piedra por aproximadamente 8 horas.

Posteriormente, el queso se almacenó a 5° C por 21 días, tomándose muestras cada 3 días para llevar a cabo el análisis bacteriológico.

De la misma forma se elaboraron y almacenaron los controles negativos, muestreándose en forma similar que la muestra problema para el análisis microbiológico y cada 7 días para los análisis fisicoquímicos.

Análisis Microbiológico

Enriquecimientos. Para obtener un mejor crecimiento de las especies bacterianas se probaron dos enriquecimientos que comunmente se emplean para el aislamiento de la Brucella, con el fin de probar cuál de ellos nos proporcionaba mejor recuperación, empleándose 2% de glicerol (SIGMA, St. Louis Mo.) más 1% de dextrosa (MERCK, México), y 5% de suero de caballo (sangre obtenida directamente del animal en condiciones ascépticas, separada en el laboratorio), más 1% de dextrosa (MERCK, México).

Suplemento Antimicrobiano. A los medios de cultivo se les agregó un suplemento antimicrobiano con el fin de abatir la flora contaminante que pudiera contener el queso y que consistió de

25 U/ml de Bacitracina (SIGMA, St. Louis, Mo), 5 U/ml. de Polimixina B (SIGMA, St. Louis Mo.), 100 U/ml de Ciclohexitida (SIGMA, St. Louis Mo.), 20 U/ml de Vancomicina (SIGMA, St. Louis, Mo.), 5 U/ml. de Ac. Nalidíxico (SIGMA, St. Louis, Mo) y 100 U/ml de Nistatina (SIGMA, St. Louis, Mo). El suplemento antimicrobiano fué desarrollado por Farrel (1974), suprime efectivamente la flora contaminante, sin inhibir las cepas mas fastidiosas como Brucella abortus biotipo 2.

Para la determinación de la recuperación se probaron 2 métodos de aislamiento:

Método 1. Consistió de cuenta directa en placa, siguiendo las técnicas de placa vaciada (A. O. A. C., 1984; B. A. M., 1984) usando como emulsificante y diluyente solución salina fisiológica (0.85%) con Tween 80 (SIGMA, St. Louis Mo.) al 2%.

a).- Se pesaron 10 grs. de queso y se emulsificó manualmente con la solución salina.

b).- Se prepararon diluciones seriadas en solución salina hasta 10^6 y se sembraron por medio de la técnica en placa vaciada en Agar Brucella (DIFCO, Detroit, Mi.), Agar BHI (BBL, Cockeysville, Md.), Agar para cuenta estándar (DIFCO, Detroit, Mi.) Agar Infusión de papa (DIFCO, Detroit, Mi) y Agar Soya Tripticasa (BBL, Cockeysville, Md). Para todos los medios de cultivo se emplearon dos enriquecimientos y se adicionaron con los 5 antimicrobianos anteriormente descritos.

c).- Las placas se incubaron a 37° C por 48 horas y se realizó la cuenta de las colonias.

d).- La confirmación de las bacterias se llevó a cabo por medio de tipificación con suero polivalente AMS (DIFCO, Detroit, Mi).

Método 2. La técnica seguida, es una combinación de las técnicas de S. S. A. (1987), Alton y col. (1975), Corbel (1985) y Farrel (1974):

1.- Se pesaron 10 grs. de queso y se emulsificaron manualmente en 90 ml. de solución salina con tween 80, de los cuáles, 25 ml se sembraron en 225 ml. de Caldo Brucella (DIFCO, Detroit, Mi). enriquecido y adicionado con los 5 antimicrobianos.

2.- Del enriquecimiento se realizaron resiembras cada 48 horas, por 21 días, siguiendo la técnica de placa vaciada descrita anteriormente y confirmándose de igual forma.

Evaluación de la Incidencia

Descripción de la muestra.

Para determinar la incidencia de Brucella sp en queso fresco regional, se llevó a cabo un muestreo en el Municipio de Cajeme y Guaymas, Sonora, con la colaboración del Departamento de Control Sanitario de la Secretaría de Salud de Ciudad Obregón, Sonora y de los Servicios Médicos de Sonora de Hermosillo, Sonora. Las 335 muestras tomadas consistieron de aproximadamente 500 grs. de queso fresco regional expandidas en diferentes abarrotes de Cd. Obregón, Sonora, los cuáles se mantuvieron en hielo hasta su llegada al laboratorio de microbiología del C. I. A. D., A. C., en Hermosillo, Sonora, donde se realizaba la determinación microbiológica de Brucella sp.

Detección de Brucella sp

El análisis de las muestras se llevó a cabo por medio del método 2 ensayado para la recuperación, de la siguiente manera:

- 1.- Se pesaron 10 grs. de queso y se emulsificó en 90 ml. de solución salina con Tween 80 (Sigma, St. Louis, Mo.) al 2% (SST), se realizaron diluciones seriadas en solución salina 0.85% hasta 10^3 .
- 2.- De cada una de las diluciones, se tomó 1 ml. y se sembró en 10 ml de Caldo Brucella (DIFCO, Detroit, Mi), enriquecido con 2% de glicerol (Sigma, St. Louis, Mo.) y 1% de dextrosa (Merck, México), y otro lote de caldo

- enriquecido con 5% de suero de caballo y 1% de dextrosa, ambos adicionados con los 5 antimicrobianos. Se incubaron en aerobiosis para Brucella melitensis y en una atmósfera que contenía 10% de CO₂ para Brucella abortus.
- 3.- De los enriquecimientos anteriores, se realizaron resiembras cada 48 horas, por 21 días, en Agar Brucella (DIFCO, Detroit, Mi), enriquecido y se incubaron en las mismas condiciones anteriores.
 - 4.- A las colonias características de Brucella, se les hicieron las siguientes pruebas para su identificación: Morfología, movilidad, hemólisis, metabolismo oxidativo/fermentativo (OF), catalasa, oxidasa, crecimiento sobre agar Mac Conkey (BBL, Cockeysville, Md) y agar SS(BBL, Cockeysville, Md), utilización de citrato, producción de ureasa, reducción de nitratos, producción de indol, crecimiento en agar Tres Azúcares y Hierro (TSI) (Merck, México), producción de H₂S, hidrólisis de la gelatina, hidrólisis de la Esculina (Ruíz-Castañeda, 1986; Alton y col., 1975).
 - 5.- Para la identificación del biotipo, se tomó en cuenta las siguientes pruebas: requerimiento de CO₂, producción de H₂S, tiempo que tarda en hidrolizar la Urea, crecimiento en colorantes de tionina, fucsina y cristal violeta (SIGMA, St. Louis, Mo), aglutinación en sueros monoespecíficos B y M (DIFCO, Detroit, Mi) (Ruíz-Castañeda, 1986; Alton y col., 1975).

Análisis Físicoquímico

Actividad de Agua

Para la determinación de la actividad de agua (AW), se empleó un Termopar Swiss, Beckman Industrial (Cedar Grove, N. J., USA). Una muestra del queso bien homogenizado, se colocó en el portamuestras hasta que se estabilizaba la lectura (Kosikowski, 1982; APHA, 1992).

Humedad

Se pesaron aproximadamente 2 g de muestra de queso bien homogenizado, se colocaron en una estufa de vacío VWR 1430 (VWR Scientific Inc., Philadelphia, PA 19101-3645) a 60°C, y atmósfera de -30 pulgadas, por 4 horas. Se enfrió y se repitió el proceso de secado nuevamente por 1 hora. Se determinó el contenido de humedad por diferencia de peso (AOAC, 1984, sec. 934.01; APHA, 1992).

pH

Se homogenizaron aproximadamente 50 g de muestra, en un vaso de precipitado, se introdujo el electrodo del potenciómetro Beckman 750 (Beckman Instruments, Fullerton, Ca 250893) y se tomó la lectura, siguiendo la técnica de Kosikowski (1982). El autor recomienda que no se diluya el queso en agua ni otros líquidos, ya que el equilibrio de las sales se altera y el pH puede aumentar hasta 0.3 unidades (AOAC, 1984; APHA, 1992).

Determinaciones Químicas

Sales en forma de cloruros

Se empleó la técnica de la AOAC (1984), Sec 16.272.

Grasa

El contenido de grasa de los quesos se llevó a cabo por medio de la técnica de Babcock modificada por Kosikowski (1982).

Proteína

Se empleó el método de macrokjeldahl descrito en el manual de la AOAC sec 2.057 y 16.274 (1984), empleando el valor de 6.38 como factor de conversión para obtener el porcentaje de proteínas.

Análisis Estadístico

Recuperación.

A los resultados obtenidos se les realizó un análisis de varianza, correlaciones y con comparación de medias usando la prueba de Tukey ($p < 0.1$), por medio del programa estadístico SAS, versión 6.03 (1989).

Incidencia.

Los resultados obtenidos después de realizar el muestreo, se analizaron mediante estadística descriptiva para determinar los porcentajes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Recuperación

Métodos.

En la Tabla 1, se presentan los promedios de la recuperación de Brucella abortus y Brucella melitensis, utilizando el método de cuenta directa (1) y el método con pre-enriquecimiento (2), los cuáles presentan diferencias estadísticamente significativas, siendo mayor la recuperación de ambas especies de Brucella por medio del método con pre-enriquecimiento, se logró obtener una recuperación mayor del 50%, respecto al cultivo inicial, la utilización de un pre-enriquecimiento ayuda a disminuir las pérdidas de bacterias deprimidas o dañadas, al proporcionarles los nutrientes necesarios en forma líquida se les permite el crecimiento en forma libre y actúa como un medio de concentración, principalmente si se emplean sustancias antimicrobianas que suprimen la flora contaminante que inhibe el crecimiento de las especies de Brucella. El método de cuenta directa en placa (1) mostró recuperación menor del 50%, además, se observó durante el transcurso del trabajo, que las colonias crecidas por medio de éste método se mostraban mas pequeñas y opacas y podían contarse hasta los 3 - 4 días de incubado el medio de cultivo, mientras que al utilizar el método 2 las lecturas se podían hacer entre las 48 - 72 horas.

Tabla 1. Promedios de recuperación para Brucella abortus y Brucella melitensis, empleando los dos métodos de cultivo.

<u>Brucella abortus</u>	
Cultivo inicial 3×10^9 UFC/ml	
Método	% de Recuperación ^a
1 Cuenta directa	45.6
2 Pre-enriquecimiento	54.5

<u>Brucella melitensis</u>	
Cultivo inicial 2×10^9 UFC/ml	
Método	% de Recuperación ^a
1 Cuenta directa	50.0
2 Pre-enriquecimiento	68.6

^a Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

En la Figura 1 se muestra la comparación en la recuperación de Brucella melitensis por los métodos de cuenta directa (1) y con pre-enriquecimiento (2), donde se observa que al emplear el método 2 existe una mayor recuperación (alrededor de 7 ciclos logarítmicos), los primeros días del análisis, por arriba de la media de recuperación (6.4 ciclos logarítmicos), hasta el día 14, que es cuando empieza el descenso en las cuentas, sin embargo, en el día 21, aún se presentan cuentas bacterianas importantes en la recuperación de la bacteria. Al utilizar el método de la cuenta directa (1), el número de bacterias se mantiene constante (alrededor de 4 ciclos logarítmicos), hasta el día 8, en que ya está por debajo de la media de recuperación y al final del día 21, se puede observar una sobrevivencia similar al método 2.

Para Brucella abortus, se presentan resultados similares, los cuáles pueden observarse en la Figura 2, con el método 1 se presentan cuentas bacterianas con un promedio de 4.3 ciclos logarítmicos, con descenso de las cuentas a los 6 días y con el método 2 se presentan cuentas superiores a los 6 ciclos logarítmicos los primeros días, disminuyendo las cuentas a los 9 días, con un promedio de recuperación 5.2 ciclos logarítmicos. En la recuperación de Brucella abortus se observa una drástica disminución de las cuentas, en forma independiente del método utilizado, que puede ser debido a la variación entre las especies, como lo reportaron Bundle y col. (1987) e INDRE (1990), ya que la presencia de los diferentes tipos y cantidad de lipopolisacáridos, los componentes de la pared celular y sus necesidades nutricionales y ambientales, los que van a proporcionarle a las especies bacterianas

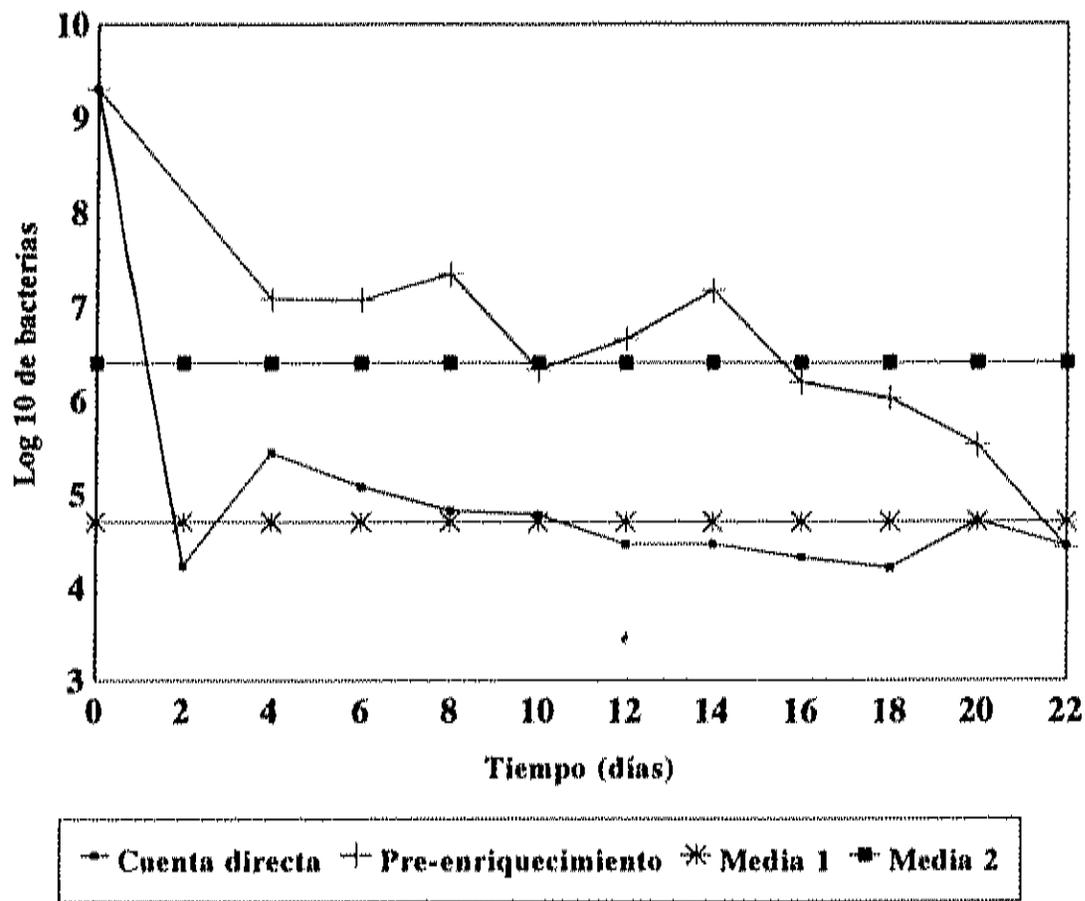


Figura 1. Recuperación de *Brucella melitensis*, comparando los dos métodos de cultivo, cuenta directa (■) y por el método con pre-enriquecimiento (+).

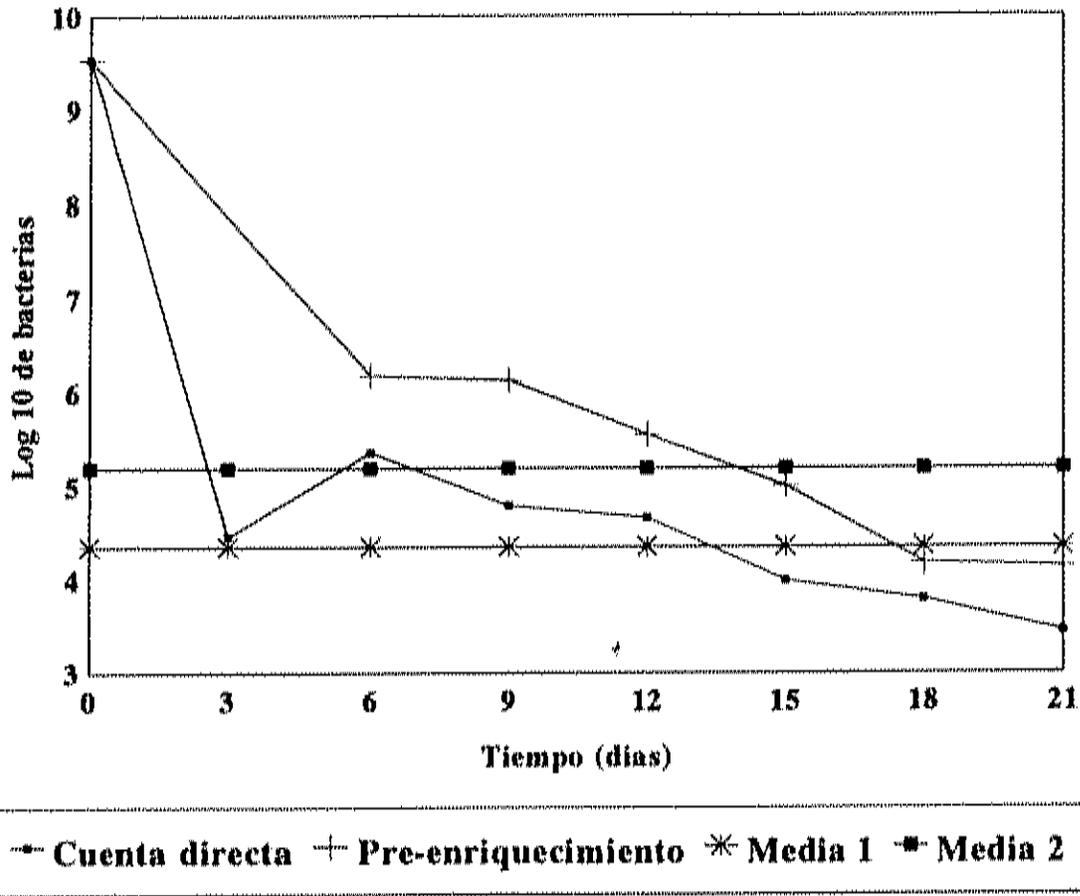


Figura 2. Recuperación de *Brucella abortus*, comparando los dos métodos de cultivo, cuenta directa (■) y por el método con pre-enriquecimiento (+).

características diferenciales de resistencia al medio ambiente, razón por la cuál Brucella melitensis presentó ventajas en la recuperación respecto a Brucella abortus.

Dada la tendencia de las especies de Brucella a sufrir alteraciones en medio líquido, lo ideal es emplear medios sólidos para el aislamiento primario, sin embargo, se ha reconocido la ventaja de cultivar las muestras en medios líquidos como pre-enriquecimiento para el aislamiento primario (medios bifásicos), principalmente cuando las muestras no están muy contaminadas, como es el caso de sangre. Cualquier inconveniente atribuible al empleo de medios líquidos se subsana en parte haciendo resiembras en medio sólido tan pronto como sea posible (Ruíz-Castañeda, 1986). No fué posible hacer una comparación acerca de nuestros resultados, ya que en ningún reporte encontramos la utilización del medio líquido para enriquecer queso o leche, sólo para muestras de sangre y médula osea, que se emplea el medio bifásico de Ruíz-Castañeda (Alton y col., 1975), o bien el medio de Brodie y Stinton que ha sido usado para el enriquecimiento de Brucella en muestras muy contaminadas (Corbel, 1985).

Davies y Casey (1973); Salem y col (1977) y Kaplan (1962), reportaron diferentes períodos de sobrevivencia de las especies de Brucella en una gran variedad de productos lácteos, aparte de la leche, pero no se reportaron cantidades, solo el número de días que el organismo logra sobrevivir en el alimento. Después de los 22 días de almacenamiento a 5° C del queso empleado en éste trabajo, aún se tienen cuentas importantes de bacterias independientemente del medio de cultivo que se emplee, no se le dió un seguimiento a las bacterias hasta que desaparecieran

totalmente, ya que el objetivo del estudio no era determinar el tiempo que permaneciera viable, sino el determinar cuál es el método que nos de mayores cuentas bacterianas de Brucella en un período de 21 días, que son los días en que se tarda una muestra para reportarse negativa, en la cuál se está buscando la presencia de Brucella, por lo cuál no se determinaron los días que la bacteria permanece viable en el tipo de queso empleado.

Enriquecimientos.

En las Figuras 3-6, se observa el comportamiento de las dos especies comparando el método, en combinación con los enriquecimientos y el medio de cultivo. Se emplearon dos enriquecimientos para el aislamiento de las especies de Brucella, como formulaciones selectivas en medio basal, siendo 5% de suero de caballo más 1% de dextrosa y 2% de glicerol más 1% de dextrosa. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos enriquecimientos ($P < 0.01$), para ninguna de las dos especies (Brucella melitensis y Brucella abortus), aún cuando en la literatura se reporta un porcentaje de recuperación mayor empleando suero de caballo como enriquecimiento (Farrell y Robertson, 1972; Corbel, 1985), pero ambos autores compararon el crecimiento de Brucella abortus biotipo 2, que es una cepa muy fastidiosa, en cambio, para la realización de éste trabajo se empleó el biotipo 1 de ambas especies.

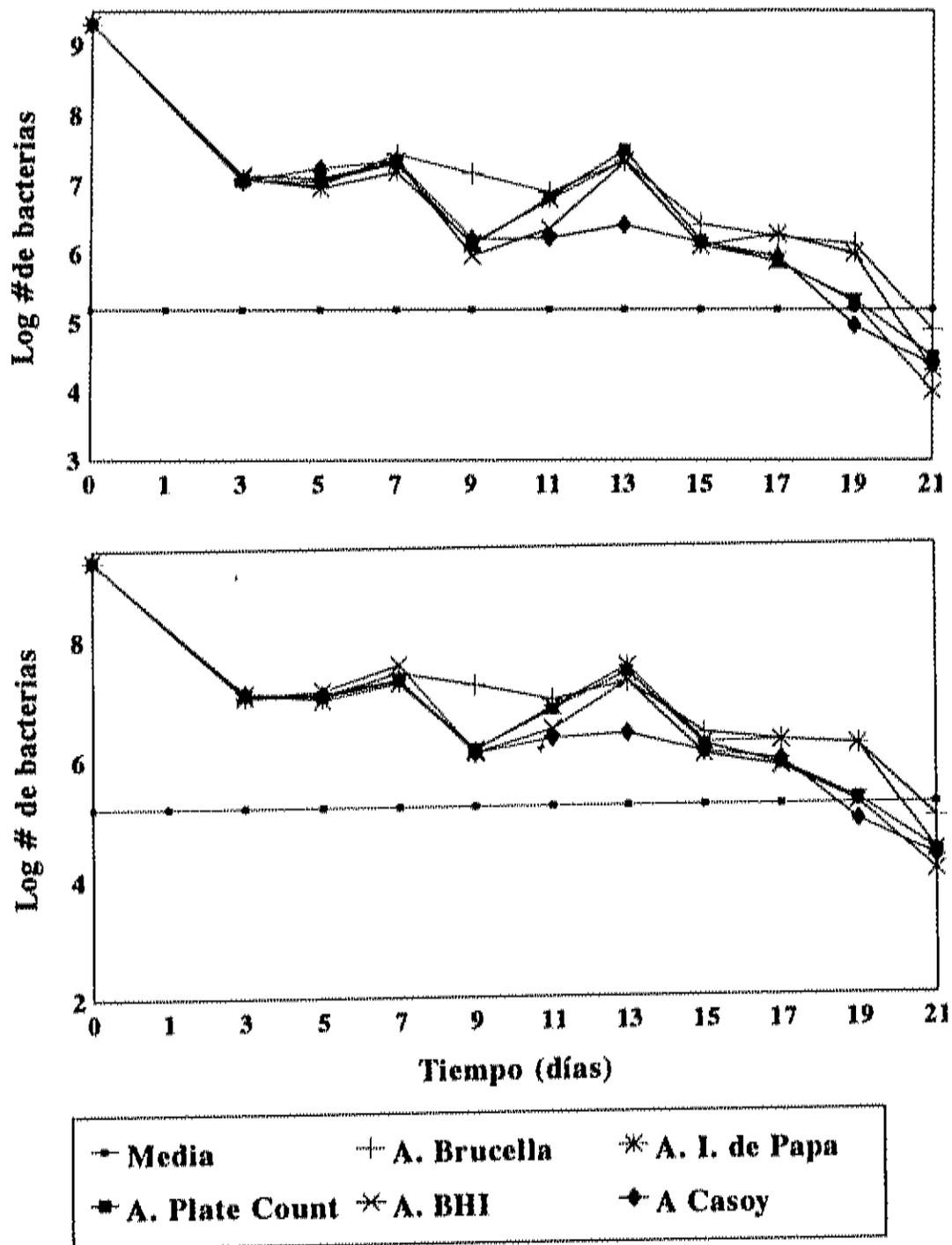


Figura 3. Recuperación de *Brucella melitensis*, por el método con pre-enriquecimiento y medios de cultivo enriquecidos con Suero de caballo + dextrosa (3A) y con glicerol + dextrosa (3B).

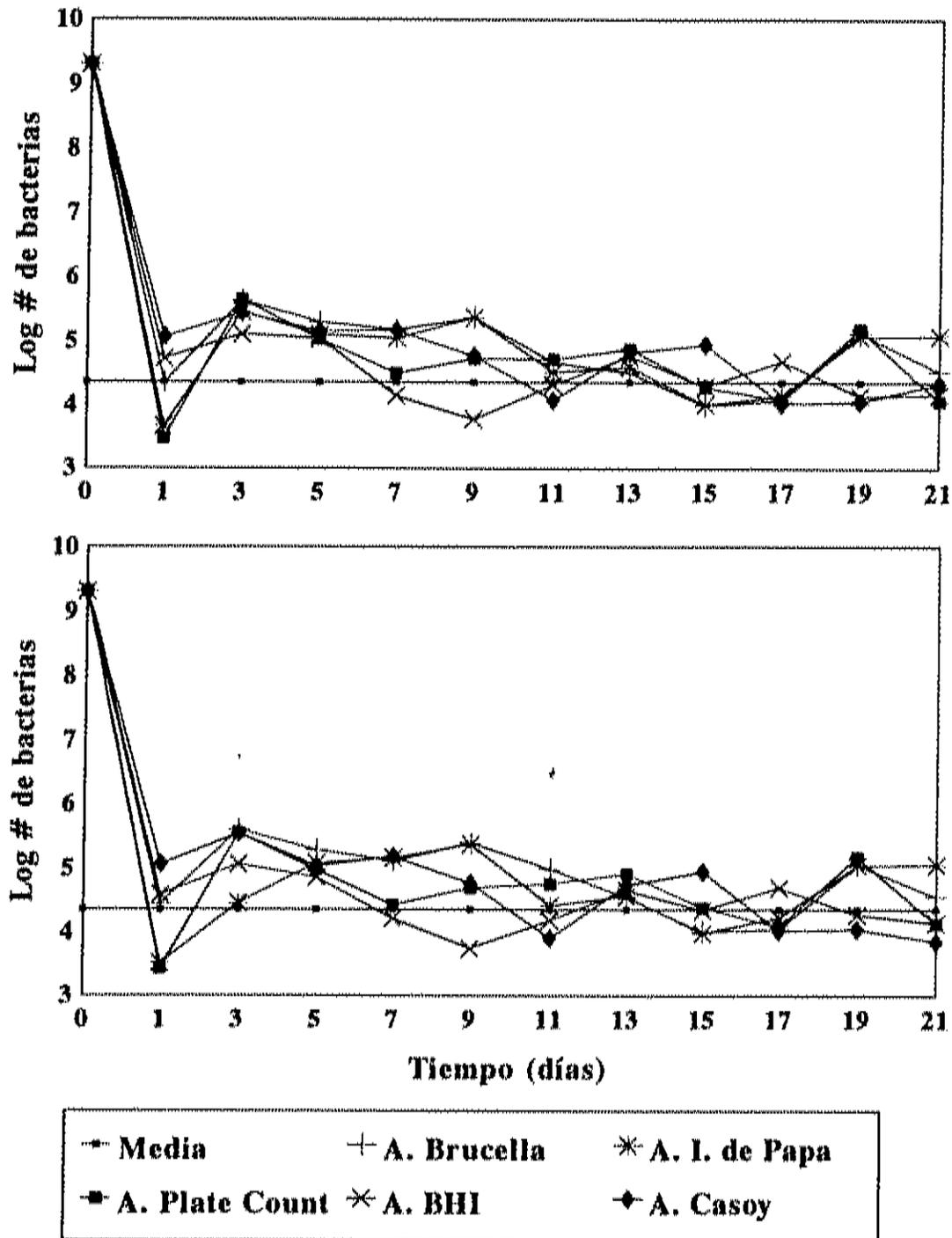


Figura 4. Recuperación de *Brucella melitensis*, por el método de cuenta directa y medios de cultivo enriquecidos con Suero de caballo + dextrosa (4A) y con glicerol + dextrosa (4B).

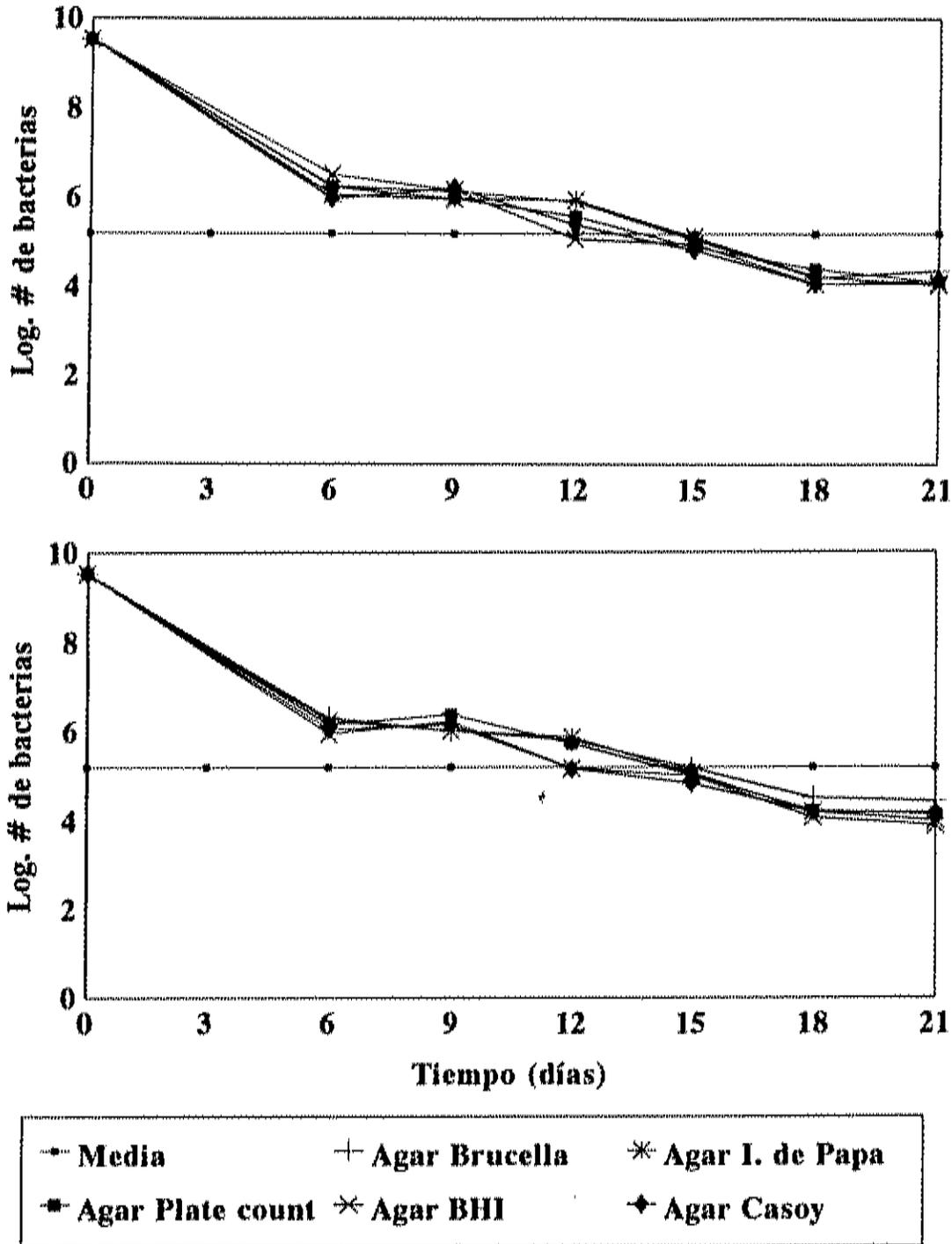


Figura 5. Recuperación de *Brucella abortus*, por el método de pre-enriquecimiento y medios de cultivo enriquecidos con Suero de caballo + dextrosa (5A) y con glicerol + dextrosa (5B).

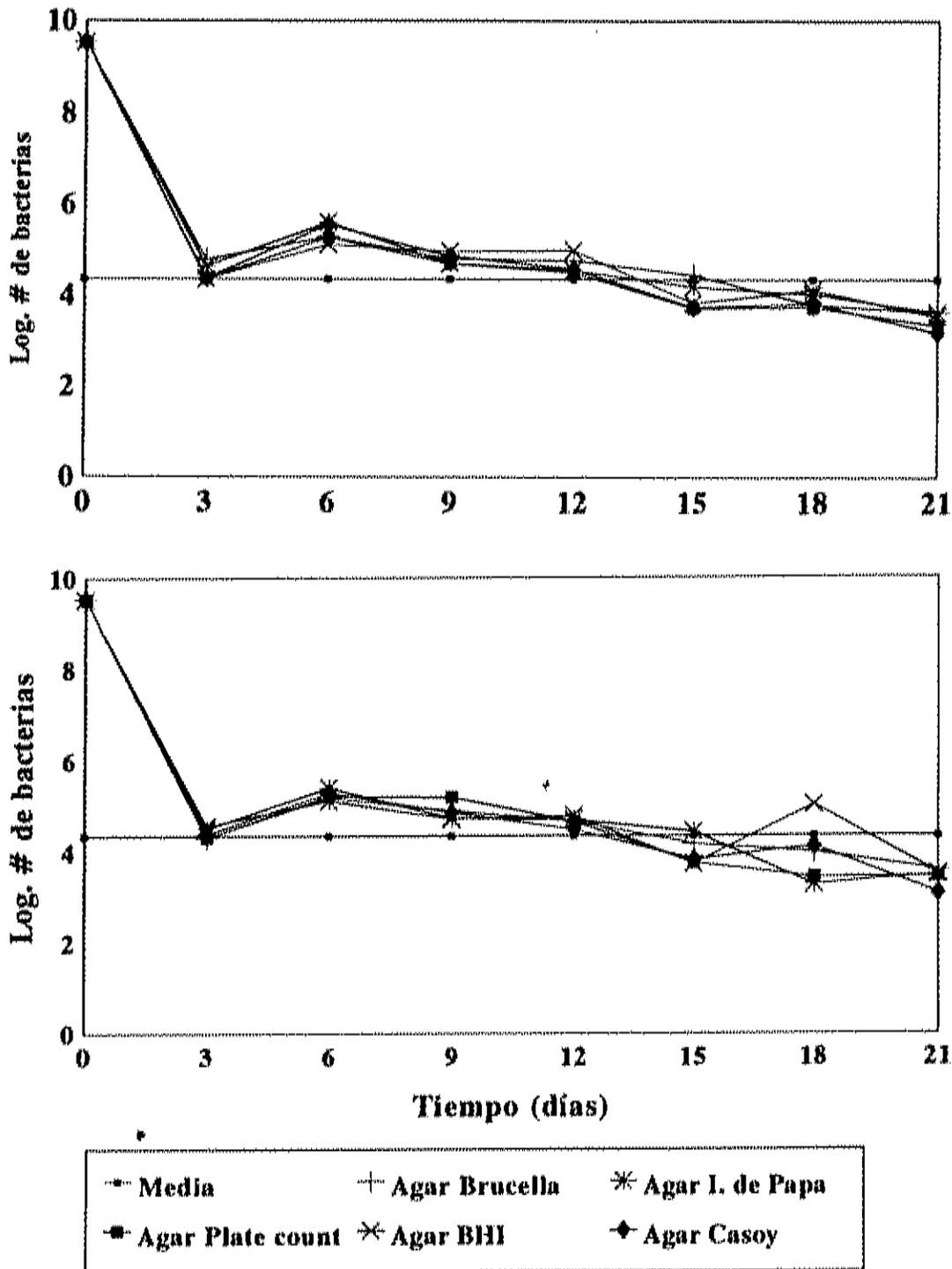


Figura 6. Recuperación de *Brucella abortus*, por el método de cuenta directa y medios de cultivo enriquecidos con Suero de caballo + dextrosa (6A) y con glicerol + dextrosa (6B).

Medios de cultivo.

En la Tabla 2 se presentan los promedios de recuperación de los cinco medios de cultivo empleados en la recuperación de Brucella melitensis y Brucella abortus, mostrando diferencias entre ellos, atribuibles principalmente al método de aislamiento empleado. En ambas especies se observa una mejor recuperación utilizando el agar Brucella y el agar infusión de papa, ya que ambos medios de cultivo fueron desarrollados para el aislamiento primario de ésta bacteria y presentan mayor selectividad y especificidad para el aislamiento, disminuyendo el sobrecrecimiento de la flora contaminante, mientras que los medios para cuenta estandard, agar infusión de cerebro y corazón y agar tripticasa soya se usan como medios generales y permiten un mayor crecimiento de todo tipo de bacterias, principalmente en aislamiento primario, además que se dificulta un poco la identificación de las colonias típicas de Brucella (Merck, 1988; BBL, 1988; Alton y col., 1975).

Por medio de la comparación de medias de la prueba de Tukey, se determinó el orden de la recuperación para Brucella melitensis con los diferentes medios de cultivo empleados y quedó de la siguiente manera: Agar Brucella > Agar Infusión de Papa > Agar Plate count > Agar Tripticasa Soya > Agar Infusión de Cerebro y Corazón. Para Brucella abortus el orden de recuperación en los medios de cultivo, en forma decreciente, fué Agar Brucella > Agar Infusión de Papa > Agar Infusión de Cerebro y Corazón > Agar Tripticasa Soya > Agar Plate Count.

Tabla 2. Log_{10} de las cuentas bacteriológicas promedio de los medios de cultivo empleados en la recuperación de Brucella abortus y Brucella melitensis.

MEDIO DE CULTIVO	PROMEDIO LOG_{10} DEL No. BACTERIAS¹
<u>Brucella abortus</u>	
Agar <u>Brucella</u>	4.86 ^a
Agar Infusión de Papa	4.81 ^{a,b}
Agar Plate Count	4.65 ^c
Agar Infusión Cerebro y Corazón (BHI)	4.70 ^{c,b}
Agar Tripticasa Soya (Casoy)	4.66 ^c
<u>Brucella melitensis</u>	
Agar <u>Brucella</u>	5.69 ^a
Agar Infusión de Papa	5.54 ^b
Agar Plate Count	5.39 ^c
Agar Infusión Cerebro y Corazón (BHI)	5.30 ^d
Agar Tripticasa Soya (Casoy)	5.39 ^c

¹ Letras iguales, no hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$).

Análisis Físicoquímicos

En la Tabla 3 se observa un promedio de las características físicoquímicas de los quesos empleados en la recuperación de Brucella abortus (A) y Brucella melitensis (M). Puede observarse que ambos quesos no cumple con los estándares de calidad establecidos por la Ley de Salud, (Diario Oficial de la Federación, 1988), en el contenido de cloruros (2.0 a 3.9%) y los valores de pH (5.3), de igual forma, el queso A no cumple con los estándares máximos de grasa (20%), mientras que el queso M no cumple con el valor máximo de humedad (58.0%), sin embargo, la variabilidad de las características físicoquímicas son muy comunes en nuestra región, ya que son dependientes del sistema de producción que se tenga y principalmente de la alimentación del ganado. Estas características físicoquímicas concuerdan con las obtenidas por Armenta (1992), en un trabajo donde llevó a cabo determinaciones químicas de queso fresco regional producido en la ciudad de Hermosillo, Sonora.

Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre la recuperación el contenido de grasa y cloruros ($p < 0.01$). Los resultados concuerdan con los obtenidos por Salem y col. (1977), cuando elaboró diferentes tipos de queso con leche contaminada con B. abortus, encontró que en quesos con un contenido de sal de 7-9%, permanece viable hasta por 24 días, mientras que en concentraciones de sal de 4-6% se detectaba hasta por 32 días y en concentraciones de 1-2%, la sobrevivencia era de 8 días. En los quesos frescos elaborados en el laboratorio se

Tabla 3. Resultados¹ de las características químicas de los quesos empleados en la recuperación de Brucella abortus (A) y Brucella melitensis (M).

P A R A M E T R O						
QUESO	GRASA ² %	pH	CL ³ %	Aw	PROTEINA ² %	HUMEDAD %
A	18.3	6.3	1.81	0.967	21.4	52.0
M	21.5	6.3	1.44	0.968	18.5	59.4
STD ¹	20.0 ⁴	5.3	2.0-3.9	NO	18.0 ⁴	58.0 ⁵

¹ Medias de dos repeticiones.

² En base húmeda.

³ Estandar de calidad, Ley General de Salud (Diario Oficial de la Federación, 1988).

⁴ Mínimo permitido.

⁵ Máximo permitido.

CL = Sal en forma de cloruros.

NO = No se encontró Norma Oficial para éste parámetro.

encontraban concentraciones de sal de 1.81 y 1.44% para los quesos A y M respectivamente y a los 21 días aún se podían tener cuentas significativas de la bacteria. Cabe mencionar que los quesos elaborados por Salem y col.(1977), presentaban una acidéz muy alta, mientras que el tipo de queso elaborado por nosotros tiene como característica la de contar con baja acidéz, lo que favorece la sobrevivencia de ambas especies de la bacteria.

Otro factor que juega un papel muy importante en la viabilidad de las especies de Brucella es el contenido de grasa presente en el queso, a menor contenido de grasa, menor es el tiempo de sobrevivencia, ya que carecen de ésta protección. El queso elaborado en el laboratorio para la recuperación de Brucella abortus presentó un contenido de grasa menor (18.3%), que el queso elaborado para la recuperación de Brucella melitensis (21.5%), reflejándose ésto en las cuentas bacterianas obtenidas y la sobrevivencia a los 21 días, que fueron mayores para Brucella melitensis.

De igual forma, la recuperación de las especies de Brucella en productos lácteos se ve influenciada por el pH. Según estudios realizados por Sabbaghian (1975) y por Davies and Casey (1973), encontraron que a pH entre 4.5 - 7.6 el organismo permanecía viable hasta por 8 semanas y el rango de pH presentado por el queso elaborado en el laboratorio está dentro de éstos límites, por lo que no tuvo ninguna influencia en la recuperación del organismo ($p < 0.01$).

El resto de los parámetros no presentaron ningún efecto para la recuperación de las especies de Brucella ($p > 0.01$). Se observó además, una correlación inversa

entre A_w con grasa y cloruros ($p < 0.01$), es decir, mientras A_w disminuye, aumenta la grasa y cloruros en forma significativa, en cambio para A_w y humedad, la correlación es directa, disminuyendo las dos conjuntamente.

La actividad de agua (A_w), ha sido otro de los parámetros que pueden influir en la sobrevivencia microbiana en diferentes alimentos, ya que a valores menores de 0.9 de A_w , el crecimiento bacteriano disminuye, pero en éste caso, la variabilidad presentada por los quesos es muy pequeña (0.967 para A y 0.968 para M), no presentó ningún efecto sobre el crecimiento y la recuperación de las bacterias (Troller, 1980).

Incidencia

Se analizaron 335 muestras de queso provenientes de Cd. Obregón y Guaymas, de las cuáles 25 (7.5%) fueron positivas para Brucella. El porcentaje obtenido de muestras positivas difiere de un trabajo hecho por Herrera-Alberu (1984) en la Cd. de Guanajuato, trabajó con 40 muestras de queso y que obtuvo 4 (10%) muestras positivas, 23 muestras de crema y obtuvo 2 (8.7%) muestras positivas y con 66 muestras de leche, obtuvo 9 (13.6%) positivas para Brucella.

La determinación de las especies se llevó a cabo por medio de pruebas bioquímicas, crecimiento en colorantes y aglutinación con sueros poli y monovalentes. En la Tabla 4 se muestran las especies aisladas de queso fresco regional, donde se puede observar que la especie predominante es Brucella abortus,

con 16 cepas, de las cuáles, 7 son biotipo 1. Así mismo, se aislaron 5 cepas de Brucella melitensis, la presencia de ésta bacteria en el queso puede ser indicativo de mezclas de leche de vaca y cabra para elaborar el queso, ya que Brucella melitensis biotipo 1, tiene como hospedero principal a las cabras, aunque en ocasiones también puede infectar al ganado vacuno, sobre todo si se pastorea junto ganado caprino y bovino y existe una alta incidencia de brucelosis en ambas especies (Alton, 1987; Meyer, 1990), como es el caso de América Latina (Currier, 1989; Davidson y col., 1990). Además el hecho de aislar B. melitensis a partir de leche bovina es preocupante, ya que ésta especie es la que mas frecuentemente se encuentra involucrada en la brucelosis humana y su presencia en un alimento que presenta un alto consumo, va a potencializar el riesgo para la población de adquirir la enfermedad (Ruíz-Castañeda, 1986; Meyer, 1990).

Se aislaron 4 cepas de Brucella, pertenecientes a las atípicas, las cuáles no respondieron en forma común al resto de los aislamientos, por lo que no se les pudo agrupar con ninguno de los biotipos, no es una situación poco común en nuestro país, ya que existen algunos reportes de trabajos donde se incluyó a éste tipo de bacterias, como el realizado por Méndez y Vargas (1988), donde determinaron la sensibilidad antimicrobiana de Brucella sp, trabajando con 13 cepas atípicas que han sido aisladas en diferentes Estados de la República y que se encuentran formando parte del cepario de INDRE.

Tabla 4. Especies de Brucella aisladas de queso fresco regional proveniente del Municipio de Cajeme y Guaymas, Sonora.

No. de muestras	Especie	Biotipo
7	<u>B. abortus</u>	1
4	<u>B. abortus</u>	7
3	<u>B. abortus</u>	4
2	<u>B. abortus</u>	5
5	<u>B. melitensis</u>	1
4	<u>Brucella sp</u>	Atípicas

La determinación de los biotipos obtenidos en éste trabajo, coincide con los encontrados en estudios posteriores realizados en el Estado de México (Luna y col., 1989), de diferentes productos lácteos y de muestras clínicas, mientras que en Jalisco (Ramírez y col., 1989), trabajando con muestras de leche para B. melitensis se aisló únicamente el biotipo 1. En el trabajo realizado por Herrera-Abreu (1984), no se determinaron las especies y biotipos de Brucella aislados.

Además en el presente trabajo se aisló B. abortus biotipos 4, 5 y 7, de los cuáles, el biotipo 5 ya se ha aislado en nuestro país (Luna y col., 1989), pero de los biotipos 4 y 7, no se tienen datos de reportes previos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Recuperación

* Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los métodos de cultivo: cuenta directa (1) y con pre-enriquecimiento (2), presentando una mayor recuperación el método 2, mayor del 50%, ya que la utilización de un pre-enriquecimiento ayuda a disminuir las pérdidas de bacterias deprimidas o dañadas.

* No se encontraron diferencias entre los dos enriquecimientos empleados, suero de caballo + dextrosa y glicerol + dextrosa, aún cuando en la literatura se reportó un porcentaje de recuperación mayor empleando suero de caballo como enriquecimiento.

* Los medios de cultivo presentaron diferencias con ambas especies, para la recuperación de Brucella melitensis el orden fué: Agar Brucella > Agar Infusión de Papa > Agar Plate count > Agar Tripticasa Soya > Agar Infusión de Cerebro y Corazón, presentando una recuperación similar el medio Infusión de Papa y Plate Count, así como los medios Plate Count y Tripticasa Soya. Para Brucella abortus el orden de recuperación de los medios de cultivo fué: Agar Brucella > Agar Infusión de Papa > Agar Infusión de Cerebro y Corazón > Agar Tripticasa Soya > Agar Plate Count, siendo similares las cuentas de los medio Infusión de Papa y Agar Infusión de Cerebro y Corazón, así como éste último y Agar Tripticasa Soya.

* Se observó que la diferencia en la recuperación dependía del método y medio de cultivo, se recuperó mayor número de bacterias empleando el método 2 y se podía llevar a cabo la cuenta bacteriana a las 48 horas, en cambio con el método 1, era menor el número de colonias, mas pequeñas y se podían contar hasta el tercer o cuarto día de realizada la siembra.

* En cuanto a la variabilidad de recuperación entre las dos especies, se encontró que Brucella melitensis se aisló en mayor cantidad, siendo mas notable, cuando se utiliza el método 2, independientemente del medio de cultivo utilizado. Se obtuvieron cuentas superiores a la media de recuperación (6.4 ciclos logarítmicos). Con el método 1, se obtuvieron recuperaciones de la bacteria en forma muy irregular, se presentaron cuentas inferiores a la media de la recuperación (4.7 ciclos logarítmicos).

En el aislamiento de Brucella abortus, por medio del método 2, se observó un fenómeno distinto, ya que los primeros 10 días son los únicos en que se obtuvieron cuentas superiores a la media de la recuperación (5.2 ciclos logarítmicos). Con el método 1, se obtuvieron cuentas superiores a la media del crecimiento (4.3 ciclos logarítmicos), durante los primeros 10 días, disminuyendo de igual manera que para el método 2.

* Se observó una correlación en la recuperación de B. abortus y el contenido de grasa y cloruros, a medida que los valores de grasa y cloruros aumentan, la recuperación disminuye, para B. melitensis, no se encontró ninguna correlación.

Incidencia

* De las 335 muestras de queso analizadas 25 (7.5%) fueron positivas y la especie predominante fué Brucella abortus, con 16 cepas, de las cuáles, 7 son biotipo 1.

* Se aislaron 5 cepas de Brucella melitensis biotipo 1.

* Se aislaron 4 cepas de Brucella atípicas.

* Se aislaron cepas B. abortus biotipos 4, 7 y 5.

Por los resultados del presente trabajo y la importancia que la brucelosis tiene en nuestro Estado, es de vital importancia conocer la o las especies involucradas en la enfermedad en animales y humanos, para poder ofrecer medidas de control en la propagación de la bacteria y poder ayudar de alguna manera a las campañas de erradicación de la enfermedad.

Se recomienda que se lleve a cabo la identificación de las especies y los biotipos por medio de técnicas que aseguren su recuperación, aún cuando sean costosas, como lo es el uso de un pre-enriquecimiento, si al final vamos a tener un resultado satisfactorio y confiable.

BIBLIOGRAFIA

- A. O. A. C. 1984. Official Methods of Analysis of the AOAC. 14th edition. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Va. U. S. A.
- A. P. H. A. 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. R. T. Marshall, editor. American Public Health Association. Washington, D. C., U. S. A.
- Abdussalam, M. and D. A. Fein. 1976. Brucellosis as a World Problem. Develop. Biol. Standard. 31:9-23.
- Aguilar B., L. 1987. Brucellosis en el Hombre. Salud Pública. Síntesis Lechera. 2(7):33-34.
- Alarcón, G. S., E. Gotuzzo, T. S. Bocanegra, O. Castañeda, A. Calvo, C. Carrillo, R. C. P. Go. R. T. Acton and B. O. Barger. 1985. Familial Studies in Human Brucellosis. Tissue Antigens. 26:77-79.
- Alarcón, G.S., T.S. Bocanegra, E. Gotuzzo and L.R. Espinoza. 1987. The Arthritis of Brucellosis: A Perspective One Hundred Years After Bruce's Discovery. The J. of Rheumathol. 162:1083-1084.
- Alton, G.G. 1987. Control of Brucella melitensis Infection in Sheep and Goats-A Review. Trop. Anim. Hlth. Prod. 19:65-74.
- Alton, G.G., L.M. Jones and D.E. Pietz. 1975. Laboratory Techniques in Brucellosis. II ed. World Health Organization Editors. Geneva.
- Anónimo. 1985. El Queso-Un Regalo de los Dioses. Las Queserías Celestiales. Industria Alimentaria. 7(2):16-19.
- Anónimo. 1989. Qué es la Leche? Cómo se Obtiene?. Artículos Técnicos. Síntesis Lechera. 4(10):58-60.
- Anónimo. 1990. Microorganismos que Modifican y Contaminan la Leche. Artículos Técnicos. Síntesis Lechera. 5(1)38-41.
- Armenta, O.R. 1992. Evaluación Bacteriológica y Química de Queso Fresco Regional y su Relación con el Contenido de Tiramina e Histamina. Tesis de Maestría. C.I.A.D.A. C. Hermosillo, Sonora. México.

- Auclair, J., J.P. Accolas, L. Vassal and G. Macquot. 1981. Microbiological Problems in Cheese Manufacture. Bull IDF. 136:20-26.
- Ballesteros, V., M. N. 1989. Valor Proteínico de la Dieta Sonorense. Tesis de Maestría. CIAD, A.C.Hermosillo, Sonora.
- Battistotti, B., V. Bottazzi, A. Piccinardi and G. Volpato. 1985. Cheese: A Guide to the World of Cheese and Cheesemaking. Facts Oile Publications. New York. pp 10-34.
- BBL. 1988. Manual of BBL. Products and Laboratory Procedures. Beckton Dickinson Microbiology Systems. U.S.A pp 123-125, 119-120, 168-169, 249-250 y 271-272.
- Bosseray, N. 1987. Brucella Infection and Immunity in Placenta. II Forum in Microbiology. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 138:110-113.
- Brinley-Morgan, W. J. and N. B. McCullough. 1975. Genus Brucella. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Eight edition. R. E. Buchanan and N. E. Gibbons editors. The William and Wilkins Co. ed. Baltimore, U.S.A. pp 278-282.
- Bundle, D. R., J. W. Cherwonogrodsky, M. Caroff and M. B. Perry. 1987. The Lipopolysaccharides of Brucella abortus and B. melitensis. II Forum in Microbiology. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 38:92-98.
- Campa, S. 1992a. Campaña Contra la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis. Fomento Ganadero. 37(Marzo-Abril):13-16.
- Campa, S. 1992b. Comité de Campaña de Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis en el Estado de Sonora. 39(Julio-Agosto). 14-17.
- Canning, P.C. 1990. Phagocyte Function in Resistance to Brucellosis. Chapter eleven. In Advances in Brucellosis Research. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 151-163.
- Canning, P.C., J.A. Roth, L.B. Tabatabai and B.L. Deyoe. 1985. Isolation of Components of Brucella abortus Responsible for Inhibition of Function in Bovine Neutrophils. The J. of Infect. Dis. 152(5):913-921.
- CDC, 1990. Center for Disease Control. Brucellosis. In Control of Communicable Diseases in Man. Abraham S. Bennenson, editor. XV ed. American Public Health Association. Washington, D.C. U.S.A. pp 66-69.

- Chappel, R.J. 1989. Diagnosis of Bovine Brucellosis: Principles, Practice and Problems. *Surveillance. Vet. Rep.* 16(2):3-6.
- CIPES, 1982. Resultados Preliminares Sobre la Prevalencia de Brucelosis de Bovinos del Estado de Sonora. Centro de Investigaciones Pecuarias del Estado de Sonora. INIP-SARH, GOB.EDO.SON. U.G.R.S.pp 138-140.
- Collins, C.H. and D.A. Kennedy. 1987. Microbiological Hazards of Occupational Needlestick and "Sharps" Injuries. *The J. of Appl. Bacter.* 62(5):385-402.
- Corbel, M.J. 1985. Bacteriological Procedures in the Diagnosis of Brucella melitensis Infection. In Brucella melitensis. J. M. Verger and M. Plommet Editors. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. The Commission of the European Communities. England. pp 105-122.
- Corbeil, L. B., K. Blau, T. J. Insana, K. H. Nielsen, R. H. Jacobson, R. R. Corbeil and A. J. Winter. 1988. Killing of Brucella abortus by Bovine Serum. *Infect. Immun.* 56:3251-3260.
- Corner, L. A., G. G. Alton and H. Iyer. 1987. Distribution of Brucella abortus in Infected Cattle. *Aust. Vet. J.* 64(8):241-244.
- Cosseddu, A. M. and S. Pisanu. 1985. Survival of Brucella melitensis in Goat Cheese. *ATTI Della Società Italiana Delle Scienze Veterinarie.* XXXIX(II):624-626.
- Currier, R. 1989. Brucellosis. *Zoonosis Update. J. A. V. M. A.* 195(5):595-597.
- Das, A.M. and V.L. Paranjape. 1987. Comparison of Brucella-Stabilized Antigen Plate Test and Rose Bengal Test in the Rapid Diagnosis of Brucellosis. *Indian Vet. J.* 64(7):894-895.
- Davidson, A., A. Shimshony, H. Adler, M. Banai and A. Cohen. 1990. Protection of Brucellosis-Free Areas from Reinfection. Chapter Twenty-seven. In *Advances in Brucellosis Research*. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 151-163.
- Davis, G. and Casey, D. 1973. The Survival of Brucella abortus in Milk and Milk Products. *Br. Vet. J.* 129:345-353.
- Departamento de Epidemiología de los Servicios Medicos de Sonora (SEMESON). 1994. Comunicación Personal.

- Diario Oficial de la Federación. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Organo del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos.
- Dohoo, J. R., P. F. Wright, G. M. Ruckerbauer, B. S. Samagh, F. J. Robertson and L.B. Forbes. 1986. A Comparison of Five Serological Test for Bovine Brucellosis. *Can. J. Vet. Res.* 50:485-493.
- Dubray, G. 1987. Protective Antigens in Brucellosis. II Forum in Microbiology. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138:84-87.
- Dubray, G. and J. Limet. 1987. Evidence of Heterogeneity of Lipopolysaccharides Among Brucella Biovars in Relation to A and M Specificities. II Forum in Microbiol. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138:27-37.
- Eckman, M. R. 1975. Brucellosis Linked to Mexican Cheese. *J.A.M.A.*232(6):636-637.
- Ewalt, D. R. and L. B. Forbes. 1987. Atypical Isolates of Brucella abortus From Canada and the United States Characterized as Dye Sensitive with M Antigen Dominant. *J. Clin. Microbiol.* 25(4):698-701.
- F. D. A. 1984. Bacteriological Analytical Manual. 6th edition. U. S. Food and Drug Administration. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Va., U.S.A.
- Farina, R. 1985. Current Serological Methods in B. melitensis Diagnosis. In Brucella melitensis. J. M. Verger and M. Plommet. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. The Commission of the European Communities, England. pp 123-138.
- Farrell, I. 1974. The Development of a New Selective Medium for The Isolation of Brucella abortus from Contaminated Sources. *Rev. Vet. Sci.* 16:280-286.
- Farrell, I.D. and L. Robertson. 1972. A Comparison of Various Selective Media, Including a New Selective Medium for the Isolation of Brucellae From Milk. *The J. of Appl. Bact.* 35(4):625-630.
- Fekete, A., J. Bante, S. M. Halling and M. R. Sanborn. 1990. Preliminary Development of a Diagnostic Test for Brucella Using Polymerase Chain Reaction. *J. of Appl. Bacteriol.* 69:216-227.

- Ficht, T. A., S. W. Bearden and H. Marquis. 1990. Phylogenetic Markers to Describe Brucella abortus. In *Advances in Brucellosis Research*. L. G. Adams Editor. Chapter Three. Texas A & M Press. U.S.A. pp 36-52.
- Flesch, I. E. A. and S. H. E. Kaufmann. 1990. Cell-Mediated Immunity Against Intracellular Bacteria. Chapter eight. In *Advances in Brucellosis Research*. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 121-136.
- Florida Cattleman, The. 1987. No Compre Brucelosis. *Medicina Preventiva. Síntesis Lechera*. 2(7):30-34.
- Flowers, R. S., W. Anderson, C. W. Donnelly and E. Koenig. 1992. Pathogens in Milk and Milk Products. Chapter 5. In *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. R. T. Marshall editor. 16th edition. American Public Health Association. Washington, D.C. U.S.A. pp 103-212.
- Fox, P. F. 1987. Cheese: An Overview. In *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. P. F. Fox Editor. Vol. I. General Aspects. Elsevier Applied Science. U. S. A. pp 1-32.
- Freeman, A. 1974. BRUCELLA. En *Tratado de Microbiología*. Ed. W. Burrows. Ed. Interamericana. México. pp 472-480.
- García-Carrillo, C., A. Turovetzky y N. Lucero. 1985. Especies y Biotipos de Brucella Aisladas del Hombre en la Argentina. *Medicina*. Buenos Aires. 45:20-21.
- Gargani, G. and A. Picetti. 1985. Attempts to Use Phage-Typing in the Epidemiology of Brucellosis. In Brucella melitensis. J. M. Verger and M. Plommet Editors. The Comission of the European Communities. England. pp 7-20.
- Gay, J. 1992. Cinco Años: Plazo Límite Para Acabar con la Tuberculosis y Brucelosis. *Sanidad Animal, Carne y Leche*. 1:9-16.
- Hamman, J. 1991. Milking Hygiene, Milking and mastitis. *Dairy, Food and Environm. Sanit*. 11(5):260-264.
- Harper, W.J. and T. Kristoffersen. 1985. General Technology of Cheese Manufacture. *J. Dairy Sci*. 68:1616-1619.
- Hansen, R. G. and D. M. Carlson. 1986. An Evaluation of the Balance of Nutrients in Milk. *J. Dairy Sci*. 69:651-673.

- Heck, F. C., J. D. Williams, J. Pruett, R. Sanders and D. L. Zink. 1980. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Antibodies of Brucella abortus in Bovine Milk and Serum. *Am. J. Vet. Res.* 41(12):2082-2084.
- Herrera-Alberu, M. E. 1984. Determinación de Brucella en Leche, Crema y Queso Fresco Expendidos en la Ciudad de Guanajuato, Gto. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. D. F. Mex.
- Higuera-Ciapara, I. 1987. Dairy Foods and Food Problems in México. Paper Presented at the Cheese Biotechnology and International Food Development Symposium. Cornell University. Ithaca, N. Y., U. S. A.
- Hunter, D. and M. Kearns. 1977. A Comparison of Three Selective Media for the Isolation of Brucella abortus From Contaminated Material. *The British Vet. J.* 133(5):486-489.
- INDRE. 1991. Brucelosis: Avances y Perspectivas. Publicación Técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. No. 6. Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo. Secretaría de Salud. México, D. F.
- Jenness, R. 1986. SYMPOSIUM: Species Variation in Mammary Gland Function. *J. Dairy Sci.* 69:869-885.
- Johnston, A. M. 1990. **FOODBORNE ILLNESS.** Veterinary sources of foodborne illness. *The Lancet.* 336. Oct.6:856-858.
- Johnsons, E. A., J. H. Nelson, M. Johnson. 1990b. Microbiological Safety of Cheese Made from Heat-Treated Milk, Part II. Microbiology. *J. Food Prot.* 53(6):519-540.
- Johnsons, E. A., J. H. Nelson, M. Johnson. 1990c. Microbiological Safety of Cheese Made from Heat-Treated Milk, Part III. Technology, Discussion, Recommendations, Bibliography. *J. Food Prot.* 53(7):610-623.
- Kambal, A. M., E. S. Mahgoub, G. A. Jamjoom and N. H. Chowdhury. 1983. Brucellosis in Riyadh, Saudi Arabia. A Microbiological and Clinical Study. *Royal Tropical Med. and Hig.* 77(6):820-824.
- Kaplan, M. M., M. Absussalam and G. Bijlenga. 1962. Diseases Transmitted Through Milk. In *Milk Hygiene in Milk Production Processing and Distribution.* WHO Monograph Series No. 48. Geneva. pp 31-35.

- Kerkhofs, P., Y. Botton, P. Thiange, P. Dekeyser and J. N. Limet. 1990. Diagnosis of Bovine Brucellosis by Enzyme Immunoassay of Milk. *Vet. Microbiol.* 24:73-80.
- Kosikowski, V. F. 1982. Cheese and Fermented Milk. F. V. Kosikowski y asoc. Brooktondale, N. Y. U.S.A. pp 10-15, 90-108, 560-597.
- Kronenwett, F. R., S. A. Lear and H. J. Metzger. 1954. Thermal Death Time Studies of Brucella abortus in Milk. *J. Dairy Sci.* 17:1291-1302.
- Lanza, H. 1987. Fiebre Caprichosa. *Holstein Amer.* 1(3):32-33.
- Larsen, J. W. A., J. J. Weber and L. D. Edwards. 1988. A Field Outbreak of Bovine Brucellosis-Comparison of CFT, ELISA and Culture Results. *Aust. Vet. J.* 65(1):30-31.
- López, R. 1990. Elaboración Artesanal del Queso. Comunicación Personal. Ejido Estación Zamora, Sonora.
- Luna, M. E., A. A. Jaramillo, M. López. 1989. Estudio de la Brucelosis en Hatos lecheros y su Producción Láctea en el Municipio de Ciudad Netzahualcoyotl, Estado de México. Memorias VI Reunión Anual de Microbiología e Higiene de los Alimentos. 3 y 4 de Noviembre. Guadalajara, Jal. Mex.
- Martin, N. L. and R. E. Hancock. 1990. Function and Structure of the Major Components of the Outer Membrane of Gram Negative Bacteria. In *Advances in Brucellosis Research*. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 55-75.
- Meador, V. P. and B. L. Deyoe. 1989. Intracellular Localization of Brucella abortus in Bovine Placenta. *Vet Pathol.* 26:513-515.
- Meador, V. P., B. L. Deyoe and N. F. Cheville. 1989a. Effect of Nursing on Brucella abortus Infection of Mammary Glands of Goats. *Vet. Pathol.* 26:369-375.
- Meador, V. P., B. L. Deyoe and N. F. Cheville. 1989b. Pathogenesis of Brucella abortus Infection of the Mammary Gland and Supramammary Lymph Node of the Goat. *Vet. Pathol.* 26:357-368.
- Méndez T., M.C. y Vargas U., R.L. 1988. Evaluación de la Sensibilidad de Cepas de Brucella sp a Agentes Antimicrobianos y Sustancias Químicas. Tesis Q.B.P. Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de C.Q. Chih., Chih.

- Merck. 1988. Culture Media Handbook. E. Merck editor. Federal Republic of Germany. pp 63, 68, 131, 146 y 164.
- Meyer, M. E. 1990. Evolutionary Development and Taxonomy of the Genus Brucella. In Advances in Brucellosis Research. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 12-35.
- Miller-Hays, S. M., S. L. Cooke and J. Corliss. 1991. Better Beefsteak Begins With Healty Cattle. Agr. Res. 39(12):8-13.
- Moreira-Jacob, M. 1970. Studies on Methods and Techniques for the Classification of the Bacterial Genus "Brucella". International Symposium on Brucellosis. Symp. Immunobiol. Standard. 12:167-180.
- Moriyon, I. and D. T. Berman. 1982. Effects of Noionic, Ionic, and Dipolar Ionic Detergents and EDTA on the Brucella Cell Envelope. J. Bact. 152(2):822-828.
- Moriyon, I. C. Gamazo and R. Díaz. 1987. Properties of the Outer Membrane of Brucella. II Forum in Microbiology. Ann Inst. Pasteur/Microbiol. 138:89-91.
- Muir, D. D. 1990. Lactose. Principles of Dairy Chemistry. J. of the Soc. of Dairy Technol. 43(2):33-34.
- N. R. C. (National Research Council). 1977. Brucellosis Research: An Evaluation. National Academy of Sciences. Washington, D. C. pp 33.
- Oñate, A. and H. Folch. 1989. Comparison of Protein Components of Different Species and Strain of Brucella. J. Vet. Med. 36:397-400.
- Ortona, L. R. Cauda, G. Ventura, M. Tumbarello, D. Ballada and G. Branca. 1988. Ten Years of Brucellosis in Italy (1977-1986). Eur. J. of Epidemiol. 4(4):503-505.
- Peralta Q. M. 1991. Evaluación de la Carga Microbiana en Queso Fresco Regional y su Resistencia a Antibióticos. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de La Paz. La Paz, Baja California, Sur. México.
- Peraza-Castro. 1987a. Caprinocultura. Los Quesos de Cabra en México (I). Síntesis Lechera. 2(2):33-37.
- Peraza-Castro. 1987b. Caprinocultura. Los Quesos de Cabra en México (II). Síntesis Lechera. 2(3):36-43.

- Perry, M. B. and D. R. Bundle. 1990. Lipopolysaccharide Antigen and Carbohydrates of Brucella. In *Advances in Brucellosis Research*. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 76-88.
- Pestka, J. J. and M. F. Witt. 1985. An Overview of Immune Function. *Food Technol.* 39(2):83-90.
- Piffaretti, J. C., P. Staedler and P. C. Berella-Piccoli. 1987. Risk of Infection by Brucella melitensis for People Living Near Infected Goats. *J. of Infection.* 15:177-181.
- Plommet, M. 1987. Brucella and Brucellosis: An Update. II Forum in Microbiology. *Ann Inst. Pasteur/Microbiol.* 138:69-70.
- Plommet, M., A. M. Plommet and I. Hue. 1985. Immune Mechanisms in Brucellosis. In Brucella melitensis. J. M. Verger and M. Plommet Ed. The Commission of The European Communities. M. N. Publishers. England. pp 205-214.
- Pszczola, E. 1989. Rennet Containing 100% Chymosin Increases Cheese Quality and Yield. New process optimizes extraction o chymosin from calves, leading to improved rennet product. *Food Technol.* 6:84-89.
- Ramírez, A. H. Preciado G. y V. Méndez. 1989. Estudio Epidemiológico de un brote de brucelosis en Jalisco. *Memorias del VI Congreso Nacional, Asociación Mexicana de Zootecnistas y Técnicos en Caprinocultura, A. C. Guadalajara, Jal. Mex.*
- Renner, E. 1987. Nutritional Aspects of Cheese. Chapter 9. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. General Aspects. Edited by P. F. Fox. Elsevier Applied Science. London. pp 345-363.
- Roberts, D. 1990. Source of Infection. *The Lancet.* 336(Oct.6):850-861.
- Ruben, B., P. Wong, J. D. Band and J. Colville. 1991. Person-to-Person Transmission of Brucella melitensis. *The Lancet.* 337:14-15.
- Ruiz-Castañeda, M. 1986. *Brucelosis*. III ed. La Prensa Medica Mexicana, S. A. Ediciones Copilco. México, D. F.
- SAS. 1989. *SAS User's Guide*. SAS Inst., Inc., Cary, NC

- S. S. A. 1987. Manual de Técnicas y Procedimientos para el Estudio de Brucelosis. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Servicios de Salud. Dirección eneral de Epidemiología. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales. México, D. F.
- Sabbaghian, H. 1975. Fresh White Cheese as a Source of Brucella Infection. Public Health. 89: 165-169.
- Salem, A. A., M. A. Nour, M. E. Shawkat and A. A. Fayed. 1977. Viability of Brucella abortus in White Cheese. Vet. Med. J. XXV(25):215-220.
- Salman, M. D. and M. E. Meyer, 1984. Epidemiology of Bovine Brucellosis in the Mexicali Valley, Mexico: Literature review of disease-associated factors. Am J. Vet. Res. 45(8):1557-1566.
- Santos, J. M., D. R. Verstrete, V. Y. Perera and J. Winter. 1984. Outer Membrane Proteins from Rough Strains of Four Brucella Species. Infect. Immun. 46(1):188-194.
- SEMESON. 1987. Servicios Medicos de Sonora. Secretaría de Salud Pública. Estudio Epidemiológico de la Brucelosis en el Estado de Sonora. 1980-1987. Hermosillo, Sonora. México.
- Schirmeister, E. V. 1986. El Cuajo Natural, Clave Para un Buen Queso. Síntesis Lechera. 6:24.
- Serre, A., S. Bascoul, J. P. Vendrell and A. Cannat. 1987. Human Immune Response to Brucella Infection. II Forum in Microbiology. Ann Inst. Pasteur/Microbiol. 38:113-117.
- Smith, R. 1990. T Lymphocyte-Mediated Mechanisms of Acquired Protective Immunity Against Brucellosis in Cattle. Chapter Twelve. In Advances in Brucellosis Research. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 164-190.
- Smith, L. D. and T. A. Ficht. 1990. Pathogenesis of Brucella. Critical Rev in Microbiol. 17(3):209-230.
- Sutra, L., J. P. Caffin and G. Dubray. 1986. Role of Milk Immunoglobulins in the Brucella Milk Ring Test. Vet. Microbiol. 12:359-366.

- Teclaw, R. F., F. Heck, G. G. Wagner, S. Romo and Z. García. 1985. Prevalence of Brucellosis Infection in Cattle in the Mexican States of Nuevo León, Tamaulipas and Coahuila as Determined by the ELISA. *Prev. Vet. Med.* 3:445-448.
- Templeton, J. W. and L. G. Adams. 1990. Natural Resistance to Bovine Brucellosis. Chapter ten. In *Advances in Brucellosis Research*. L. Garry Adams editor. Texas A & M University Press. U.S.A. pp 144-150.
- Torres, N. and N. C. Chandan. Latin American White Cheese-a Review. *J. Dairy Sci.* 64:555-557.
- Troller, J. A. 1980. Influence of Water Activity on Microorganisms in Foods. 5:76-8
- Vásquez, A. 1992. Brucellosis. Recomendaciones Veterinarias. Fomento Ganadero. 37(3):22-23.
- Verger, J. M., F. Grimont, P. A. D. Grimont and M. Grayon. 1985. Brucella a Monoespecific Genus Shown by Deoxyribonucleic Acid Hybridization. *Int. J. of Syat. Bacteriol.* 35(3):292-295.
- Verger, J. M. and M. Grayon. 1985. Present Clasification of the Genus Brucella. In Brucella melitensis. J. M. Verger and M. Plomet. The Commission of the European Communities Editors. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands. pp 1-6.
- Verger, J. M. and M. Plommet. Brucella melitensis Martinus Nijhoff Publishers. France. pp 181-183.
- Verger, J. M., F. Grimont, P. A. D. Grimont and M. Grayon. 1987. Taxonomy of the Genus Brucella. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 183:235-238.
- Verstrete, D. R., M. T. Creasy, N. T. Caveney, C. L. Baldwin, M. H. Blab and A. J. Winter. 1982. Outer Membrane Proteins of Brucella abortus: Isolation and Characterization. *Infec. Immun.* 35(3):979-989.
- Winter, A. J. 1987. Outer Membrane Proteins of Brucella. II Forum in Microbiology. *Ann Inst. Pasteur/Microbiol.* 138:87-88.
- Wise, R. I. 1980. Brucellosis in the United States. Past, Present and Future. *JAMA.* 244(20):2318-2322.

World Health Organization. 1986. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. VI report Series. Technical Report Series. Geneva.

Zygmunt, M. S., G. Dubray, D. R. Bundle and M. P. Perry. 1988. Purified Native Haptens of B. abortus B19 and B. melitensis 16M Reveal the Lipopolysaccharide Origin of the Antigens. Ann Inst. Pasteur/Microbiol. 139:421-433.