

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA

UNAN – LEÓN

ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIA



Detección de *Brucella abortus* mediante la técnica de PCR en muestras de queso y crema elaborados de forma artesanal en fincas del Municipio El Ayote, Chontales.

Tesis presentada por el Lic. M.V. Horacio Antonio Duarte Murillo para optar al título de *Magister Scientiae*, en “Medicina Preventiva con Mención en Salud Pública”

Tutor:

MSc. José Luis Bonilla, DMV

**León, Nicaragua
Febrero 2017**

“A la libertad por la Universidad”

INDICE

INDICE DE CUADROS.....	I
INDICE DE GRAFICOS.....	II
INDICE DE ANEXOS.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
I. INTRODUCCION.....	1
II. ANTECEDENTES	2
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
IV. JUSTIFICACIÓN.....	5
V. OBJETIVOS	6
VI. MARCO TEÓRICO.....	7
6.1. Brucelosis bovina.....	7
6.2. Etiología	7
6.3. Epidemiología	9
6.4. Transmisión.....	10
6.5. Signos clínicos	12
6.6. Diagnostico Laboratorial.....	13
VII. DISEÑO METODOLÓGICO	15
7.1. Operacionalizacion de variables.	16
7.2. Procedimiento de análisis de las muestras	16
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
IX. CONCLUSIONES.....	20

X. RECOMENDACIONES.....	21
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
XII. ANEXOS.....	25
Anexo N°1.....	25
Anexo N°2: Fotos de la Recolección de muestras en fincas donde se realizo el Estudio.	27
ANEXO N°3: ENCUESTA.....	30

INDICE DE CUADROS

Operacionalizacion de variables	16
Frecuencia de abortos en fincas por comarca.....	19

INDICE DE GRAFICOS

Gel de agarosa.	25
Cantidad de muestras recolectadas por comarcas.....	25
Cantidad de fincas que presntaron abortos por comarcas	26
Frecuencia de abortos por comarcas.....	26

INDICE DE ANEXOS

Recolección de muestra de queso, en finca San Ramón, comarca de Nawawas.	27
Recolección de muestra de queso en la finca las maravillas, comarca de Nawawas.	27
Materiales que se utilizan para la elaboración de queso artesanal.....	28
Recolección de muestras de crema, en finca Bendición de Dios, comarca El Bambú.....	28
Empacado y enumeración de muestras de queso.....	29
Toma y empacado de muestra de queso en finca, valle encantado, comarca el Bambú. .	29

DEDICATORIA

A dios, por permitirme llegar a este logro tan importante en mi vida, por haber escalado una etapa más dentro de mi formación como profesional.

A mi madre quien me brinda el apoyo incondicional para lograr mis metas y a quien debo todo lo que soy.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ Agradezco primeramente a Dios por darme sabiduría y entendimiento para poder culminar mi Maestría en Medicina preventiva con mención en Salud Publica.
- ❖ Mis más sinceros agradecimientos al Instituto de protección y Sanidad Agropecuaria IPSA, por haberme otorgado la beca de estudio de la Maestría.
- ❖ Agradezco a mi tutor MSc. José Luis Bonilla DMV. quien me brindo su ayuda sin estimar tiempo y esfuerzo durante la realizacion de esta Tesis.
- ❖ A mi familia y amigos, quienes colaboraron intelectual, moral y materialmente en forma interesada en la elaboración de la presente Tesis.

Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestras de queso y crema elaborados de forma artesanal en fincas del Municipio El Ayote, Chontales

^a Duarte M. Horacio y ^b Bonilla E. José Luis

^a Autor Principal, IPSA

^b Tutor Principal, Docente Titular, Microbiología e Inmunología UNAN – León

RESUMEN

La Brucelosis es una enfermedad infecciosa bacteriana, Es causado por bacterias gramnegativos del género *Brucella*. El objetivo principal del presente estudio pretendió determinar la presencia de *Brucella abortus* en muestras de queso y crema elaborados de forma tradicional, mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en fincas del Municipio de El Ayote, Chontales. Un total de 50 muestras, divididas entre queso y crema, fueron recolectadas de las diferentes fincas. Éstas fueron colocadas en bolsas herméticas para ser trasladadas en un termo con refrigerante al Laboratorio de Veterinaria de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria para su análisis. A todas las muestras se les realizó Extracción del ADN, mediante el kit comercial Thermo Scientific molecular biology, posteriormente se llevó a cabo la amplificación y luego se reveló en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio, para un amplicon de 150bp. De las 50 muestras (25 de queso y 25 de crema) analizadas, ninguna muestra resultó positiva a Brucelosis; detectando una baja prevalencia.

Palabras claves: *Brucella abortus*, queso, crema, diagnóstico, PCR.

ABSTRACT

Brucellosis is a bacterial infectious disease. It is caused by gram-negative bacteria of the genus *Brucella*. The main objective of the present study was to determine the presence of *Brucella Abortus* in cheese and cream samples elaborated in a traditional way, by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique in farms of El Ayote Municipality, in Chontales. A total of 50 samples, divided into cheese and cream, they were collected from the different farms. These were set in hermetic bags in order to be transferred in a thermos with refrigerant to the Veterinary Laboratory of Agrarian and Veterinary Sciences School for their analysis. All the samples were made DNA extraction, using the Thermo Scientific molecular biology commercial kit, then the amplification was carried out and then showed 1.5% in agarose gel with ethidium bromide, for a 150bp amplicon. Of the 50 samples (25 of cheese and 25 of cream) analyzed, no sample was positive for brucellosis; detecting a low prevalence.

I. INTRODUCCION

La Brucelosis es causada por una bacteria Gram negativa intracelular facultativa perteneciente al género *Brucella*. *Brucella spp.* (Especialmente *B. melitensis* y *B. abortus*) son transmitidos al ser humano por contacto directo con animales infectados o el consumo de alimentos contaminados (leche cruda y productos lácteos no pasteurizados en particular; Nicoletti, 1989). Dentro de la comunidad científica, la brucelosis, está catalogada como una de la zoonosis más importante del mundo, tanto por las pérdidas económicas que genera en la ganadería como por su impacto en la salud pública (Dajer *et al.*, 1998).

El diagnóstico epidemiológico de las enfermedades con trastornos reproductivos que afectan al ganado bovino, permite tener una acción directa sobre su control, intentando con ello disminuir las pérdidas económicas. Para lo cual, se necesita el monitoreo constante que ayude a obtener más información sobre estas enfermedades, de forma primaria en aquellas áreas de alta prevalencia e incidencia, o en donde existe una transmisión activa del agente infeccioso, como por ejemplo la *Brucella abortus* que afecta la reproducción (Barajas, 1998).

Existen pocos estudios en nuestra localidad, referentes a la detección ***B. abortus*** en leche y productos derivados; ya sea por la sensibilidad o especificidad de las pruebas, o por los altos costos de los ensayos. Por lo que el presente estudio, pretende determinar la presencia de *Brucella abortus*, en muestras de queso y crema elaborados de forma artesanal, mediante la técnica de PCR, en fincas, ubicadas en las comarcas de Nawawas y el Bambú Municipio de El Ayote.

II. ANTECEDENTES

En 1934, E. J. Pullinger, realizó el primer estudio sobre la examinación de Tuberculosis y Brucelosis a partir de varios productos de leche, obteniendo que de 31 muestras de crema cruda, 16 resultaron positivas a Tuberculosis y 11 a Brucelosis, de las cuales, 8 de ellas contenían ambos microorganismos (E. J. Pullinger, 1934)

En el año 2004 y 2005, se realizó un estudio de tipo descriptivo, donde se evaluó la técnica de PCR, para la detección de *B. abortus* en muestras de sangre y leche de vacunos, en el cual, se analizaron 136 animales de tres fincas localizadas en el municipio de Duramia, Norte de Santander, Colombia; se evaluó la presencia de anticuerpos en leche mediante la prueba del anillo (PAL). Un 13.2% (18/136) de las muestras de leche, fueron positivas a la PAL. Se analizaron por PCR 33 muestras de leche negativas por PAL, de las cuales el 30.3% (10/33) resultaron positivas. Al analizar las muestras de sangre de los animales a través de PCR, el 94.1%, resultaron positivas. (Mosquera et al., 2008).

En el año 2009 se realizó un estudio en Veracruz, México en el que se logró aislar e identificar *Brucella* spp. por pruebas bacteriológicas convencionales y por moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en quesos frescos que se venden en los mercados Abastos Boticaria, Malibrán, Zaragoza, Unidad Veracruzana e Hidalgo registrados en los ayuntamientos de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río. Para ello, se recolectaron 30 muestras de igual número de establecimientos ubicados en los mercados seleccionados en las temporadas de estiaje y lluvias. Por bacteriología no se aisló *Brucella* spp.; sin embargo, por PCR se identificó *Brucella* spp. en cuatro muestras de queso, dos de la temporada de estiaje y dos de la de lluvias (González MD et al.; 2009).

Un estudio realizado por Federico Capuano y colaboradores en Italia, 2012, realizaron la detección de *Brucella* spp en queso prensado en zonas de alta prevalencia, mediante PCR, el cual, obtuvo los siguientes resultados; 11 muestras

resultaron positivas de 98 analizadas para queso de búfalo, 6 de 57 muestras para una mezcla de queso de búfalo y de vaca, y 1 muestra de 36 para queso de vaca (Federico Capuano, et al., 2012).

En el año 2015, Rodríguez y colaboradores, realizaron un estudio en Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador, cuyo objetivo fue el aislamiento, biotipificación y genotipado de especies de *Brucella* en la leche y linfonodos supramamarios de bovinos seropositivos. El estudio se realizó en 12 fincas lecheras con un total de 656 animales, de los cuales 50 resultaron seropositivas a brucelosis. Un total de 25 linfonodos y 25 muestras de leche de cada grupo de reactores fueron transferidos a medios de cultivo. El aislamiento fue posible a partir de 4 (16%) nódulos linfáticos y 9 (36%) muestras de leche; de estos, 10 aislamientos fueron diagnosticados como *Brucella sp.* Todos los cuatro aislamientos de tejido linfático correspondían a *Brucella abortus* biotipo 1, confirmado como cepas de campo de análisis molecular. Aislamientos de leche, mostraron bioquímicamente un patrón más disperso en el que *B. abortus* biotipos 1 y no se encontraron 4; cuatro muestras dieron un patrón similar al de *B. abortus* biotipo 2; y sólo biotipos 1 y 4 fueron confirmados por análisis molecular (Rodríguez *et al.*; 2015).

Cabe mencionar que en Nicaragua no se ha realizado ningún estudio con respecto a detección de *Brucella abortus* por PCR, en muestras de queso y crema elaborados de forma artesanal, la prevalencia estimada en fincas de brucelosis a nivel nacional es de 2.2% según datos obtenidos del programa nacional de control y erradicación de brucelosis.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El impacto económico de *B. abortus*, es negativo en explotaciones de ganado vacuno debido a los abortos, la disminución en la producción de leche, carne y problemas de fertilidad. Se calcula que las pérdidas económicas del sector pecuario en el continente Americano ascienden a \$270 millones de dólares; que se distribuyen de la siguiente manera: producción de crías (47%), producción de leche (41%) y costos de reposición (12%).

Siendo la brucelosis una enfermedad de notificación obligatoria para nuestro país y estando dentro de un programa de control y erradicación, es necesario eliminar las brechas de diseminación de la bacteria por otras vías, dentro de ésta, se encuentra la eliminación vía leche y derivados, la cual, puede llegar a comprometer la salud de las personas por la ingesta de estos productos contaminados. Por otro lado, la herramienta diagnóstica utilizada para el diagnóstico de *B. abortus*, es de tipo serológico y se realiza en animales individuales, y para el aislamiento está el cultivo; pero es muy costo, laborioso y requiere un personal calificado; actualmente la utilidad de las pruebas moleculares han ayudado a mejorar la sensibilidad y especificidad de detección del agente en cualquier tipo de muestra.

Por lo que se pretendió con el estudio valorar si, **¿Existe la presencia de *B. abortus* en queso y crema de productos elaborados de forma artesanal?**

IV. JUSTIFICACIÓN

En el Departamento de Chontales la prevalencia de brucelosis en los últimos 5 años ha sido del 0.2%, éste dato se obtuvo según muestras anuales de sangre que se han remitido al laboratorio de diagnóstico veterinario del IPSA ubicado en la Región V- Chontales.

Dado que la leche representa un alimento muy importante en la cadena alimenticia, principalmente en los niños, es de suma importancia que estos productos y derivados sean inocuos. Por otro lado, Nicaragua cuenta con aproximadamente 4,5 millones de cabezas de ganado, las cuales, se encuentran distribuido en su mayoría entre los pequeños y medianos productores; éstos a su vez, se dedican al comercio local de productos elaborados de forma artesanal; por lo que, no cuentan con un sistema de calidad e inocuidad alimentaria, quedando la población en riesgo de adquirir una enfermedad, ya sea, gastrointestinal o generalizada, como por ejemplo la brucelosis, una enfermedad infectocontagiosa que puede ser transmitida al ser humano a través de productos como la leche y derivados; por lo que, el presente estudio pretende aislar *B. abortus*, en estos productos para así, saber si la bacteria se encuentra contaminado éstos productos.

Por otro lado, dado a que los métodos de detección bacteriológicos suelen requerir días o semanas para lograr el crecimiento exitoso de las bacterias de *Brucella spp.*, se han utilizado actualmente otras técnicas como el PCR, el cual, posee una alta capacidad para detectar cantidades mínimas y específicas de microorganismos, tanto en leche como en derivados lácteos (queso y crema); por lo que, resulta cada vez una mayor alternativa para diagnosticar enfermedades infecciosas causadas por microorganismo de lento crecimiento, tales como los del género *Brucella spp* (Romero *et al.*, 1996; Rijipens *et al.*, 1996).

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la presencia de *Brucella abortus*, en muestras de queso y crema elaborados de forma artesanal en diferentes fincas del municipio del Ayote, Chontales.

Objetivos Específicos

Detección de *Brucella abortus* en muestras de queso, mediante PCR en fincas del Municipio del Ayote, Chontales.

Detección de *Brucella abortus* en muestras de crema, mediante PCR en fincas del Municipio del Ayote, Chontales

VI. MARCO TEÓRICO

6.1. Brucelosis bovina

La brucelosis bovina es una enfermedad infectocontagiosa causada por bacterias del género *Brucella*. Es una enfermedad de importancia mundial y afecta a una diversidad de especies animales. Las *Brucellas* son proteobacterias intracelulares obligados, requiriendo un hospedador para su mantenimiento. Las infecciones tienden a localizarse en el sistema retículoendotelial y tracto genital, provocando abortos en hembras y epidedimitis y orquitis en machos, como las manifestaciones clínicas más comunes (Richard L. Walker, 1999)

Aunque estudios de ADN e Hibridación de ADN, indican que todas las *Brucellas* pertenecen a una única geno especie, las designaciones de especies tradicionales aún se siguen utilizando. Las diferentes especies de *Brucellas* exhiben preferencias de hospedadores y varía en severidad de la enfermedad causada. Tinciones, susceptibilidad a fagos acompañados con características bioquímicas, cultivos y serología, son usadas para distinguir entre las especies. Las seis especies de *Brucella* son *B. abortus*, *B. canis*, *B. melitensis*, *B. neotome*, *B. ovis* y *B. suis*. (Richard L. Walker, 1999)

Muchas especies de *Brucellas* son capaces de causar enfermedad en humanos. Las infecciones son crónicas y debilitantes. Los síntomas de brucelosis en humanos son relativamente inespecíficos. (Richard L. Walker, 1999)

6.2. Etiología

Características Descriptivas. Morfología y Tinción. Las *Brucellas* son pequeños coccobacilos Gram negativos, midiendo 0.6 a 1.5 μm x 0.5 a 0.7 μm de tamaño. No poseen cápsula, flagelos ni producen esporas; sin embargo una envoltura externa ha sido demostrada por microscopía electrónica entorno de *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. Las *Brucellas* se tiñen de rojo con las tinciones de Macchiavello y Ziehl-Neelsen modificado. (Richard L. Walker, 1999)

Estructura Celular y Composición. Las *Brucellas* poseen una pared celular típica Gram negativa. Los antígenos de superficie dominante están localizados en el Lipopolisacárido. Específicamente, los antígenos A y M son encontrados en concentraciones variables entre las diferentes especies de *Brucellas* lisas. La membrana externa contiene otro antígeno de superficie principal. No han sido demostrados los plásmidos de ADN. (Richard L. Walker, 1999)

Características de crecimiento. Sobre un aislamiento inicial, las colonias no aparecen sino hasta 3 a 5 días de incubación. La mayoría de las colonias son detectadas por 10 a 14 días, pero en algunos casos, es requerida la incubación por más de 21 días. El crecimiento es mejor en un ambiente aeróbico a 37°C, pero ocurre entre 20°C y 40°C. El pH óptimo es de 6.6 a 7.4. *Brucella ovis* y algunos biovars de *B. abortus* requieren un incremento en la concentración de CO₂. Medios enriquecidos con 5% de suero son requeridos para *B. abortus* biovar 2 y *B. ovis*. Las colonias de *Brucella* tienen un color azulado característico cuando son examinadas con una luz transmitida oblicuamente. Las colonias tienen morfologías lisas o no lisas, que son determinadas por la presencia o ausencia, respectivamente, del tamaño de la cadena del polisacárido en el lipopolisacárido. Estas variaciones morfológicas son el resultado de mutaciones espontáneas y son influenciados por factores de crecimiento específicos. Las colonias lisas son blancas, convexas con un borde completo y tiene una consistencia cremosa. Las colonias no lisas tienen una forma intermediada rugosa o mucoide. Las colonias rugosas son amarillo apagado y opacas. (Richard L. Walker, 1999)

Resistencia. Las *Brucellas* sobreviven al congelamiento y descongelamiento. Bajo condiciones medioambientales apropiadas, ellas sobreviven por más de 4 meses en leche, orina, agua y suelo húmedo. La mayoría de los desinfectantes activos contra otra bacteria Gram negativa mata la *Brucella*. La pasteurización efectivamente mata la *Brucella* en leche. (Richard L. Walker, 1999)

6.3. Epidemiología

La Brucelosis está ampliamente distribuida en el mundo y representa gran importancia económica debido a las pérdidas productivas y reproductivas que produce, sobre todo en el ganado lechero lo que nos lleva obligadamente a pasteurizar toda la leche que se destine para consumo humano. Debido a que es una zoonosis, esta enfermedad se constituye como uno de los principales problemas de salud pública, por lo cual es necesario lograr su erradicación. (Fernández Camacho et al.; 2009).

La enfermedad puede ser adquirida tanto por mamíferos silvestres (bisontes, antílopes, ciervos, coyotes, mapaches, camellos, etc.) como domésticos, y se han encontrado indicios de que estas especies transmiten la enfermedad al ganado bovino. (Fernández Camacho et al.; 2009).

El agente puede aislarse de diversos órganos, no solo de ubres y útero, así también podemos encontrarlo en diversas secreciones como son: leche, orina, loquios, heces y semen, así como en placenta y feto, lo cual hace que el manipular cadáveres o dichas secreciones representa un muy alto riesgo. (Fernández Camacho et al.; 2009).

Las mermas que produce son de gran importancia, debido principalmente a la pérdida de becerros, leche, infertilidad de las madres y la extensión de los días abiertos. (Fernández Camacho et al.; 2009).

La infección se presenta en bovinos de todas las razas y edades, pero con mayor frecuencia en animales adultos. En terneros la enfermedad se adquiere en el útero, los terneros nacidos de hembras reactivas son serológicamente positivos debido a la ingestión de anticuerpos colostrales y suelen tornarse serológicamente negativos aún cuando posean la infección. (Fernández Camacho et al.; 2009).

6.4. Transmisión

Puede transmitirse vía oral, conjuntival, aérea, cutánea, venérea, alimentos y potreros contaminados, agua contaminada, secreciones, fetos abortados, neonatos infectados, etc. La propagación dentro del hato ocurre de manera horizontal o vertical. (Fernández et al.; 2009).

Horizontal. Ocurre por contaminación directa, esto es por la libre convivencia entre animales sanos y enfermos, dentro de la cual puede ocurrir la infección interespecie. (Fernández et al.; 2009).

Vertical. Provocada por la infección dentro del útero. Situación que constituye uno de los principales problemas en los planes de erradicación de esta enfermedad, ya que si el producto se infecta dentro del primer tercio de gestación y no es abortado, los epítomos de la bacteria serán reconocidos como propios por el sistema inmune provocando que las pruebas diagnósticas convencionales sean incapaces de identificarlos, por lo que este individuo jugará el papel de portador asintomático. (Fernández et al.; 2009).

Patogénesis

Brucella abortus tiene predilección por el útero grávido, ubre, testículos, glándulas accesorias, linfonodos y cápsulas articulares; así como por diferentes tipos celulares (fagocitos, polimorfonucleares y mononucleares), de esta manera se establece la infección en tracto reproductor, glándula mamaria y sistema retículo-endotelial. (Fernández et al.; 2009).

Después de la infección el agente se localiza inicialmente en linfonodos regionales donde produce hiperplasia linfoide y respuesta inflamatoria aguda, después se propaga a otros tejidos linfoides, hígado y pulmones, y en animales gestantes a útero y glándula mamaria. La infección congénita en terneros recién nacidos se da como resultado de la infección en útero. (Fernández et al.; 2009).

Durante la diseminación en el organismo, las bacterias que se localizan extracelularmente están expuestas a los mecanismos normales de defensa del

hospedero donde quedan atrapados y mueren dentro del sistema retículo-endotelial. La acción bactericida se divide en dos partes: pre-fagocítica y post-fagocítica. (Fernández et al.; 2009).

Fase pre-fagocítica. Donde la bacteria se expone a factores séricos (anticuerpos específicos), que son encontradas en suero bovino normal. En individuos inmunizados los anticuerpos juegan un papel importante en la expulsión de la *Brucella abortus*. (Fernández et al.; 2009).

Fase post-fagocítica. Donde los microorganismos pueden quedar expuestos a la acción bactericida intracelular como la formación de peróxido, superóxido de hidrógeno, halogenación por el sistema mieloperoxidasa-peróxido de hidrógeno haluro, catiónicas y enzimas digestivas. (Fernández et al.; 2009).

Desafortunadamente en el caso de cepas virulentas de *B. abortus*, los procesos bactericidas intracelulares puede evitarse mediante la liberación de factores de virulencia bacterianos. (Fernández et al.; 2009).

El *eritritol*, sustancia producida por el feto y capaz de estimular el crecimiento de esta bacteria, está presente de forma natural en sus máximas concentraciones en placenta y líquidos fetales, siendo posiblemente la mayor responsable de que la infección se localice en estos tejidos. Así tenemos que:

- a) La infección en vacas ocurre por invasión a linfonodos retromamarios, si las vacas se encuentran gestantes, posteriormente se produce una bacteriemia periódica que produce una infección en útero y placenta, la mayoría de las vacas abortan una vez, y de forma excepcional dos o tres veces. Al producirse la invasión del útero grávido, las lesiones comienzan a manifestarse en la pared del órgano, pero como la luz del órgano es prontamente ocupada, se produce una endometritis ulcerosa grave de los espacios intercotiledonarios. Posteriormente son infectados tanto líquidos fetales como cotiledones placentarios provocando la destrucción de las uniones carúncula-cotiledón. Al provocarse la necrosis de estas uniones se produce la muerte del feto, debido a la multiplicación acelerada de la

bacteria en placenta y útero, esto interfiere con el suministro de oxígeno y nutrientes de la madre al producto, esto provoca agonía fetal, y dependiendo de su desarrollo, el producto puede llegar a término o finalmente morir. El feto puede permanecer muerto en el útero alrededor de 24 a 72 horas, iniciando un proceso de autólisis que producirá endotoxinas secundariamente a la muerte del feto. El aborto se produce principalmente en los últimos tres meses de gestación. El feto no presenta lesiones patognomónicas, pero es común encontrar bronconeumonía. La placenta se observa edematosa con lesiones inflamatorias y cotiledones necrosados.

- b) El curso de la infección en machos es similar que en hembras, solo que en ellos se infectan los testículos y glándulas accesorias por la presencia de eritritol, el cual se produce en el epidídimo. La infección provoca ocasionalmente orquitis y epididimitis unilateral con tumefacción aguda y dolorosa. Esto nos permitirá encontrar posteriormente áreas de adherencia focales entre la túnica vaginal y el testículo, respectivamente. Las lesiones granulomatosas espermáticas pueden producir fibrosis intersticial, lo cual repercutirá en la libido del animal así como en la cantidad de semen producido. (Fernández et al.; 2009).

6.5. Signos clínicos

Dependerán del estado inmunológico del hato. Hembras gestantes no vacunadas, son altamente susceptibles de presentar aborto después del quinto mes de gestación. Las secuelas más frecuentes del aborto son la retención placentaria y la metritis fibrinosa purulenta. Las infecciones mixtas, pueden producir metritis aguda con septicemia y muerte consecutiva o bien crónica seguida de esterilidad. (Fernández et al.; 2009).

Los machos presentan orquitis unilateral con disminución en la producción espermática. Pueden estar afectados uno o ambos sacos escrotales presentando tumefacción aguda y dolorosa, con aumento de hasta dos veces su tamaño

normal, aunque los testículos no se encuentren aumentados de tamaño. La tumefacción es persistente y los testículos experimentan necrosis por licuefacción quedando finalmente destruidos. Los toros afectados pueden quedar estériles cuando la orquitis es aguda, pero pueden seguir siendo fértiles si solo se ve afectado un testículo. Pero siguen siendo propagadores de la enfermedad. (Fernández et al.; 2009).

En ambos sexos se debe considerar la inflamación de las articulaciones, especialmente en rodillas y corvejones. (Fernández et al.; 2009).

6.6. Diagnóstico Laboratorial

Especímenes. Las muestras apropiadas para el diagnóstico de brucelosis dependen de la especie de animal afectada, especie de *Brucella* envuelta, y presentación clínica. Material absceso, semen, y fluidos vaginales asociados con abortos recientes son útiles para recuperar organismos antemortem. Muestras de leche de vacas y cabras son usadas en aislamiento antemortem y para evaluación inmunodiagnóstica. Los hallazgos a la necropsia, incluyen, en vacas gestantes puede encontrarse placentitis necrosante y endometritis ulcerativa, reacciones inflamatorias en tejidos fetales abortados, en rara ocasión se realiza la necropsia en animales adultos. Los hallazgos en fetos incluyen: presencia de líquido serohemorrágico en cavidades y subepidermis, así como bronconeumonía acompañada de congestión, exudado fibrinoso e infiltración celular. En machos las vesículas seminales y el epidídimo pueden estar engrosados con áreas de inflamación intersticial crónica y necrosis del epitelio tubular de las vesículas. El epidídimo presenta granulomas con infiltración de células linfoides, plasmáticas y epitelios que rodean a las células gigantes, algunos granulomas se calcifican. Las membranas basales de muchos túbulos quedan engrosadas con la evidencia ocasional de la supresión de espermatogénesis. En varios órganos fetales se observan lesiones granulomatosas y necrosis focal, así como leptomeningitis granulomatosa. La placenta presenta edema. (Walker, 1999)

Examinación directa. Tinción de Gram del contenido estomacal fetal de un feto abortado y la placenta, revelan un gran número de cocobacilos Gram negativos.

Las tinciones de Macchiavello y Zielh-Neelsen modificada, también son utilizadas para demostrar la *Brucella*. Los organismos pueden ser detectados en semen, pero son usualmente en menor número. *Brucella*, es difícil para detectar por examinación directa en otras muestras, especialmente de animales infectados crónicamente. (Walker, 1999)

Aislamiento. Los tejidos son cultivados directamente en medios sólidos. Comúnmente el medio usado incluye, suero dextrosa, tryptosa, y el medio base agar *brucella* (Albimi). Los cultivos deberían ser incubados a 37°C en 10% de CO₂ por un mínimo de 10 días a un máximo de 21 días en casos altamente sospechosos. (Walker, 1999)

Imunodiagnóstico. La detección de anticuerpos es comúnmente usada para el diagnóstico de brucelosis y en programas de control. Las muestras probadas incluyen, sangre, leche, y ocasionalmente semen. Estas pruebas detectan diferentes clases y tipos de anticuerpos y varían en su sensibilidad y especificidad. Las muestras de sangre individuales pueden ser probadas por aglutinación en tubo, aglutinación en placa, Rosa de Bengala en placa, o pruebas de tarjeta. Otras pruebas incluyen el ensayo de aglutinación en placa buferada, aglutinación en Rivanol, Fijación de complemento y ELISA. (Walker, 1999)

Otros métodos de detección. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de una única copia de ese fragmento original, o molde. Sirve para amplificar un fragmento de ADN; su utilidad es que tras la amplificación resulta mucho más fácil identificar con una muy alta probabilidad el agente causal (Sambrook, *et al.*; Russel 2001).

VII. DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio: Se realizó un estudio observacional de corte transversal.

Periodo de estudio: Se estableció en un tiempo de un año, de Febrero 2015 a Junio 2016.

Área de estudio: Las fincas de la comarca Nawawas están ubicadas a 10 km del casco urbano del Municipio del Ayote, Entre las coordenadas 12° 30´ de latitud norte y 84° 49´ de longitud oeste, La precipitación promedio anual oscila entre los 2,000 y 2,450 mm. Esta zona está considerada la más seca del municipio, lo cual ha sido aprovechada para la expansión de la actividad ganadera. Las otras fincas de la comarca el bambú están ubicadas a 14 km del casco urbano del Municipio del ayote, en cada uno de estas fincas se elabora de manera artesanal el queso y la crema para luego ser comercializado en el mercado local.

A partir de la regionalización del país en 1982, el municipio de El Rama junto con los municipios de Nueva Guinea y Muelle de los Bueyes, del departamento de Zelaya, y el municipio de El Almendro, del departamento de Río San Juan, se incorporaron desde el punto de vista funcional a lo que se denominó Región V, que incluyó a los Departamentos de Boaco y Chontales. Las reformas constitucionales de 1995 implantaron de nuevo la departamentalización, aunque manteniendo las Regiones Autónomas del Atlántico; la Ley creadora del Municipio de El Ayote incluyó a éste en la circunscripción de la RACCS, pero en la práctica no hay ninguna relación político-administrativa de la nueva municipalidad con las autoridades regionales autonómicas, por lo tanto este municipio se atiende por medio de la jurisdicción de Chontales en base a la Sanidad Animal.

Población de estudio: Fincas de las comunidades de El Bambú y Nawawas del municipio de El Ayote, Chontales.

Número total de fincas: Se estimaron para las dos comunidades un total de 50 fincas que se dedican a la elaboración de queso y crema.

Número de fincas en estudio: para tal efecto se utilizó el programa WinEpiscope

2.0, para estimar el número de fincas en estudio, el cual, se realizó detectando la enfermedad, con un total de fincas de 50, una prevalencia de 1% y un nivel de confianza del 95%, dando un total de 48 fincas.

Unidad de análisis: queso y crema

Muestra de análisis: Se tomaron aproximadamente un volumen final, entre 15 y 20 ml de crema por finca y se depositaron en tubos cónicos de 25 ml; con respecto al queso se tomaron 25 gramos por finca y se depositó en bolsas herméticas, todas las muestras se transportaron refrigeradas a 4 °C hasta el CEVEDI de la Escuela de Veterinaria de la UNAN-León.

Fuente de información: Se realizó una encuesta en las fincas de las comunidades donde se realizó el estudio. Se llenaron hojas de registro en cada una de las fincas en estudio para proporcionar datos en cuanto a la producción láctea y datos sobre la enfermedad. Ver anexo No 3.

7.1. Operacionalización de variables.

Cuadro 1 Operacionalización de variables

Variable	Definición	Indicador
<i>Brucella abortus</i>	Bacteria gran negativa es un cocobacilo intracelular, no móvil, sin cápsula, aerobio.	PCR positivo o negativo
Queso	Derivado lácteo obtenido de la leche de Bovinos elaborado de forma artesanal.	Presencia o ausencia de <i>Brucella abortus</i> , a través de PCR
Crema	Derivado lácteo obtenido de la leche de Bovinos elaborada de forma artesanal.	Presencia o ausencia de <i>Brucella abortus</i> , a través de PCR

7.2. Procedimiento de análisis de las muestras

Extracción del ADN. Se realizó a partir de muestras de queso y crema, mediante la utilización del kit Thermo Scientific molecular biology. Las muestras fueron descongeladas y se procedió a realizar la extracción de ADN, tomando 200 µl de crema y 1 gramo de queso, siguiendo las instrucciones del kit.

Amplificación del ADN para especie. Se utilizó un volumen de reacción final de 50 µl, correspondiente a 45 µl de Master Mix, Agua libre de ADNasa, y los cebadores (*Brucella abortus* Forward, 3`GCGGCTTTTCTATCACGGTATTC`5 y Reverse, 3`CATGCGCTATGATCTGGTTACG`5) y 5 µl del ADN extraído. Se utilizó el termociclador Applied Biosystem modelo 2720 con el siguiente programa, 95°C x 10 min, 95°C x 15 seg, 57°C x 1min, 72°C x 90 seg, una extensión de 72°C x 6 min y 45 ciclos, para un amplicon de 150 bp; posteriormente se reveló en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 50 muestras recolectadas entre queso y crema, elaboradas de forma artesanal, todas resultaron negativas a la presencia de *Brucella abortus*. Todas las muestras fueron analizadas con un control positivo y un negativo; demostrando la fiabilidad del ensayo. Los resultados no coinciden con otros estudios realizados en otros países, la cual implementaron la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para la detección de *B. abortus* en leche, queso y crema, como lo establece un estudio realizado por Pullinger, en 1934, en África, examinando productos de leche cruda a granel, para determinar la presencia de Tuberculosis y Brucelosis, reportó que de 31 muestras de crema analizadas 16 resultaron positivas a Tuberculosis y 11 a Brucelosis. En otro estudio realizado en Italia por Federico Capuano, en el año 2012; sobre la detección de *Brucella* en queso prensado de búfalo y vacas, en hatos con alta prevalencia, demostró la presencia de la bacteria en 11 de 98 muestras de queso de búfalo, en 6 de 57 muestras de una mezcla de queso de búfalo y vaca, 1 de 36 muestras de queso de vaca.

Esto puede ser debido a que la prevalencia que se reporta a nivel nacional en Nicaragua es de aproximadamente 2,2%, según datos obtenidos por el programa nacional de control y erradicación de brucelosis. En el Departamento de Chontales en el año 2016, de 1494 muestras analizadas por el IPSA, dos resultaron positivas, para una prevalencia de 0,13%, según datos emitidos por información zoonosanitaria de la OIE para Nicaragua.

Otra de las posibles causas de no haber encontrado muestras positivas a Brucelosis, pudo haber sido por las condiciones de crecimiento de la bacteria, ya que, como se mencionó anteriormente la bacteria es muy lábil, a muchas condiciones medioambientales adversas; como por ejemplo el pH, la *Brucella* crece a un pH óptimo entre 6.6 a 7.4; pero en el queso el pH llega alcanzar un pH de 6.1 a 5.3 (Ramírez, et al., 2012) y la crema alcanza un pH de 5.7 a 5.1 (E. Pacheco de Delahaye, et a., 2008); por lo que las condiciones de acidez

probablemente inhiba el crecimiento de la bacteria.

Según la encuesta realizada en las 50 fincas de las comarcas de El Bambú y Nawawas, Municipio de El Ayote, Chontales; 13 fincas de la comarca el Bambú presentaron abortos y 12 en Nawawas. La frecuencia de abortos por fincas en ambas comarcas se describe en la siguiente tabla.

Cuadro 2 Frecuencia de abortos en fincas por comarca

	Comarcas	
Frecuencia de abortos	Bambú	Nawawas
1	3	2
2	7	6
3	1	3
4	2	1
Total	13	12

IX. CONCLUSIONES

1. Tanto las muestras de queso como de crema, resultaron negativas a la presencia de *Brucella abortus*.
2. De las 50 fincas muestreadas 25 tuvieron problemas de abortos, 13 fincas de la comarca el Bambú y 12 de Nawawas.
3. La mayor frecuencia de abortos presentada en la comarca el Bambú y Nawawas, fue de 2 abortos por año.

X. RECOMENDACIONES

1. Realizar el mismo estudio en otros municipios de la localidad, con el fin, de determinar la presencia o ausencia de la bacteria en productos derivados.
2. Realizar ensayos que logren verificar la viabilidad de la bacteria en altas concentraciones de sal, pH y temperatura.
3. Realizar un diagnóstico diferencial en las fincas que han presentado abortos.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, P.; Szyfres, B. "Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales". Segunda Edición. Organización Panamericana de la Salud. Publicación Científica. No. 503. 1986.

Aguirre VEA, Alvarado GM, Ibañez GJL, Leal HM, Díaz AE, Nevárez MG, Solís MFJ *et al.* Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble. *Téc. Pecu. Méx.* 2008; 46(2):147-158.

Akakpo, A. J. "Brucellosis animales en Afrique tropical. Particularités, epidemiologique, clinique e bacteriologique. *Rev. Eler Med. Pays Trop.* 40:307. 1991.

Capuano Federico, Rosanna capparelli, Andrea Mancusi, Salvatore Esposito, Federica corrado and Achille Guarino, 2013.

Detection of brucella spp. In stretched curd cheese as assessed by molecular assays. *Journal of Food Safety.* 33 (2013) 145–148.

Censo Nacional Agropecuario, Instituto Nacional de información de desarrollo INIDE, Ministerio Agropecuario MAG 2013.

Dwight C. Hirsh and Yuan Chung Zee. *Veterinary Microbiology.* Richard L. Walker. *Brucella.* Capitule 37. Pp: 196-203, 1999.

E. J. Pullinger. Examination of milk products for Tubercle bacilli and *Brucella abortus*. Research institute in animal pathology, royal veterinary College, London, 1934.

E. Pacheco de Delahaye, A. Rojas y N. Salinas. Caracterización físico-química de cremas de leche. *Revista de Facultad de Agronomía.* Volumen 25. Número 2, 2008.

Fernández Camacho, Eddy; Gómez Villalobos. Brucelosis. Revista médica de Costa Rica y Centroamérica, 2009.

García -Carrillo, C. La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección Humana. O.I.E., Paris, 1987.

González MD, Garza FH, Sánchez-Yáñez JM. Contaminación de productos lácteos por *Brucella* spp y otras bacterias en el municipio Higuera, Nuevo León, México; Junio 2009.

Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Informe sección de información y vigilancia, División de Sanidad animal, Sugerencia de fomento y servicios. ICA, Bogota, 118 p, 1999.

Joseph Sambrook, *et al.*; David W. Russel. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. edición). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Leal-Klevezas, D; Martínez-Vásquez, I; García-Cantu; López-Merino, A; Martínez-Soriano, J. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Veterinary Microbiology* 75, 91-97, 2000.

Maneu Soriano, Salvador, Estudio clínico de la brucelosis.- XIV Symposium Regional de Cataluña y Baleares sobre Patología infecciosa veterinaria, 1975.

Morata, P; Queipo-Ortuño, I; Reguera, M; Miralles, F; López González, J; Colmenero. Diagnostic Yield of a PCR Assay in Focal Complications of Brucellosis. 39:10 3743-3746, 2001.

Querol Sanchis, Joaquim. Diagnóstico clínico y laboratorial de la brucelosis.- XIV Symposium Regional de Cataluña y Baleares sobre Patología infecciosa veterinaria, 1975.

Rentería Evangelista, T. B., Organes De los Santos, H., Licea Navarro, A. F., Medina Basulto, G. E., Nielsen, K., Montaña Gómez, M. F.,... & Pujol Manríquez, L. C. Evaluación de la prueba reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 43(1), 117, 2012.

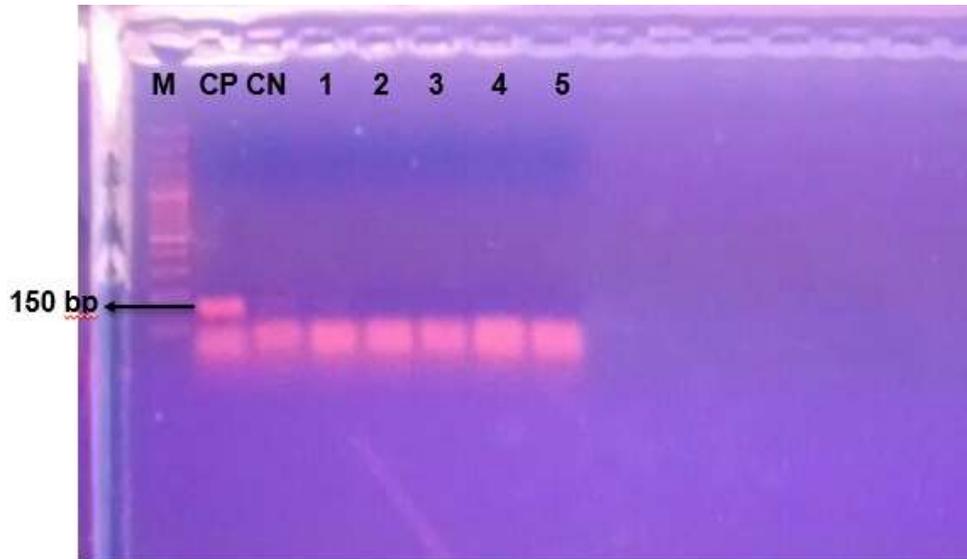
Richar Iván Rodríguez-Hidalgo, Javier Contreras-Zamora, Washington Benítez Ortiz, Karina Guerrero-Viracocha, Holger Salcan-Guaman, Elizabeth Minda, y Lenin Ron Garrido, et al. Frente de la Salud Pública. 2015; 3: 45. Publicado en Internet el 2015 Mar 10.

Xiomara Mosquera C, Ing Biotec, Carmen Bernal V, Bact, Carlos Muskus L, P.hD, Jesús Berdugo G, MV, et al. Rev.MVZ Córdoba, Detección de *brucella abortus* por PCR en muestras de sangre y leche de vacunos, 2008

XII. ANEXOS

Anexo N°1

Grafico 1 Gel de agarosa.



Gel de agarosa al 1.5%. M: Marcador de peso molecular; CP: Control positivo; CN: Control negativo; 1,2,3,4,5 corresponde a las muestras. Amplicon: 150 bp.

Grafico 2 Cantidad de muestras recolectadas por comarcas



Grafico 3 Cantidad de fincas que presntaron abortos por comarcas



Grafico 4 Frecuencia de abortos por comarcas



Anexo N°2: Fotos de la Recolección de muestras en fincas donde se realizo el Estudio.

Anexo 1 Recolección de muestra de queso, en finca San Ramón, comarca de Nawawas.



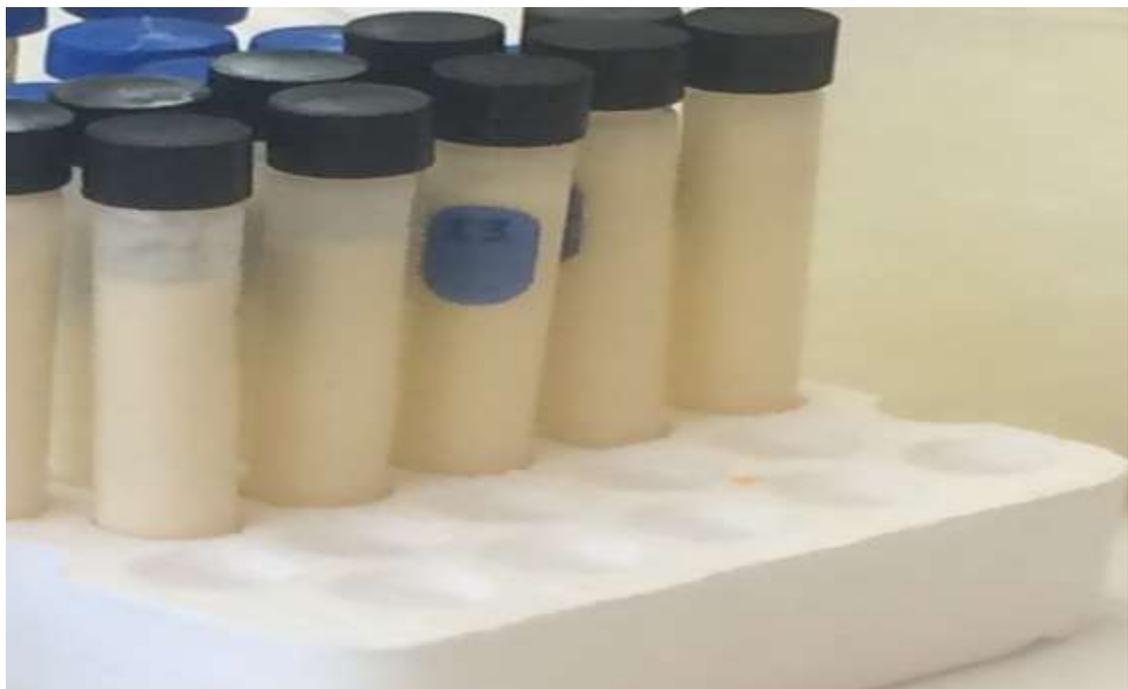
Anexo 2 Recolección de muestra de queso en la finca las maravillas, comarca de Nawawas.



Anexo 3 Materiales que se utilizan para la elaboración de queso artesanal.



Anexo 4 Recolección de muestras de crema, en finca Bendición de Dios, comarca El Bambú.



Anexo 5 Empacado y enumeración de muestras de queso



Anexo 6 Toma y empacado de muestra de queso en finca, valle encantado, comarca el Bambú.



ANEXO N°3: ENCUESTA

La presente encuesta está dirigida a pequeños y medianos productores que se dedican a la elaboración y comercialización de leche y derivados (queso, crema, cuajada, etc.), con el fin de conocer sobre el estado sanitario frente a Brucelosis, tanto en fincas como en la inocuidad de los productos elaborados de forma artesanal. La información contenida en la presente encuesta será manejada de forma confidencial, respetando los principios éticos.

DATOS GENERALES:

1. Identificación y localización de la explotación.

No. de registro de la finca: _____ Fecha: _____
Nombre de la finca: _____ Comarca: _____
Municipio: _____ Departamento: _____ Ubicación: _____
Nombre del Propietario: _____
Nombre de la persona encuestada: _____
Cargo: _____ Años de trabajo: _____

DATOS REFERENTES A LA PRODUCCIÓN Y AL MANEJO DE LA EXPLOTACIÓN

2.1. Producción

Tipo de explotación: Intensiva ___ Extensiva ___ Mixta ___
Tipo de producción: Leche ___ Carne ___ Mixto ___ Otros ___
Inventario de otros animales: Ovejas ___ Cabras ___ Perros ___ Gatos ___ Mulas: ___
Caballos ___ Otros ___

2.2. Censo.

Total de Bovinos: _____
Terneros menores de 1 año: _____
Novillos 1 a 2 años: _____
Novillos 2 a 3 años: _____
Novillos de 3 a más años: _____
Torete para reproducción: _____
Toros sementales: _____
Bueyes: _____
Terneras menores de 1 año: _____

Vaquillas 1 a 2 años: _____
Vaquillas 2 a 3 años: _____
Vaquillas de 3 a más años: _____
Hurras: _____
Paridas: _____
En ordeño: _____

2.3. Manejo del hato.

a. Procedencia del agua de bebida para los animales:

De pozo: Sí ___ No ___ De estanque: Sí ___ No ___ De río: Sí ___ No ___

Ojos de agua: Sí ___ No ___ Otros: Sí ___ No ___

b. Contactos posibles con otros hatos y animales. Sí ___ No ___

c. Procedencia de animales de reemplazo:

Vecino: ___ local: ___ Feria: ___ Extranjero: ___ Otros: ___

d. Sistema reproductivo empleado:

Monta natural: ___ Inseminación artificial: ___ Mixta: ___

e. Procedencia del toro y/o semen empleado:

Vecino: ___ local: ___ Feria: ___ Extranjero: ___ Otros: ___

f. Intervalo entre parto-parto: _____

g. Repetición de celo: Sí _____ No _____ Cantidad de vacas: _____

2.4. Patologías.

a. Presencia de abortos: Si ___ No ___

b. Número de abortos: _____

c. Frecuencia de abortos:

Diario: _____ Semanal: _____ Mensual: _____ Anual: _____

d. Destino de los tejidos abortados: Entierro: ___ Incinerado: ___ Botar a la basura: ___

Consumo de animales ___ Qué animales: _____

e. Tratamiento contra la enfermedad: Si ___ No ___ Con qué: _____

f. Destino de los animales enfermos: Venta. ___ Sacrificio. ___

g. Nacimiento de animales débiles: Si ___ No ___

h. Presencia de metritis o retención placentaria en las hembras: Si ___ No ___

2.5. Exámenes de Laboratorios.

- a. Se ha realizado diagnostico de brucelosis a los animales de su finca: Si ____ No ____
- b. Con que frecuencia: Cada 3 meses ____ Cada 6 meses ____ Anual ____

2.6. Sistema productivo.

- a. Cantidad de leche total: _____
- b. Promedio de leche por vaca: _____
- c. Destino de la leche: Consumo ____ Acopio ____ Venta ____ Otro ____
- d. Tratamiento de la leche: Pasteurización ____ Cocción ____ Otros ____
- e. Consumo de leche: Cruda ____ Cocida ____
- f. Cantidad de queso elaborado: _____
- g. Cantidad de crema elaborada: _____
- h. Elaboración del queso y crema: Artesanal ____ Equipo industrial ____ Otros ____
- i. Destino del queso y la crema: Consumo ____ Venta ____ Otro ____