



VERACRUZ 2018

*Avances en Investigación
Agrícola, Pecuaria, Forestal,
Acuícola, Pesquería,
Desarrollo rural,
Transferencia de tecnología,
Biotecnología, Ambiente,
Recursos naturales y
Cambio climático*

**inirap**Instituto Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Año 2, No. 1

ESTUDIO NUTRIMENTAL COMPARATIVO DE HUEVO DE GRANJA Y DE TRASPATIO	1563
--	------

Miriam Rosas Juárez, María Guadalupe Meza García y Erik Ocaranza Sánchez

BIORREACTOR SETIS™: UN SISTEMA EFICIENTE PARA LA PROPAGACIÓN <i>In vitro</i> DE VAINILLA (<i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews)	1572
---	------

Isabel Cruz Villegas, Jericó Jabín Bello Bello, Carlos Cruz Cruz, Marco Antonio Ramírez Mosqueda y Juan Antonio Pérez Sato

CRECIMIENTO DE GUANÁBANA (<i>Annona muricata</i> L.) POR EFECTO DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES BAJO ESTRÉS HÍDRICO	1580
--	------

Angela Michelle González López, Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar, Cecilia Guizar González, Jhony Navat Enríquez Vara y Gabriel Rincón Enríquez

EXPRESIÓN DEL PEPTIDO DE MEMBRANA C6XFB8 DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>, MEDIANTE ELECTORORESIS EN POLIACRILAMIDA PAGE-SDS	1590
--	------

Isidro Humberto Almeyda León, María Genoveva Álvarez Ojeda, Cynthia Guadalupe Rodríguez Quibrera, Alberto Mendoza Herrera[†], Ana Belén Hernández Hernández y Roberto Omar Castañeda Arreola

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL BACTERÍOFAGO ΦXaf18 ASOCIADO A LA BACTERIA FITOPATÓGENA <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	1601
---	------

Marcela Ríos Sandoval, Gabriel Rincón Enríquez, Guillermo Alejandro Solís Sánchez, Saul Fraire Velázquez y Evangelina Esmeralda Quiñones Aguilar

RESPUESTAS DE TRES GRUPOS VARIETALES DE <i>Sechium edule</i> (Jacq.) Swartz INOCULADOS CON <i>Phytophthora capsici</i>	1610
---	------

Edgar Josué Hernández Marañón y Rosalía Núñez Pastrana

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Brucella</i> spp. EN MUESTRAS DE QUESO FRESCO DE VACA EN VERACRUZ, MÉXICO	1620
---	------

Gabriela Romina Hernández Carbajal, David Itzcoatl Martínez Herrera, Violeta Trinidad Pardío Sedas, Rodolfo Quintana Castro, Karla María López Hernández, Rosa María Oliart Ros, José Francisco Morales Álvarez, José Alfredo Villagómez Cortés y Javier Cruz Huerta Peña

PROPUESTA PARA EL CÁLCULO DE UN ÍNDICE DE CALIDAD DEL AGUA PARA LAS LAGUNAS CHACAHUA Y PASTORIA, OAXACA	1630
--	------

Rafael A. Guajardo Panes, Saray Baizabal Rivera, Gabriel Díaz Padilla, Finlandia Barbosa Moreno, José Antonio Cueto Wong e Ignacio Sánchez Cohen

DETECCIÓN DE <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> MEDIANTE PCR-PUNTO FINAL, UTILIZANDO INICIADORES DISEÑADOS A PARTIR DE LOS GENES <i>Omp</i> Y <i>Clibasia_02425</i>	1644
--	------

Cynthia Guadalupe Rodríguez Quibrera, Isidro Humberto Almeyda León, María Genoveva Álvarez Ojeda, Carlos Hernández Guerra y Alberto Mendoza Herrera

ESTABILIDAD GENÉTICA EN MATERIAL CONSERVADO <i>In vitro</i> DE <i>Vanilla</i> spp.	1656
---	------

José R. Bautista Aguilar y Lourdes G. Iglesias Andreu y Marco A. Ramírez Mosqueda

EFFECTO MORFOLÓGICO DEL ÁCIDO SALICÍLICO (SA) EN EL CULTIVO <i>In vitro</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> Jacks.	1664
--	------

Luis C. Ortega Macareno, Lourdes Iglesias Andreu, Marco Ramírez Mosqueda

DIGESTIÓN ANAEROBIA DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES: PRE-TRATAMIENTO ÁCIDO COMO OPCIÓN DE MEJORA	1671
--	------

Carlos Alberto Vargas Licon, Magdalena Jiménez Hernández, Oscar Andrés del Ángel Coronel y Noemi Nava Valente

EVALUACIÓN DE LA FIRMEZA DE FRUTO EN CHAYOTE (<i>Sechium edule</i> Jack. Sw.) EN RELACIÓN A PARÁMETROS FISCOQUÍMICOS DE VIDA DE ALMACÉN	1683
--	------

Oscar Andrés Del Ángel Coronel, Juan Díaz Vela, Karen Sarahí Acolt Cabal, Magdalena Jiménez Hernández y Noemí Nava Valente





IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Brucella* spp. EN MUESTRAS DE QUESO FRESCO DE VACA EN VERACRUZ, MÉXICO

Gabriela Romina Hernández Carbajal^{355*}, David Itzcoatl Martínez Herrera³⁵⁵, Violeta Trinidad Pardo Seda³⁵⁵, Rodolfo Quintana Castro³⁵⁶, Karla María López Hernández³⁵⁵, Rosa María Oliart Ros³⁵⁷, José Francisco Morales Álvarez³⁵⁸, José Alfredo Villagómez Cortés³⁵⁵ y Javier Cruz Huerta Peña³⁵⁵

Resumen

La brucelosis es una de las zoonosis de mayor importancia en México, debido al grave problema de salud pública que representa ocasionado por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar, y a las pérdidas económicas que generan en la ganadería nacional. El objetivo de la investigación fue determinar la presencia de *Brucella* spp. en muestras de queso fresco artesanal colectadas durante los meses de mayo y junio de 2017 en 100 muestras pertenecientes a centros de acopio de leche en Veracruz, México. La identificación de *Brucella* spp. se realizó mediante cultivo microbiológico y la prueba de PCR directa en muestras de queso. Los resultados obtenidos muestran la amplificación de la cepa S19 de *Brucella abortus* (1.0%) que se usa para la vacunación de bovinos a partir de queso fresco, y podría sugerir un problema en salud pública debido al consumo de productos sin pasteurizar, en términos de brucelosis. Por ello el uso de la técnica de PCR puede ser usada como una prueba diagnóstica rápida y de apoyo para la brucelosis en México debido a que puede realizar la diferenciación tanto de cepas de campo como vacunales en muestras de queso fresco artesanal.

Palabras clave: brucelosis, PCR, cepa S19

³⁵⁵ Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. *dmartinez@uv.mx

³⁵⁶ Universidad Veracruzana. Facultad de Bioanálisis.

³⁵⁷ Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos.

³⁵⁸ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología.





Introducción

La brucelosis es una zoonosis de gran impacto a nivel nacional que causa grandes pérdidas económicas a la ganadería y se considera un grave problema de salud pública debido a la transmisión por el consumo de productos lácteos sin pasteurizar a la población y que se encuentren contaminados con *Brucella* spp. donde *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* son las más virulentas para el humano (Acha y Szyfres, 2003; Lusk *et al.*, 2013).

En México es considerada una enfermedad endémica, en particular, en zonas donde la cría y explotación de ganado se encuentra presente; por lo que, para controlarla y erradicarla a nivel nacional se estableció la NOM-041-ZOO-1995, que tiene como objetivo principal el establecimiento de zonas libres de brucelosis animal por municipios, estados y regiones. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) ubica al estado de Veracruz en fase de control, con una frecuencia de 0.22% a nivel nacional y en el estado de Veracruz de 0.02% (SAGARPA, 2018); no obstante, estudios en el estado indican prevalencias en bovinos de 0.18% a 12.02% (Aguilar, 2010; Vite *et al.*, 2011). De acuerdo con la Secretaría de Salud, en su boletín epidemiológico hasta la semana 28 de 2018 se han encontrado 934 casos de brucelosis humana a nivel nacional y de éstos, 17 corresponden al estado de Veracruz (SSA, 2018), si se toma en consideración que es una enfermedad de reporte obligatorio mensual de acuerdo a lo establecido por la NOM-017-SSA2-1994 para la vigilancia epidemiológica.

El estado de Veracruz se ha colocado dentro de los principales productores de leche a nivel nacional, donde las queserías locales son las que representan el mayor impacto en la compra y venta de leche fluida para su transformación, de manera tradicional y artesanal en diversos quesos entre los que destacan el fresco artesanal (Castro *et al.*, 2012). Por lo general, la mayor producción de queso se realiza con leche de vaca y es el de mayor consumo a nivel nacional, debido a que forma parte de dieta tradicional de la población mexicana (Valencia, 2001; Hervás, 2012); sin embargo, este queso es elaborado de manera artesanal, sin llevar a cabo una pasteurización y que no cumplen con los lineamientos de inocuidad establecidos en la NOM-243-SSA1-2010 para la elaboración de productos lácteos, y con ello implicarlo un riesgo para el consumidor debido a la transmisión de enfermedades,





como la brucelosis. Por tanto, se tiene que tener un control eficiente de ésta en los animales, cuyo efecto se verá reflejado sobre la incidencia de la brucelosis en el humano.

El diagnóstico de brucelosis se basa en pruebas microbiológicas y serológicas; si bien, las segundas son métodos rápidos, no siempre son sensibles o específicos porque pueden existir reacciones cruzadas con otros microorganismos, pero son en extraordinario económicos y aproximan mucho a la realidad (Leal *et al.*, 1995). Mientras que el método más confiable para el diagnóstico de brucelosis es todavía el aislamiento microbiológico para la identificación del patógeno y por ello, la prueba recomendada y definitiva, a pesar de que los procedimientos resulten ser lentos y poco exitosos aunados al riesgo de contagio por exposición (Leal *et al.*, 1999). Por otra parte, el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de patógenos en alimentos ha sido implementada y aceptada cada día más, debido a su rapidez y sensibilidad, porque permite obtener resultados presuntivos en poco tiempo (Arasoglu *et al.*, 2013). Por lo que el objetivo de esta investigación, fue identificar de manera directa *Brucella* spp. mediante la técnica de PCR a partir de quesos frescos artesanales.

Materiales y métodos

El presente estudio fue epidemiológico transversal con un muestreo a conveniencia que se realizó en la zona centro del estado de Veracruz, México en muestras de queso de vaca fresco artesanal recolectadas en centros de acopio pertenecientes a los municipios de Acajete, Coatepec, Medellín, Tlaxicoyan y Veracruz. Se colectaron 100 muestras de queso (250 g) en bolsas herméticas e identificadas con lugar de procedencia y si hicieron uso de la pasteurización.

Análisis microbiológico

Posterior a ello, a las muestras de queso se les procedió a realizar el estudio bacteriológico en el laboratorio de microbiología de la Unidad de Diagnóstico de la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana para el aislamiento de *Brucella* spp. con el uso de placas por duplicado con agar soya tripticasa





(TSA) (Difco, EUA) adicionado con 5% de suero de bovino estéril y suplemento selectivo de Farell (Oxoid, EUA) que contenía una mezcla de antibióticos las cuales fueron incubadas durante 5 a 10 días, donde una mitad se incubó en presencia de CO₂ y la otra en aerobiosis (Díaz *et al.*, 2000). Las colonias que resultaron sugestivas se tipificaron e identificaron con pruebas bioquímicas con protocolos ya establecidos para la identificación de la especie de *Brucella* (Alton *et al.*, 1976).

Análisis molecular

La identificación molecular se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología-INIFAP, se llevó a cabo la extracción de ADN por el método Fenol-Agua modificado a partir de muestras de queso fresco artesanal (Rezania *et al.*, 2011). Se realizó una maceración a partir de 10 g de queso con 10 mL de solución salina fisiológica; a continuación se tomaron 500 µL del macerado y se centrifugaron a 1,500 g para la obtención de un pellet. Se adicionaron 15 µL de lisozima y se dejaron en hielo durante 45 minutos, se agregaron 100 µL de solución STEMP (SDS 10%, Tris-HCl 1M, EDTA 0.5M, H₂O estéril) y 15 µL de proteinasa k y se mantuvo a 60°C durante una hora mezclándose durante ese tiempo. Se agregó un volumen 1:1 de fenol bufferado para después centrifugarse a 21,500 g durante 15 min para separar la fase acuosa y ésta se trasvasó a un tubo tipo Eppendorf con 750 µL de acetato de potasio, de igual forma se agregó un volumen 2:1 de etanol absoluto agitándose por inversión. Por último, la fase acuosa se decantó y se dejó evaporar hasta que el pellet se secó en su totalidad. El pellet final de ADN se resuspendió en una solución 10:1 de TE (Tris-HCl 1M, EDTA 0.5M, H₂O estéril) y se congeló a -20°C hasta su utilización.

Se realizó un PCR punto final con el empleo de los oligonucleótidos F4 (5'-TCGAGCGCCCGCAAGGGG-3') y R2 (5'-AACCATAGTGTCTCCACTAA-3') que amplificaron a 900 pb para el gen 16S rRNA de *Brucella* spp. de acuerdo al protocolo establecido por Padilla *et al.* (2003) a partir de un volumen final de 25 µL que contenían 13 µL de RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (SIGMA, EUA), 7 µL de agua libre de RNasas (Thermo Scientific, EUA), 1 µL de los oligonucleótidos (dNTPs) y 3 µL de ADN de la muestra; las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (Bio Rad, Thermal Cycle), observando las condiciones en el cuadro 1.





Cuadro 1. Condiciones de amplificación para PCR convencional.

Actividad	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	54	90 s	30
Extensión	72	90 s	30
Extensión final	72	10 min	1

La confirmación se efectuó con la técnica de PCR multiplex con la amplificación de la cepa vacunal RB51 de *B. abortus* con los iniciadores: RB51-1 (5'-TTAAGCGCTGATGCCATTTCTTCAC-3') y RB1-2 (5'-GCCAACCAACCCAAATGCTCACAA-3') que amplificaron a 1,298 pb a partir del gen *wboA* descrito por Vemulapalli *et al.* (1999) y la amplificación de la cepa S19 de *B. abortus* que se usa para la vacunación de bovinos, a partir de los iniciadores ERY-I (5'-TTGGCGGCAAGTCCGTCGGT-3') y ERY-II (5'-CCCAGAAGCGAGACGAAACG-3') que con un producto de 361 pb se buscaron los genes *ery-C-ery-D* descritos por Sangari *et al.*, 2000. La PCR se realizó a partir de un volumen final de 50 µL, que contenía 25 µL de amortiguador RedTaq ReadyMix PCR Reaction Mix (SIGMA, EUA), 19 µL de agua libre de RNasas (Thermo Scientific, EUA), 1 µL de cada oligonucleótido (dNTPs) y 2 µL de DNA de la muestra. Los ciclos de reacción para la identificación de *Brucella* por PCR multiplex se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Condiciones de amplificación para PCR multiplex.

Actividad	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	1 min	30
Alineamiento	59	30	1
Extensión	72	1.5 min	1
Extensión final	72	5	1

Los productos de amplificación fueron observados en gel de agarosa al 1%, en TAE 0.5X teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/mL) y se utilizó un marcador molecular de 1,000 a 3,000 pb (Plus DNA Ladder Thermo Scientific). La cámara de electroforesis se colocó en una fuente de poder a 1,000 voltios durante 60 minutos para observar los productos amplificados.





Los productos de amplificación para PCR punto final y multiplex fueron observados por electroforesis en geles de agarosa al 1%, durante 60 min a 1,000 voltios, teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/mL).

Resultados y discusión

De las muestras analizadas de queso se obtuvo una colonia presuntiva de *Brucella* spp. a microbiología convencional (1.0 %; IC95%: 0.5-6.24), la cual pertenecía al municipio de Veracruz; aunque, a la resiembra de la misma, en medios específicos no fue posible debido a la contaminación que existía con otros microorganismos así como la dificultad al realizar el aislamiento en las demás muestras colectadas. Sin embargo, a la realización de la prueba de PCR punto final se obtuvo la amplificación de 900 pb de manera directa en las muestras de queso para *Brucella* spp, a la confirmación con PCR multiplex para la identificación de especie, la amplificación obtenida fue de 361 pb, que confirmó como resultado *Brucella abortus* cepa S19 y que corresponde a una cepa que se usa para la vacunación de bovinos contra la brucelosis.

Si bien, el diagnóstico microbiológico es la prueba definitiva para el diagnóstico de *Brucella* spp; la sensibilidad del método bacteriológico dependerá de la viabilidad y el número de UFC/g o mL de muestra, al considerar que para un aislamiento exitoso se necesitan ≥ 100 UFC/g o mL por muestra (Corbel, 2006; Martínez *et al.*, 2008). Estudios como el realizado por Villanueva (2010) demuestran la dificultad del aislamiento, donde no se obtuvo ninguno y se menciona que esto pudo deberse a la baja concentración bacteriana en las muestras de queso fresco.

Diversos estudios demuestran el uso de PCR como herramienta útil para el diagnóstico de *Brucella* spp. en productos lácteos como el realizado por Kiliç *et al.* (2016) que al realizar PCR en tiempo real lograron amplificar ADN en 13.9% (18/80), pues los autores mencionan que la presencia de la enfermedad se debía a una reciente infección. Rijpens *et al.* (1996) determinó la presencia de *Brucella* spp de manera directa de muestras de leche a partir de los genes 16S-23S rARN, que indica que la PCR es una alternativa clara para la problemática de la identificación de la bacteria por métodos convencionales. Olivera *et al.*





(2011) trabajaron con leche de cánidos para la identificación de *Brucella canis* que resultó positiva y diagnosticada con PCR punto final, para demostrar que las técnicas moleculares sirven para el diagnóstico directo de la enfermedad aunado a que puede convertirse en un protocolo de laboratorio el cual es rápido, sensible y que evita el contagio con el personal. Del mismo modo, es de importancia epidemiológica el resultado obtenido en esta investigación, no solo por la importancia del uso de las técnicas moleculares como PCR para un diagnóstico rápido y eficaz; sino, por ser un problema de salud pública debido a que en México, la cepa vacunal S19, dejó de ser utilizada desde 1997 y reintroducida para su uso y venta en 2006, debido a la interferencia diagnóstica que esta generaba por el aumento de títulos serológicos, puesto que de cierta manera, dificultaba la diferenciación de animales vacunados de los enfermos (SAGARPA, 2011). En México, Martínez *et al.* (2008) lograron identificar y diferenciar por PCR la cepa S19, bajo el mismo protocolo utilizado en esta investigación y que al tratarse de una vacuna viva atenuada es capaz de causar infección en el humano porque puede ser excretada por la leche después de un año post-vacunación. Otros autores diferenciaron por PCR en 81.08% (30/37) la cepa vacunal S19 en muestras de queso ilegales en Brasil al mencionar dos puntos importantes, el primero el peligro del consumo de queso por la inadecuada vacunación realizada y el segundo, sobre la efectividad de las técnicas moleculares para la identificación de *Brucella* spp y la diferenciación de cepas vacunales.

Conclusiones

1. Se demostró la presencia de *Brucella abortus* cepa S19 usada para la vacunación en bovinos en muestras de queso fresco artesanal de leche de vaca por medio de la prueba de PCR, que demuestra la eficacia de esta técnica para la identificación de *Brucella* spp. y la diferenciación entre cepas vacunales y de campo, debido a que identifica cantidades mínimas del patógeno; por lo que el protocolo de extracción de ADN y del PCR realizados en esta investigación pueden ser de utilidad para el diagnóstico de *Brucella* spp. en quesos frescos, además de disminuir el riesgo de contaminación.





Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por el proyecto PRODEP Apoyo a la Integración de Redes Temáticas de Colaboración Académica No. DSA/I03.5/I5/I4220 titulado “Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Brucella* spp.” Se agradece la colaboración del equipo del Laboratorio de Microbiología CENID-INIFAP por el apoyo brindado así como el uso de las instalaciones para el diagnóstico molecular.

Literatura citada

- Acha, P. N. y B. Szyfres. 2003. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. Bacteriosis y Micosis Vol. I. Pan American Health. Washington, EUA. 395 p.
- Alton, G., L. Jones., R. Angus y M. Verger M. 1976. Las técnicas de los laboratorios en la brucelosis. 2 ed. Organización Mundial de la Salud. p. 11-63.
- Aguilar, B. G. 2010. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a brucelosis (*Brucella abortus*) en ganadería bovina de la zona sur de Veracruz, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Campus Veracruz. Veracruz, Veracruz. México
- Arasoğlu, T., M. Güllüce., H. Özkan., A. Adigüzel and F. Şahin. 2013. PCR detection of *Brucella abortus* in cow milk samples collected from Erzurum, Turkey. Turk. J. Med. Sci. 43:501-508 doi:10.3906/sag-1205-121
- Castro, C. J., J. Coterá, y J. A. Zavaleta. 2012. Características de la Producción y Comercialización de leche bovina en sistemas de doble propósito en Dobladero, Veracruz. Revista Mexicana de Agronegocios 16(30):816-824
- Corbel, M. J. 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health. 86 p
- Díaz, A. E., L. Hernández A., G. Valero E., B. Arellano R., F. Aguilar R., E. Alfonseca S., *et al.* 2000. Diagnóstico de Brucelosis Animal. 2a. ed. INIFAP. México, D.F. 210 p





- Hervás, S. A. 2012. El mercado del queso en México. Instituto Español del Comercio Exterior. <http://internacional.ivace.es/...XICOQUESOICEX2012-/M%C3%89XICOQUESOICEX2012%20.pd>
- Kiliç, S., Y. Akın Y., G. Sevil, G. Semra, D. Mehmet, K. Oktay and Y. Osman. 2016. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Brucella* Specific Antibody and Real-Time PCR for Detecting *Brucella* Spp. in Milk and Cheese in Şanlıurfa, Turkey. Pak. Vet. J. 37(1):39-42
- Leal, K. D., I. Martínez V., A. López-M. and J. P. Martínez S. 1995. Single-Step PCR for Detection of *Brucella* spp. from Blood and Milk of Infected Animals. Journal of Clinical Microbiology 33(12):3087-3090.
- Leal, K. D., A. Barbosa P., M. Flores T., A. López M. y J. Martínez S. 1999. Epidemiología molecular de un foco primario de brucelosis en el estado de México. Biotecnología Aplicada 16:149-153.
- Lusk, T. S, E. Strain and J. A. Kase. 2013. Comparison of six commercial DNA extraction kits for detection of *Brucella neotomae* in Mexican and Central American-style cheese and other milk products. Food Microbiol.34:100-105 doi: 10.1016/j.fm.2012.11.007
- NOM-017-SSA-1994 Bienes y Servicios. Para la vigilancia epidemiológica.
- NOM-041-ZOO-1995. Bienes y Servicios. Campaña Nacional contra la Brucelosis de los Animales. México. Norma Oficial Mexicana.
- NOM-243- SSA1-2010. Secretaría de Salud y Asistencia SSA. 2012. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Martínez, H. D., N. Lara A., A. Carrasco G., A. Peniche C., F. Barradas P., M. Villanueva V. et al. 2008. Uso de ratones albinos como modelo de infección para el aislamiento de *Brucella abortus* a partir de leche. p. 466-473. In: XXI Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y I del Trópico Mexicano.
- Olivera, M., C. A. Giraldo, C. Di-Lorenzo. 2011. Identificación por PCR de *Brucella canis* en sangre y leche canina. Reporte de un caso. Arch. Med. Vet. 43:295-298.
- Padilla, C., Y. Montoya y C. Carrillo. 2003. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* sp. Rev. Peru Med. Salud Publica 20:102-104.





- Rezania, S., N. Amirmozaffari, B. Tabarraei, M. Jeddi T., O. Zarei O., R. Alizadeh R., et al. 2011. Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 3(1):3-9.
- Rijpens, N., G. Jannes, M. Van Asbroeck, R. Rossau and L. Herman. 1996. Direct Detection of *Brucella* spp. in Raw Milk by PCR and Reverse Hybridization with 16S-23S rRNA Spacer Probes. *Applied and Environmental Microbiology* 62(5):1683-1688.
- SAGARPA. 2011. Prevención de brucelosis en rumiantes. Manual de capacitación. No 2. INIFAP 44 p.
- SAGARPA. (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación). 2018. Indicadores de la Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. Ciudad de México. <https://www.gob.mx/senasica/documentos/indicadores-de-la-campana-nacional-contra-la-brucelosis-en-los-animales>
- Sangari, F., J. Agüero, and J. García L. 2000. The genes for erythritol catabolism are organized as an inducible operon in *Brucella abortus*. *Microbiology* 146:487-495
- SSA. (Secretaría de Salud). 2018. Boletín epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. Ciudad de México. <https://www.gob.mx/salud/documentos/boletinepidemiologico-sistema-nacional-de-vigilancia-epidemiologica-sistema-unico-de-informacion-163365>
- Valencia, M. O. 2001. Manual para la elaboración de productos lácteos. Colima, México. UCOL. 73 p
- Vemulapalli, R., J. McQuiston, G. Schurig, N. Sriranganathan, S. Halling, and S. Bole. 1999. Identification of an IS711 element interrupting the *wboA* gene of *Brucella abortus* vaccine strain RB51 and PCR assay to distinguish strain RB51 from other *Brucella* species and strains. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6(5):760-764.
- Villanueva, V. M. 2010. Frecuencia de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en quesos frescos sin pasteurizar colectados en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río. Tesis de Maestría Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz, Veracruz. México. 86 p.
- Vite, C., F. Alpirez., M. del Angel y A. Escobar. 2011. Diagnóstico de enfermedades asociadas a la reproducción en bovinos. *Agro entorno* 14(136):36-37



Créditos Editoriales

Avances en Investigación Agrícola, Pecuaria, Forestal, Acuícola, Pesquería, Desarrollo rural, Transferencia de tecnología, Biotecnología, Ambiente, Recursos naturales y Cambio climático

Año 2, Núm. 1, octubre de 2018

EDITORES GENERALES

Sergio Alberto Curti Díaz

Julio César Vinay Vadillo

EDITORES

Aixchel Maya Martínez

Ana Lid Del Angel Pérez

Ángel Ríos Utrera

Carmen Aridai Hernández Estrada

Javier Francisco Enríquez Quiroz

José Alfredo Villagómez Cortes

José Isidro Melchor Marroquín

Juan Carlos Tamarit Urias

Marcos Ventura Vazquez Hernandez

Martha Elena Fuentes López

Melchor Rodríguez Acosta

Oscar Hugo Tosquy Valle

Rigoberto Zetina Lezama

Rubén Loeza Limón

Valentín Alberto Esqueda Esquivel

