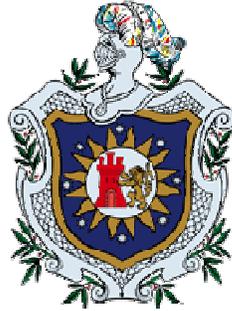


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA, LEÓN**  
**UNAN - LEÓN**  
**ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIAS**



Tesis para optar al título de Máster en Medicina Preventiva con mención en Salud  
Pública

**Tema: Identificación de *B. abortus* en leche no pasterizada del Centro de Acopio Santo Tomas, Municipio de El viejo y la quesera La Pollera, Municipio de La Paz Centro, Mayo a Diciembre del 2015.**

**Autor: Lic. Gladys Lizeth Castillo Paguaga**

**Tutor: MSc. José Luis Bonilla, DMV.**

León, diciembre del 2017

**“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”**

## INDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>5</b>
<b>4. JUSTIFICACION</b>	<b>6</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>5.1. Objetivo General</b>	<b>7</b>
<b>5.2. Objetivos Específicos</b>	<b>7</b>
<b>6. MARCO TEORICO</b>	<b>8</b>
<b>6.1. La Leche</b>	<b>8</b>
<b>6.1.1. Proteínas</b>	<b>9</b>
<b>6.1.2. Componentes Grasos</b>	<b>10</b>
<b>6.1.3. Minerales</b>	<b>11</b>
<b>6.1.4. Vitaminas</b>	<b>12</b>
<b>6.1.4.1. Vitaminas Liposolubles</b>	<b>12</b>
<b>6.1.4.2. Vitaminas Hidrosolubles</b>	<b>12</b>
<b>6.1.5. Características organolépticas y Propiedades Químicas de la Leche</b>	<b>13</b>
<b>6.1.5.1. Textura</b>	<b>13</b>
<b>6.1.5.2. Color</b>	<b>13</b>
<b>6.1.5.3. Sabor</b>	<b>13</b>
<b>6.1.5.4. Olor</b>	<b>13</b>
<b>6.1.6. Vía Endógena</b>	<b>13</b>
<b>6.2. Antecedentes Históricos</b>	<b>14</b>
<b>6.3. Etiología</b>	<b>15</b>

6.4. Epidemiología	18
6.5. Diagnostico	19
6.5.1. Tipo de diagnóstico	19
6.7 En Nicaragua	21
<b>7. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>23</b>
7.1 Tipo de estudio	23
7.2 Periodo del estudio	23
7.3 Lugar de estudio	23
7.4 Población de estudio	23
7.4 Tamaño de la población	23
7.5 Tamaño de la muestra	23
7.6. Factores de exclusión	24
7.7. Factores de inclusión	24
7.8 Unidad de análisis	24
7.9 Recolección de las muestras	24
7.10. Plan de análisis	24
7.11. Operacionalización de variable	24
7.12. Recolección de la información	25
7.13 Procedimiento de análisis de la muestra	25
7.14. Resultados esperados	26
7.15. Beneficiarios	26
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>19</b>
<b>11. RECOMENDACIONES</b>	<b>30</b>
<b>12. REFERENCIA BIBLIOGRAFIA</b>	<b>31</b>
<b>12. ANEXO</b>	<b>36</b>
12.1. CRONOGRAMA	36
12.2. PRESUPUESTO	37
12.3. ENCUESTA	40

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios padre celestial por la vida, sabiduría, paciencia y la fortaleza, al culminar esta etapa de mi vida.

A mi familia y amigos, al tener la paciencia en mis alegrías, tristeza, mis penas y por lo fuerte que me hacen.

Al Dr., José Luis Bonilla Espinoza por haber confiado en mi persona, concederme parte de su tiempo y llevar a cabo esta investigación.

## **DEDICATORIA**

A Dios, porque me ha prestado vida, fe, sabiduría, entendimiento, paciencia y permitiéndome alcanzar mis metas propuestas.

A mi familia, al tener la paciencia en mis alegrías, tristeza, mis penas, brindarme su apoyo incondicional y por lo fuerte que me hacen.

A la memoria de mi madre Gladys Paguaga Baca, por todas las enseñanzas que me dejo.

## GLOSARIO

<b>Aborto</b>	Es la interrupción y finalización prematura de la gestación.
<b>Acopio</b>	A juntar, reunir la cantidad de una cosa.
<b>Biovares</b>	Cepa es, en microbiología, población de células de una sola especie descendientes de una única célula.
<b>Brucella</b>	Es un género de bacterias Gram negativas conocido principalmente por ser productor de la enfermedad brucelosis.
<b>Brucelosis</b>	Es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, producida por bacterias del género Brucella.
<b>Enfermedad</b>	Alteración leve o grave del funcionamiento normal de un organismo.
<b>Ganado</b>	Es el conjunto de animales criados por el ser humano.
<b>Genero</b>	Es una categoría taxonómica que se ubica entre la familia y la especie.
<b>Genoma</b>	Es el conjunto de genes contenidos en los cromosomas.
<b>Infectocontagiosas</b>	Son las enfermedades de fácil y rápida transmisión, provocadas por agentes patógenos.
<b>Leche</b>	Sustancia líquida y blanca que segregan las mamas de las hembras de los mamíferos para alimentar a sus crías.
<b>Molecular</b>	Término latino que denomina a una masa de pequeño o mínimo tamaño.
<b>Notificación</b>	Documento en el que se notifica o se comunica una cosa de manera oficial.
<b>Pasteurizada</b>	Es un proceso térmico que es realizado en líquidos (generalmente alimentos) con la intención de reducir la presencia de agentes patógenos.
<b>PCR</b>	La reacción en cadena de la polimerasa.
<b>Portador</b>	Que lleva en su cuerpo las bacterias o los virus que causan una enfermedad y los puede transmitir o contagiar.
<b>Salud</b>	Estado en que un ser u organismo vivo no tiene ninguna lesión ni padece ninguna enfermedad y ejerce con normalidad todas sus funciones.
<b>Sanidad</b>	
<b>Pool</b>	La agrupación de entes o elementos, que poseen una o varias características en común.

**Identificación de *B. abortus* en leche no pasterizada del Centro de Acopio Santo Tomas, Municipio de El viejo y la quesera La Pollera, Municipio de La Paz Centro, Mayo a Diciembre del 2015**

**\*Castillo Gladys, \*\*Bonilla J.L.**

\*Autor, Tesis para optar al título de Máster en Medicina Preventiva con énfasis en Salud Pública

\*\*Tutor Principal, Docente Titular, Microbiología e Inmunología Veterinaria, UNAN-León.

**RESUMEN**

Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa, que afecta tanto animales domésticos, silvestre y mamíferos marinos, así como al ser humano, causada por una bacteria del género *Brucella* (1,12). Es una importante enfermedad zoonótica, puede ser transmitida por contacto directo con los animales o por la ingesta de subproductos derivadores de la leche sin pasteurizar (leche cruda, cuajada, quesos). **En el presente estudio tiene como objetivo determinar la presencia de *Brucella abortus* en** muestras de leche no pasterizada del centro de acopio Santo Tomas, Municipio de El Viejo y la quesera La Pollera, municipio La Paz Centro, febrero 2015 a junio 2016. Se realizó la recolección de muestras de leche no pasterizada en 17 finca asociadas al centro de acopio de leche de Santo Tomas del municipio de El Viejo y 23 finca que entregan leche a la quesera La Pollera del municipio de La Paz Centro, obteniendo 40 fincas en total. Las muestras fueron analizadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) convencional, utilizando cebadores específicos frente a *B. abortus*. Del total de muestras de leche analizadas ninguna resultó positiva a *Brucella abortus*; por lo que se concluye que el estatus zosanitario frente a Brucelosis bovina se mantiene baja, y que los productos de la leche son inocuos a la bacteria.

**Palabras claves:** Identificación, *Brucella abortus*, PCR, Leche.

## 1. Introducción

Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa, aguda o crónica, que afecta tanto animales domésticos, silvestre y mamíferos marinos, así como al ser humano, causada por una bacteria del género *Brucella* (1,12). Es una enfermedad de un fuerte impacto económico en la ganadería y riesgo para la salud pública (14). Es una importante enfermedad zoonótica, puede ser transmitida por contacto directo con los animales o por la ingesta de subproductos derivadores de la leche sin pasteurizar (leche cruda, cuajada, quesos) (4), es un riesgo laboral para agricultores, veterinarios, laboratorista, trabajadores de mataderos y rastros municipales (11), de ahí, que radica la importancia en la salud pública.

En bovinos la brucelosis está relacionada con problemas sanitarios, reproductivos y de producción (13), la cual provoca disminución en la producción de leche, carne, abortos y problemas de fertilidad (3). Hay que tener en cuenta que algunas vacas pueden quedar como portadoras y excretar las bacterias de manera intermitente durante varios años (15). Igualmente, las vacas gestantes o que han abortado pueden infectar los pastos y aguas que consumen los animales, por secreciones, membranas fetales, y fetos abortados de vacas infectadas, mediante la inseminación artificial con semen infectado (16), por tal razón esta enfermedad se considera de declaración y notificación obligatoria.

En Nicaragua, la mayoría de los sistemas de explotación de la ganadería bovina son de doble propósito, donde se obtienen ambos productos (carne y leche). El ganado de carne, al igual que el lechero, es propenso a la brucelosis y otras enfermedades (10). Las principales vías de transmisión por *brucella* en humanos es digestiva, a través de consumo de productos lácteos contaminados (20), de ahí, que radica la importancia en la salud pública.

En los últimos años se han descritos varias estrategias moleculares para la identificación y diferenciación entre biovars y especies del género *Brucella*. La

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha sido empleada en varios estudios para detectar la presencia de *Brucella spp* en muestras de sangre, leche y otros materiales contaminados. El hecho de amplificar secuencias específicas de Ácidos Desoxirribonucleicos (ADN) bacteriano permite plantear que sea utilizada como un método rápido y confiable en el diagnóstico de brucelosis. <sup>(3)</sup>. La técnica proporciona un método rápido, sensible y específico para el diagnóstico de la brucelosis <sup>(18)</sup>.

En el presente estudio tiene como propósito determinar la presencia de *B. abortus*, en leche no pasteurizada del Centro de Acopio Santo Tomas, municipio de El Viejo y la quera La Pollera, municipio de La Paz Centro.

## 2. Antecedentes

En México, Renteria T., et. al 2005, realizaron un estudio, en el que evaluaron la prueba de reacción en cadena de polimerasa, a partir de muestra de leche y cultivos puros para el diagnóstico de brucelosis bovina, recolectando 51 muestras de sangre y leche de un hato de prevalencia histórica de brucelosis, obteniendo como resultado 11 muestras positivas a todas las pruebas, 6 serología y PCR, 1 serología y bacteriología y 9 serología, las 17 muestra que resultaron positivas a PCR para identificación de *Brucella spp.*

En el estudio realizado por Mosquera X. 2008, en Colombia, a partir del análisis de leche y sangre de animales positivos, de los cuales se evaluaron diferentes métodos de extracción de ADN. De 33 muestras de leche negativas a la prueba de anillo en leche (PAL), el 30.3% (10/33) resultaron positivas por PCR, mientras que el 47% (8/17) de las muestras de leche positivas PAL, fueron positivas por PCR. Al analizar las muestras de sangre de los animales positivos por a la prueba del anillo de leche el 94.1% (16/17) fueron positivas a PCR.

Gamal Wareth, et. al 2014, Egipto, realizaron un estudio con muestra de leche de vaca aparentemente sana (72), búfalos de pequeñas explotaciones (128) y puestos de venta para el consumo humano (15), para un total de 215 muestras. De estas muestras 9 vacas, 7 búfalos y 1 de los puestos resultaron positiva a Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR), de las 17 muestra, 16 detectaron *B. melitensis* específica y 1 *B. abortus* en muestra de leche de vaca.

En Nicaragua el estudio realizado en el municipio de San Pedro de Lovago – Chontales, se obtuvo una prevalencia de hembras bovinas, por medio de la técnica Rosa de Bengala del 0.09% (3/3410), de las cuales se confirmaron con la técnica del Rivanol resultando el 0.06% (2/3) (2/3410).

En Nicaragua, no existen reportes que describa el aislamiento de *B. abortus*, ya sea, por cultivo o por técnicas moleculares en leche o derivados; por lo que el presente estudio correspondería al primero en el país.

#### 4. Justificación

La Brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa, aguda o crónica, que afecta tanto a los animales como al hombre, causada por bacterias del género *Brucella* (15). Se reconocen tres especies clásicas responsables de la brucelosis humana, con especificidad de especie animal, distribución geográfica y peculiaridades patógenas. (15). El ingreso a la finca de animales infectados y el contacto de los animales sanos entre éstos animales, la infección en el ser humano por el consumo de productos derivados de animales infectados tal como la leche sin pasteurizar, contacto directo con animales, son fuentes de diseminación y contagio tanto para el animal como para el ser humano.

Así la necesidad de disponer de un método de diagnóstico, que permita de forma rápida, sensible y específica determinar la infección en muestras de leche, para detectar directamente *B. abortus*, hacen que el presente estudio sea muy relevante e importante para asegurar la inocuidad de los alimentos y asegura la seguridad alimentaria del país.

### 3. Planteamiento del problema.

La brucelosis es una importante zoonosis de impacto económico, que produce graves complicaciones en animales y humanos <sup>(17)</sup>. Se estima que anualmente existen en el mundo más de 500,000 casos nuevos de brucelosis en humano. La enfermedad es endémica en países del Mediterráneo, Centro y Sudamérica, algunas partes de México, Asia y el medio Oriente. A nivel mundial se calcula una incidencia en zonas endémicas que llega hasta más de 200 casos por cada 100,000 habitantes <sup>(19)</sup>.

Por lo antes descrito se plantea lo siguiente, ¿Se encuentra presente la bacteria *B. abortus* en leche cruda de bovino en el centro de acopio de Santo Tomas ubicado en el municipio de El Viejo y la quesera La Pollera, municipio de La Paz Centro?

## 5. Objetivos

### 5.1. Objetivo General

Determinar la presencia de *Brucella abortus* en muestras de leche no pasteurizada del centro de acopio Santo Tomas, Municipio de El Viejo y la quesera La Pollera cadena de la polimerasa) PCR a partir de muestra de leche no pasteurizada., municipio de La Paz Centro, febrero 2015 a junio 2016.

### 5.2. Objetivo Específicos.

Identificar *Brucella abortus* mediante la técnica molecular (Reacción en

Identificación de las fincas positivas a *Brucella abortus* que se encuentra dentro del centro de acopio de Santo Tomas y la quesera La Pollera.

## 6. Marco Teórico.

### 6.1 La Leche.

Es el producto líquido secretado por la glándula mamaria de las hembras mamíferas, siendo el alimento único durante el periodo de lactancia de las diferentes especies. La composición de la leche no es estable a lo largo de la lactancia y puede verse afectado por factores relacionados con la raza, intervalo entre ordeños, cuartos de la ubre, estaciones climáticas, alimentación, enfermedades, temperatura ambiental, edad, la especie, etc., afectando en gran medida la calidad del producto (23, 26). Tanto en la leche como en los otros productos lácteos elaborado a partir de ella, cualquier cambio en la composición se verá reflejado en aspectos nutricionales, tecnológicos y económicos (27). La leche es el alimento más completo que la naturaleza nos ofrece, por proveer nutrientes fundamentales para el crecimiento (25). En la tabla 1 se refleja la composición de la leche de diferentes mamíferos (26, 32).

**Tabla # 1 Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 gr)** (26).

	Vaca	Búfalo	Mujer
Agua	88	84	87.5
Energía kcal	61	97	7.0
Proteína	3.2	3.7	1.0
Grasa	3.4	6.9	4.4
Lactosa	4.7	5.2	6.9
Minerales	0.72	0.79	0.20

(Gómez A. et al 2010)

La leche es un alimento casi completo, ya que sólo es pobre en hierro, vitamina D y vitamina C. Su riqueza en energía, proteínas de fácil asimilación, grasa, calcio, fósforo y varias vitaminas hacen de la leche el alimento básico. Su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales y como fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina). Por otra parte, los lípidos y la lactosa constituyen un

importante aporte energético (26, 31). La leche contiene una serie de nutrientes, 87.5 % de agua, 35 % de proteínas animales, 45% de lactosa, 6% de minerales y vitaminas A y D. (30).

**Tabla. # 2 Composición porcentual promedio de las diferentes razas bovinas, cabra, ovejas y búfalo** (31, 32).

	<b>Grasa</b>	<b>Proteínas totales</b>	<b>Lactosa</b>	<b>Solidos No graso</b>	<b>Ceniza</b>
<b>Bovinos</b>	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Holstein	3.64	3.16	4.7	12.9	0.73
Pardo suiza	3.98	3.52	ND	ND	ND
Guernsey	4.46	3.47	4.9	14.6	0.74
Jersey	4.64	3.73	4.9	14.9	0.71
Ayshiere	4.0	3.6	5.0	13.4	0.73
Raza	3.4	3.3	4.9	12.3	0.68
<b>Caprinos</b>	3.50	3.13	4.55	8.68	0.80
<b>Ovinos</b>	7.62	6.21	3.70	10.33	0.90
<b>Búfalos</b>					
Mediterránea –italiana	7.90	4.30	ND	10.20	ND
Murrah India	7.90	4.60	3.60	10.20	ND
Murrah Búlgara	8.00	4.50	4.80	10.20	ND

(Pérez M. et al 2011 y Hazard S. et al 2006)

### 6.1.1 Proteínas.

La proteína láctea es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes y de pesos moleculares, de las cuales se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). De las principales proteínas presentes en la leche es la caseína (26, 33). Estas proteínas se clasifican como proteínas de calidad con alto valor biológico, buena digestibilidad (97% a 98%), una rápida absorción y utilización en el cuerpo. (34).

**Tabla # 3** Composición de la leche de diferentes mamíferos <sup>(32)</sup>.

	Agua	MS	Grasa	PC	Caseína	Albumina globulina	Lactosa	Ceniza
Especie	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Vaca	87.6	12.4	3.4	3.5	3.0	0.5	4.6	0.8
Oveja	83.9	16.1	6.2	5.2	4.2	1.0	4.2	0.9
Cabra	86.9	13.1	4.1	3.8	2.6	1.2	4.4	0.9
Yegua	89.3	10.7	1.6	2.5	1.6	0.9	6.1	0.5
Burra	91.2	9.8	1.2	1.5	0.9	0.6	6.0	0.4
Búfala	82.7	17.3	7.9	5.9	5.4	0.53	4.5	0.8
Llama	86.6	13.4	3.2	3.9	3.0	0.9	5.6	0.8
Camella	88.3	11.7	2.5	3.6	-	-	5.0	0.7
Rena	64.3	35.7	19.7	10.9	8.7	2.2	2.6	1.4
Cerda	82.4	17.6	5.0	7.0	3.7	3.3	5.0	0.6
Perra	67.8	32.2	16.0	12.0	9.2	2.8	2.0	2.2
Gata	68.0	32.0	15.0	12.0	9.3	2.7	3.0	2.0
Coneja	46.7	53.3	44.0	-	7.0	-	1.8	0.5

(Hazard S. et al 2006)

### 6.1.2. Componentes grasos.

La grasa láctea se sintetiza en su inmensa mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche; el contenido total de lípidos como el de ácidos grasos puede variar considerablemente como respuesta a cambios en la dieta, raza del animal y el estado de lactancia entre un 3 y un 6%. El factor que más influye en el contenido de lípidos en la leche es, en definitiva, la especie animal (tabla 4). <sup>(26, 31)</sup>. La grasa de la leche es una buena fuente de energía y un excelente medio de transporte de las vitaminas liposolubles A, D, E, y K. El caroteno, precursor de la vitamina A, da a la leche el color “crema”, son los componentes mayoritarios de la leche de todas las especies estudiadas, constituyendo más del 95% del total de sólidos en leche. Existen tres tipos de lípidos: grasas o aceites (triglicéridos o triacilglicéridos), fosfolípidos y ésteres de colesterol (ácidos grasos). La leche contiene unos 15 mg de colesterol por cada 100 gramos, variando en función del tipo y origen <sup>(30, 31)</sup>.

La composición grasa se encuentra en forma de partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos, cuyos diámetros pueden variar de 0.1 a 0.22 micrones que se encuentran rodeados de una capa de fosfolípidos que

evitan que la grasa se aglutine y pueda separarse de la parte acuosa de la leche. La fracción grasa de la leche se presenta en forma de glóbulos microscópicos de unas 4.4 m diámetro en forma de emulsión. (26, 31). La grasa de la leche puede ser afectada por el estado sanitario de la ubre cuando presentan procesos inflamatorios o infecciosos, presentando disminución significativa de la producción (26).

**Tabla # 4. Contenido de lípidos en la leche de diferentes especies de mamíferos y**

**Sólidos totales** (32).

	Sólidos totales	Lípidos	Proteínas	Hidratos de carbona (lactosa)
<b>Rinoceronte negro</b>	8.8	0.2	1.2	6.6
<b>Yegua</b>	10.5	1.3	1.9	6.9
<b>Mujer</b>	12.4	4.1	0.8	6.8
<b>Vaca</b>	12.4	3.7	3.2	4.6
<b>Oveja</b>	18.2	7.3	4.1	5.0
<b>Rata</b>	22.1	8.8	8.1	3.8
<b>Perro</b>	22.7	9.5	7.5	3.8
<b>Reno</b>	26.3	10.9	9.0	3.4
<b>Ratón</b>	29.3	13.1	9.0	3.0
<b>Conejo</b>	31.2	15.2	10.3	1.8
<b>Oso pardo</b>	33.6	18.5	8.5	2.3
<b>Morsa</b>	41.0	30.7	8.6	0.3
<b>Foca elefante</b>	64.4	48.8	7.6	0.3

(Pérez M. et al 2011)

### 6.1.3. Minerales.

La leche de vaca contiene los minerales principales: calcio(Ca), fósforo(P), azufre(S), cloro(Cl), sodio(Na), potasio(K) y Magnesio(Mg) y en muy pequeñas cantidades, hierro(Fe), flúor(F), cinc(Zn), yodo(I), molibdeno(Mo), cromo(Cr) y cobalto(Co), cobre(Cu), selenio(Se), manganeso(Mn). Además, se reconoce la presencia de otros en cantidades vestigiales, como el aluminio y plata. En la membrana de los glóbulos grasos se encuentran en mayor concentración el calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo y zinc. Una parte de los metales, sobre todo los alcalinos y los halógenos, se encuentran libres en forma de iones en solución. El calcio, por el contrario, se halla en su mayor parte ligado a la caseína. Tan sólo un tercio del calcio y del magnesio se encuentra en disociación iónica. Además de los cloruros y fosfatos,

deben mencionarse también los citratos, presentes en una cuantía media de 2.3 gr/Lt. (26, 30, 31).

La alimentación del animal y los cambios estacionales no influyen de manera significativa en la concentración de minerales en la leche, por lo tanto el contenido mineral casi no varía a lo largo del año. El contenido de calcio, fósforo y magnesio no depende de la ingestión porque el animal puede recurrir a sus reservas óseas; tampoco se modifican las concentraciones de sodio, potasio y cloro aun cuando aumente la ingestión (31).

#### **6.1.4. Vitaminas.**

La leche contiene una gran cantidad de vitaminas en diferente proporción, pueden ser hidrosolubles y liposolubles.

**6.1.4.1 Vitaminas liposolubles:** tanto la leche como los productos lácteos son considerados una importante fuente alimentaria de vitamina A. Tanto la vitamina A como sus precursores llamados carotenoides -principalmente b-caroteno- están presentes en distintas cantidades en la fracción grasa de la leche. La vitamina D interviene en la absorción del calcio y fósforo en el intestino y resulta indispensable para el buen mantenimiento del esqueleto a lo largo de la vida. Se encuentra en muy bajas concentraciones en el caso de leche y derivados a los que no se les ha adicionado esta vitamina. La vitamina E también llamada *tocoferol* es considerada un antioxidante que protege a las membranas de las células del daño por radicales libres. Además, participa en la respuesta inmunitaria. Incluso algunos estudios la consideran como un factor de protección de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares. Esta vitamina está presente en la leche en bajas concentraciones al igual que la vitamina K (26, 31).

**6.1.4.2. Vitaminas hidrosolubles:** tanto la leche como sus derivados contienen la gran mayoría de las vitaminas solubles en distintas cantidades, aunque destacan el

contenido de vitamina B2 (riboflavina) y niacina; la leche aporta en menor cantidad vitamina B1 (tiamina), vitamina B6 (piridoxina) y ácido fólico (26, 31).

#### **6.1.5. Características organolépticas y propiedades físicas de la leche.**

Algunas propiedades físicas de la leche como su densidad, viscosidad y tensión superficial dependen de sus constituyentes; otras como el índice de refracción y el punto crioscópico, dependen de las sustancias en solución; finalmente, otras como el pH y la conductividad, dependen únicamente de los iones o de los electrones, como es el caso del potencial de óxido-reducción (29, 31).

**6.1.5.1 Textura:** La leche tiene una viscosidad de 1,5 a 2,0 centipoises a 20 °C, ligeramente superior al agua (1,005 cp). Esta viscosidad puede ser alterada por el desarrollo de ciertos microorganismos capaces de producir polisacáridos que por la acción de ligar agua aumentan la viscosidad de la leche (leche mastítica, leche hilante) (29).

**6.1.5.2. Color:** El color normal de la leche es blanco, el cual se atribuye a reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato- fosfato-cálcico en suspensión coloidal y por los glóbulos de grasa en emulsión. Otros colores (amarillo, azul, etc.), pueden ser producto de contaminación con sustancias coloreadas o de crecimiento de ciertos microorganismos (29).

**6.1.5.3. Sabor:** El sabor natural de la leche es difícil de definir, normalmente no es ácido ni amargo, sino más bien ligeramente dulce gracias a su contenido en lactosa (29).

**6.1.5.4. Olor:** El olor de la leche es también característico y se debe a la presencia de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular, entre ellos, ácidos, aldehídos, cetonas y trazas de sulfato de metilo (29).

## 6.2. Antecedentes Históricos.

Las informaciones más antiguas referentes a casos humanos se atribuyen a Hipócrates (450 a. de C.). Durante la guerra de Crimea (1854-1856) se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas, por lo que se sospechó una infección nueva, la cual se extendió a los países del Mediterráneo, en particular a la isla de Malta (22). En 1859 Marston hizo el primer informe clínico, realizando un cuidadoso estudio clínico y autopsias en los individuos con tales síntomas, detalló la enfermedad según apareció en la isla y confirmó la presencia del padecimiento en otras zonas (19).

En 1886, el médico anátomo-patólogo militar inglés David Bruce, quien fue enviado a investigar a la Isla de Malta la causa de un padecimiento febril que había producido la muerte de un número considerable de soldados, en 1887 aisló e identificó la cepa *Micrococcus melite* (*Brucella melitensis*) a partir del bazo de cuatro soldados fallecidos, la primera especie conocida del género. También demostró el alto grado de capacidad del microorganismo para producir la enfermedad y su diseminación a los diferentes órganos en un individuo infectado. Posteriormente en 1904 el gobierno Inglés lo mandan a Malta con una comisión investigadora llamada Mediterranean Fever Commission (19, 22, 24).

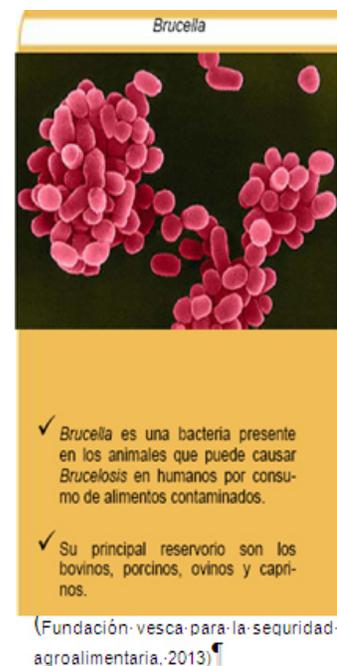
Desde 1893 aparecen casos de fiebre ondulante en Portugal, fueron aumentando en los años subsiguientes. En España ya existía desde el siglo XVI en la Málaga, Cadiz, Murcia y Toledo, pero en 1905 se confirma su presencia, así como el incremento en los casos en la población caprina. En 1896 Bang, un veterinario danés descubrió el agente causal del aborto bovino, que en un futuro se denominó *B. abortus* y en 1905 Themistokles Zammit documentó el papel que tenían las cabras y el consumo de sus productos, como fuente de contagio para adquirir la enfermedad. (19, 22).

En 1896 el Veterinario danés Bang, identificó al microbio causante del aborto epizoótico bovino. En 1914 Traum aisló un microorganismo en los fetos abortados de cerdos que denominó *B. suis*. En 1920 la bacterióloga norteamericana Alice Evans comprobó la semejanza de los microorganismos aislados por Bruce, Bang y Traum y sugirió

designar el agente causal con el nombre de *Brucella*, en honor a Sir David Bruce. A partir de aquí, diferentes investigadores bacterias en variados animales, que forman parte del genero *Brucella*. Actualmente este género incluye 7 especie, .en 1956 Buddle y Boyce identifican *B. ovis* en carneros, en 1957 Stoenner y Lackman aíslan *B. neotomae* y en 1968 Carmicheal y Bruner descubren *B. canis* en perro. Ahora sabemos que la bacteria responsable de la fiebre de Malta es la *B. melitensis*. Recientemente se han descubierto dos nuevas especies de *Brucella* denominadas *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* en ballenas (19, 22).

### 6.3. Etiología.

Los microorganismos del género *Brucellae* son bacilos gram negativos con un tamaño entre 1. 5 y 0.7  $\mu\text{m}$  de longitud y entre 0.6 y 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho, no encapsulados, inmóviles, no formadores de esporas, de crecimiento lento, aerobios estrictos e intracelulares facultativos, son oxidasa y catalasa positivos, a excepción de las especies *B. neotomae* y *B. ovis* que son oxidasa negativas. No atacan la gelatina ni modifican la leche y no fermentan los azúcares. Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitritos como aceptores de electrones. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C a pH entre 6,6 y 7,4. *Brucella* spp. requiere biotina, tiamina y nicotinamida en su medio de cultivo (19, 36, 37)..



Su crecimiento en cultivo se favorece por adición de sangre o suero y es inhibido por sales biliares, telurito o selenito. En medios sólidos adecuados se observan colonias bien delimitadas, ligeramente convexas, con un tamaño entre 1 y 3 mm de diámetro, bordes lisos, translúcidas y de color miel pálida. Las especies de *Brucella* spp., sobre todo *B. melitensis*, manifiestan una tendencia marcada a la disociación lisa-rugosa. El aspecto diferente de estas colonias reside en el tipo de lipopolisacárido (LPS) expresado en su superficie. Las cepas en fase lisa son más virulentas que en fase rugosa. Las colonias rugosas son menos transparentes, los bordes son irregulares y el

color cambia desde un blanco mate a marrón. Es importante poder diferenciar las colonias lisas de las rugosas e intermedias, ya que para la preparación de vacunas y de antígenos para las pruebas serológicas y la identificación de las cepas recién aisladas es necesario partir de brucelas en fase lisa (37).

Se ha secuenciado el genoma completo de *B. melitensis*, de *B. suis*, de dos cepas de *B. abortus* y de una cepa de *B. abortus* atenuada espontáneamente, *B. abortus* 19 o S19. Así por ejemplo, el genoma de *B. melitensis* contiene dos cromosomas o replicones circulares independientes, el cromosoma I de 1,2 Mb con un contenido en pares GC de 57,2% y el cromosoma II con 2,1 Mb y un contenido en pares GC de 57,3%. Los dos cromosomas difieren en que el origen de replicación del cromosoma I es típico de los cromosomas bacterianos donde se encuentra la mayoría de los genes esenciales, mientras que el cromosoma II es de tipo plasmídico. De los 3197 marcos de lectura abiertos, 2487 tienen una función conocida (37).

El género *Brucellae* ha sido clasificado en base a la patogenicidad y al hospedero en seis especies: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. maris* y *B. ovis*. De estas especies sólo las primeras cuatro son capaces de infectar al hombre, así mismo se ha planteado que el género *Brucellae* posee una sola especie y que el resto de las ya mencionadas son biovariedades. Las especies mencionadas tienen reservorios específicos, así como patogenicidad y virulencia diferente. Hay que señalar que no se ha demostrado la infección entre seres humanos y que no se conoce por completo todos los reservorios. (19)

La especificidad de estas especies no es absoluta, puesto que la *B. abortus* puede infectar a los porcinos y caprinos cuando las mencionadas especies animales se crían juntos. Lo mismo ocurre con *B. melitensis*, y *B. suis*, estas infecciones cruzadas tienen poca importancia dentro de la epidemiología ya que el huésped principal desaparece. (9)

A continuación se mencionan y describen brevemente las características de las nueve especies: (2)

**B. abortus:** especie de bacteria lisa que afecta principalmente al ganado bovino, aunque también llega a afectar a ovinos, caprinos y equinos; esta especie posee siete biotipos. (2)

**B. melitensis:** especie lisa que afecta a caprinos, ovinos y bovinos; posee tres biotipos. (2)

**B. suis:** su huésped preferente es el cerdo, aunque también afecta a bovinos; tiene cinco biotipos. (2)

**B. ovis:** especie rugosa que solo afecta a ovinos. (2)

**B. canis:** especie rugosa que afecta a cánidos. (2)

**B. neotomae:** especie que ha sido aislada de la rata del desierto. (2)

**B. microti:** especie que ha sido aislada del ratón de montaña. (2)

**B. ceti:** especie identificada en cetáceos. (2)

**B. pinnipedialis:** especie que infecta a pinnípedos. (2)

En la virulencia de *Brucella* es de suma importancia tomar en cuenta su habilidad para sobrevivir y multiplicarse dentro de las células hospederas. Las cepas virulentas de *Brucella* al ser fagocitadas por el macrófago, mecanismo por el cual en teoría deberían ser destruidas al formarse el fagolisosoma, tienen la capacidad de evitar la maduración del fagosoma y crear su nicho intracelular en el retículo endoplásmico, sitio en el que se alojan y se multiplican.(2)

Con respecto a la conformación estructural de la bacteria, ésta posee una membrana externa, la cual es rica en fosfatidilcolina y el componente más abundante es el lipopolisacárido (LPS), del cual se van a distinguir tres regiones: el lípido A, el núcleo y la cadena O, este último tiene mucha importancia, ya que con base al tipo de unión entre los residuos de N-formil perosamina, alfa 1-2 o alfa 1-3, se identifican dos configuraciones denominadas A y M que van a tener un papel importante en la determinación de las biovariedades.(19)

Así mismo las *Brucellas* contienen una serie de proteínas de la membrana externa (PME), las cuales dependiendo de su peso molecular se van a clasificar en tres grupos:

PME del grupo 1 (94 kilodaltons), PME del grupo 2 (34 a 40 kilodaltons) y PME del grupo 3 (30 kilodaltons). La importancia de estas proteínas radica en su alta especificidad, ya que no presentan reacciones cruzadas con otras especies de bacterias, siendo de gran utilidad para el diagnóstico serológico y para la eventual fabricación de vacunas. <sup>(19)</sup>

#### **6.4. Epidemiología.**

La epidemiología de la brucelosis es compleja y ha tenido variaciones con el tiempo. Se estima que anualmente existen en el mundo más de 500,000 casos nuevos en humanos, representando una de las zoonosis más frecuentes. La enfermedad es endémica en países del Mediterráneo como Portugal, España, el sur de Francia, Italia, Grecia, Turquía y África del Norte, así como en Centro y Sudamérica, algunas partes de México, Asia y el medio Oriente. A nivel mundial se calcula una incidencia en zonas endémicas que llega hasta más de 200 casos por cada 100,000 habitantes, países como Mongolia, Kirguizistan, Iraq, Arabia Saudita, Tadjikistan y Kazajstán presentan la incidencia más alta a nivel mundial, sin embargo el país con mayor número de nuevos casos anuales es Siria con una tasa de incidencia de 1,603 casos por millón de habitantes. <sup>(19)</sup>

Las formas de transmisión al ser humano son principalmente la ingestión de productos de origen animal no pasteurizados, contacto directo con un animal infectado o por la inhalación de partículas. La ruta más común de transmisión es a través del consumo de productos no pasteurizados, principalmente leche, quesos, mantequilla y helados. Así mismo los trabajadores de mataderos, veterinarios, ganaderos y trabajadores de laboratorios tienen alto riesgo de adquirir la infección. <sup>(19)</sup>

En explotaciones ganaderas la enfermedad provoca disminución de la producción, lo cual genera pérdidas económicas directas al productor que son el resultado de la disminución del número de becerros producidos y en el número de terneras para reemplazo, así como una reducción en la producción de leche, que puede ser hasta del 30%. También se puede incrementar el periodo de días abiertos, el número de

servicios por concepción y la tasa de desecho de animales como consecuencia de problemas de fertilidad, así como el rezago en los programas de mejoramiento genético.

## **6.5. Diagnóstico.**

El diagnóstico inequívoco de las infecciones de *Brucella* en los bovinos o los animales, se realiza mediante el aislamiento e identificación de la bacteria *Brucella*, pero cuando las circunstancias no te permite hacer el análisis bacteriológico, el diagnóstico puede apoyarse en los métodos serológicos. No existe una prueba laboratorial única que permita la identificación de *Brucella*. Normalmente se necesita una combinación de métodos serológicos, bacteriológicos y/o moleculares.

### **Identificación del agente.**

#### **6.5.1 Tipos de diagnóstico**

Para el diagnóstico de brucelosis la respuesta inmune de tipo celular es la más importante; sin embargo, el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos serológicos. (2)

##### **➤ Prueba de tarjeta o rosa de bengala.**

Consiste en confrontar el suero problema con el antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3 a una concentración de 8% para el diagnóstico en bovinos y de 3% en caprinos. Con esta prueba se detecta la presencia de anticuerpos circulantes de IgG e IgM de origen vacunal o debidos a infecciones naturales. (2)

Esta prueba es de rutina y tiene una sensibilidad cercana al 100%, lo que significa que dará resultados con pocos o ningún animal falso negativo; además es sencilla, económica y práctica, por lo que se puede realizar en todo el hato. Sin embargo, existe el riesgo de dar resultados falsos positivos por reacciones cruzadas con bacterias como *Salmonella*, *E. coli*, yersinias y pseudomonas. (2)

➤ ***Prueba de rivanol.***

La prueba de rivanol es de tipo cuantitativa y cualitativa; consiste en confrontar el suero problema con un colorante de acridina que precipita las inmunoglobulinas de la muestra, principalmente las IgM, quedando en solución solo las IgG, que son las directamente involucradas con la respuesta inmune ante una cepa de campo.

Enseguida se realiza de manera similar a la prueba de aglutinación en placa utilizando un antígeno específico. Se consideran positivos todos aquellos sueros que presenten reacción de aglutinación completa en cualquiera de sus diluciones. (2)

➤ ***Otras pruebas de diagnóstico.***

Existen otras pruebas para el diagnóstico de la brucelosis entre las que destaca la inmunodifusión radial con hapteno nativo, que es capaz de diferenciar los animales infectados de los vacunados y revacunados, independientemente de la cepa utilizada (S19 o RB51). (2)

➤ ***Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).***

Esta técnica de biología molecular es una excelente opción para determinar la especie de brucella (previamente aislada mediante alguna prueba bacteriológica) y diferenciarla entre una cepa vacunal y una de campo. A través de la extracción de ADN de muestras de tejidos (placenta, carúnculas, bazo, epidídimo, etc.), líquido abomasal fetal y secreciones (exudado vaginal, leche, semen) es posible identificar la presencia de ADN específico de la bacteria. (2)

La PCR es confiable y rápida, su fundamento es que permite la amplificación específica de un segmento de ADN logrando una especificidad cercana al 100%. Además, no depende de la viabilidad o cantidad de bacterias en la muestra, por lo que su sensibilidad también es muy alta. La técnica PCR ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico de brucelosis bovina, ovina y caprina. Con los iniciadores adecuados

permite la diferenciación de las cepas vacunales S19, RB51, Rev 1 y las cepas de campo. (2)

## **6.6 En Nicaragua.**

En Nicaragua la producción agropecuaria es de gran importancia, la producción de carne y leche del ganado vacuno se realiza bajo el sistema de doble propósito, donde se obtiene ambos productos, los pequeños productores dan mayor orientación a la producción de leche, carne y sus derivados. Son productos importantes en la dieta alimenticia de la población nicaragüense, a pesar de los problemas que enfrenta el sector, los productos lácteos y cárnicos, de la cual proviene la mayor parte de los ingresos para el sector rural, y de apoyo al sector productivo de leche y carne para la exportación. (6, 38).

La Brucelosis bovina, enfermedades zoonóticas, siguen siendo una carga sanitaria, económica y social de gran importancia en nuestro país. El consumo de productos lácteos crudos es la principal fuente de infección en el hombre. En Nicaragua se pasteuriza entre el 20 – 25 % de la producción nacional de leche. La brucelosis humana actualmente no está en el sistema de vigilancia epidemiológica del Ministerio de Salud (MINSAL) y se han reportado dos casos en los últimos cinco años (38, 39).

En 1999 se realizó el primer estudio de prevalencia de brucelosis bovina en Nicaragua reportándose una prevalencia a nivel nacional del 0.21%. (MAGFOR 1999). En los años 2000 – 2001, el Proyecto de Vigilancia Epidemiológica de la Dirección de Salud Animal (PROVESA) realizó un diseño estadístico para conocer la prevalencia nacional de Brucelosis bovina. El resultado obtenidos fueron de 0.12% de prevalencia. En el año 2005 se declaró libre oficialmente de brucelosis bovina a la Isla de Ometepe del departamento de Rivas, según mandata el acuerdo ministerial No. 005-2005, “Declaratoria de los municipios de Altagracia y Moyogalpa de la Isla de Ometepe como territorios libres de Brucelosis bovina (38).

Del 2004 al 2009 se implementó un área piloto para la certificación de fincas libres de brucelosis y tuberculosis bovina en los municipios del Almendro, El Coral y Nueva Guinea. Durante este período, mediante las técnicas Rosa de Bengala y de Rivanol como prueba diagnóstica confirmatoria, resultaron reactores a la prueba (0.61%).

La Brucelosis Bovina es una enfermedad de notificación obligatoria en todo el territorio nacional, de acuerdo a los Acuerdos ministeriales No. 008-2009 “Medidas sanitarias para el control y erradicación de la brucelosis bovina en Nicaragua” <sup>(38)</sup>.

La situación actual de la seroprevalencia de Brucelosis bovina en Nicaragua, según resultados del estudio de prevalencia de la enfermedad 2010-2011, en animales bovinos de manera individual es de 0,19% y a nivel de finca de 2,20% <sup>(38)</sup>.

Según lo establece el Acuerdo Ministerial No.008 - 2009 “Medidas sanitarias para el control y erradicación de la brucelosis bovina en Nicaragua” todos los animales reactores a brucelosis bovina serán enviados a sacrificio.

## 7. Material y Métodos.

**7.1. Tipo de estudio:** Es de corte transversal para la identificación de *Brucella abortus* en muestra de leche del centro de copio Santo Tomás del municipio de El Viejo y la quesera La Pollera del municipio de La Paz Centro.

**7.2. Periodo de estudio:** Se realizó en el comprendido de Mayo a Diciembre del 2015.

**7.3. Lugar de estudio:** Fincas asociadas al centro de acopio de leche, Santo Tomas ubicado en la comunidad de Santo Tomas municipio de El Viejo y la quesera La Pollera del municipio de La Paz Centro.

**7.4. Población de estudio:** Las 17 fincas que están asociadas al centro de acopio de Santo Tomas del municipio de El Viejo y 23 fincas que hacen entrega de la leche a la quesera La pollera, municipio de La Paz Centro.

El municipio de El Viejo, cuenta con una población de 25,382 hembras y 14,093 machos mayores de 1 año, de las cuales, 10,462 son vacas paridas, se encuentran distribuidas en un total de 1626 fincas dedicadas a la explotación bovina. (IV Censo nacional agropecuario, CENAGRO, 2011).

El municipio de la Paz Centro, cuenta con una población 35045 cabeza de ganado, entre ellos: machos 415 son terneros menores de 1 año, 1,598 novillos de 1 a menos de 2 años, 1,548 novillos de 2 a menos 3 años, y 718 novillos de 3 y más años. Además se identificaron 538 toretes para reproducción, 498 toros sementales, 303 bueyes y 5 otros, distribuido en 766 fincas. (IV Censo nacional agropecuario, CENAGRO, 2011).

**7.5. Tamaño de la muestra:** Un total de 17 muestras de leche cruda se recolectaron en el centro de acopio Santo Tomas del municipio de El Viejo y 23 de la quesera La Pollera municipio de La Paz Centro.

### 7.6. Factores de exclusión:

Fincas que no estén asociadas a los centros de acopios.

### 7.7. Factores de inclusión:

Fincas que se encuentren asociadas a los centros de acopios.

Muestra de leche cruda.

### 7.8. Unidad de análisis: Leche

**7.9. Recolección de la muestra:** Se recolectaron un aproximado de 15 ml de leche cruda asépticamente para la detección de *B. abortus*, de cada uno de los recipientes (pichingas), en un frasco estéril formando un pul o pool, se depositarán en un termo con refrigerantes y posteriormente, se trasladarán al Centro Veterinario de Diagnóstico e Investigación (CEVEDI), de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua León, para su análisis.

### 7.10. Plan de análisis.

La información recolectada en las fichas o encuesta y los resultados de laboratorio se digitó en una base de datos en el software SPSS 21.0 (IBM Corp. 2012) Se utilizó el análisis estadístico de chi cuadrado para ver relación entre las variables considerando un valor de “ $p < 0.05$ ” como significativos.

### 7.11. Operacionalización de las variables.

variable	Definición	Indicador
<b>Leche no pasteurizada</b>	Es una secreción nutritiva de color blanquecino opaco producida por las glándulas mamarias de las hembras de	Presencia o ausencia de <i>B. abortus</i>

	los mamíferos.	
<b><i>Brucella abortus</i></b>	Es un género de bacterias Gram negativas conocido principalmente por ser productor de la enfermedad brucelosis	PCR positivos o negativos
<b>Procedencia de las muestras.</b>	Localización geográfica única y bien definida en un sistema de coordenadas y datum específicos de las fincas a brucella.	Georeferenciación Coordenadas de fincas positivas

### 7.12. Recolección de la información.

Se realizó mediante una encuesta a los productores.

### 7.13. Procedimiento de análisis de las muestras:

#### Extracción del ADN

Se realizó a partir de muestras de leche, mediante la utilización del Kit GaneJET Plant Genomic DNA Purification Minit Kit y el procedimiento se llevará a cabo de acuerdo al manual de procedimientos del kit.

#### Amplificación del ADN para género

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* F, 3"GCCGCTTTTCTATCACGGTATTC"5 y R 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 amplicón de 523 bp; posteriormente se revelará en gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio.

**7.14 Resultados esperados:** Los investigadores utilizarán sin errores la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa punto final o convencional (RT-PCR), para la identificación de *B. abortus* en muestra de leche no pasteurizada.

Demostrar el posible riesgo de adquirir brucelosis por ingesta de leche no pasteurizada y productos elaborados de la misma.

Dar a conocer los resultados a las instituciones involucradas en el estudio, publicar los resultados en revistas de prestigio e indexadas.

**7.15. Beneficiarios:** Los productores que están asociados al Centro de acopio de leche, Santo tomas del municipio de El Viejo, departamento de Chinandega y la quesera La pollera del municipio de La Paz Centro, departamento de León. Instituto de Protección de Sanidad Agropecuaria (IPSA), Ministerio de Salud (MINSa) y Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN - León).

## **Resultados.**

Por lo tanto se realizó la determinación de la presencia de *B. abortus*, en 17 finca asociadas al centro de acopio de leche de Santo Tomas del municipio de El Viejo y 23 finca que entregan leche a la quesera La Pollera del municipio de La Paz Centro, obteniendo 40 fincas que se valoraron.

De las 17 fincas del centro de acopio de leche de Santo Tomas, 1 presentaba casos de abortos y de las 23 de la quesera La Pollera también presenta 1 finca con presencias de abortos.

Este estudio investigo la presencia de ADN de *B. abortus* en la leche bovina de las fincas asociadas al centro de acopio Santo Tomas, El Viejo y los que entregan leche a la quesera La Pollera, La Paz Centro. A partir de la muestra de leche por el ensayo de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) convencional basado con el cebador *B. abortus* las muestras de leche resultaron negativas.

## Discusión

En el estudio no se encontró en las muestras de leche amplificación del gen de *B. abortus*. En Egipto 2014, Gamal, en 17 muestras resultaron positivas a Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR), 16 detectaron *B. melitensis* específica y 1 *B. abortus* en muestra de leche de vaca. En donde 9 de vaca aparentemente sana, 7 búfalos *B. melitensis* específica y un puestos de venta de leche, *B. abortus*.

Colombia 2008, Mosquera evaluaron 33 muestras de leche que había dado a PAL negativas, el 30.3% de estas dieron positivo a PCR y 47% de las muestras a las positivas PAL, 17 muestras de sangre de animales positivos por PAL, el 94.1% resultan positivos a PCR

En el 2005 Renteria, México, de 51 muestras de sangre y leche recolectas de hatos lechero con prevalencia históricamente de presencia de *brucella*, obteniendo 11 muestras positivas a todas las pruebas (Serología, bacteriología y PCR), 1 serología y bacteriología, 9 serología, 6 serología y PCR, 17 muestras a PCR para la identificación de *Brucella spp.*

El IPSA, Nicaragua, 2011, la situación actual la seroprevalencia de brucelosis bovina, en Nicaragua, con los resultados obtenidos de la prevalencia de la enfermedad en animales bovino de manera individual es 0.19% y a nivel de finca de 2.20%. Dado a la baja prevalencia de brucelosis bovina puede deberse que en las muestra de leche no pasterizada no se encontró presencia de amplificación del gen *B. abortus*.

## Conclusiones

Las muestras de leches procedentes de las fincas asociadas al centro de acopio de Santo Tomas, de El Viejo y la que entregan leche a la quesera La Pollera, La Paz Centro, no presento presencia de amplificación de *B. abortus*.

Se evaluaron muestras de leche no pasteurizada por el ensayo PCR convencional en la detección de *B. abortus* que se utilizan para la elaboración de queso artesanal en una quesera del municipio de La paz Centro, departamento de León y un centro de acopio de leche del municipio El Viejo, departamento de Chinandega, que distribuye leche a lugares que elaboran queso, cuajada y crema, entrega a la parmalt.

Con los resultados obtenidos en el sayo del PCR convencional, las dos fincas que presentan casos de abortos estos pueden ser debidos a otros factores o patologías que asociadas en la presencia de abortos. No es preciso se ocasionado por *B. abortus*.

## Recomendaciones.

Ampliar en el estudio tomando otros derivados de la leche, como, queso, crema, suero, tejidos, linfonodos y fetos abortados, fincas que hayan tenido problemas.

Determinar en las muestras la presencia de otras especies de *Brucella spp*, como *B. melitensis*, *B. canis*, y *B. suis*, que estén implicadas en causar una zoonosis.

Hacer cumplir que la brucelosis es una enfermedad de notificación obligatoria en todo el territorio nacional, de acuerdo a los acuerdos ministeriales NO. 008-2009 “Medidas sanitarias para el control y erradicación de la brucelosis bovina en Nicaragua” todos los animales reactivos a brucelosis bovina será enviados a sacrificio.

## 8. Referencia Bibliografía

1. Martínez LC, Verdugo A, Hernández R. Identificación de la cepa vacunal *Brucella abortus* S19 en muestras de leche de vaca. *Vet. Méx.*, 37 (4) 2006.
2. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas Pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinario en Microbiología Animal Cuajimalpa, D.F. Manual de capacitación Prevención de Brucelosis en rumiantes. 1 ed. Folleto Técnico No. 2. Impreso y hecho en México ISBN 978-607-425-7. Mayo 2011.
3. Mosquera X, Bena C, Muskus C, Berdugo J. Detección de *Brucella abortus* por PCR en muestra de sangre y leche de vacunos. *Rev.MVZ Córdoba* 13(3):1504-1513, 2008
4. Nicaragua, Instituto Nicaragüense De Tecnología Agropecuaria. Instituto Nacional Tecnológico. Manejo Sanitario Eficiente del Ganado Bovino: Principales Enfermedades. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma, Italia. Septiembre 2010
5. Renteria T, Santos H, Licea A, Medina G, Nielsen K, Montañó M, et al., Evaluación de la prueba de recolección en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovino., *Téc Pecu Méx* 2005, 43(1):117-126.
6. Rivera AA, Pastrán TE, Rivera F, Rizo JR. Incidencia del manejo zootécnico, tecnologías usadas en el Ganado de ordeño, en la cantidad y calidad de leche que producen los ganaderos en el municipio de muy muy- departamento de Matagalpa, Nicaragua. *Ra Ximhai* Vol. 5. Número 2, mayo – agosto 2009, pp. 247 -258.
7. Instituto Nacional de Información de Desarrollo .Ministerio Agropecuario y Forestal. IV Censo Nacional Agropecuario CENAGRO. Departamento de Chinandega y sus municipios uso de la tierra y el agua en el sector agropecuario. CENAGRO 2011.

8. Wareth G, Melzer F, Elschner MC, Neubauer H, Roesler U. Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(10):1339-1343. doi:10.3855/jidc.4847.
9. Samartino L. Conceptos generales sobre brucelosis Bovino, Jornada de actualización sobre brucelosis Bovino. Roncha, INTA, Castelar, Argentina. 2003.
10. Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, Javani S, Soheila Morad Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran.
11. Mugizi D, Muradrasoli S, Boqvist S, Erume J, Nasinyama G, Waiswa C, et al. Isolation and Molecular Characterization of *Brucella* Isolates in Cattle Milk in Uganda. Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Volume 2015, Article ID 720413, 9 pages.
12. Qasem JA, AlMomin S, Al-Mouqati SA, Kumar V. Characterization and evaluation of an arbitrary primed Polymerase Chain Reaction (PCR) product for the specific detection of *Brucella* species. *Saudi Journal of Biological Sciences* (2015) 22, 220–226.
13. Matrone M; Keid LB; Rocha VC; Vejarano MP; Ikuta CY; Rodriguez CA; et al. Ferreira Neto, J.S.Evaluation Of Dna Extraction Protocols For *Brucella Abortus* Pcr Detection In Aborted Fetuses Or Calves Born From Cows Experimentally Infected With Strain 2308. *Brazilian Journal of Microbiology* (2009) 40: 480-489.
14. Peniche CA, Martínez H1, Barradas PF, Franco ZJL, Molina SB, Gutiérrez RE, et al. Evaluación En Campo De La Eficacia Vacunal De Las Cepas Rb51 Y S19 De *Brucella Abortus* En Hatos Naturalmente Infeccionados Con Brucelosis En Clima Tropical. VI Congreso Internacional de Epidemiología. *Epidemiología: “Eslabón esencial entre la Salud Pública y la Salud Animal. Ixtapan de la Sal, Estado de México. Del 14 al 17 de Octubre de 2009,*

15. Vergara D, Torres M, González F, Lasso N, Ortega C. Prevalence Of Brucellosis In Cattle Raw Milk Spread In The City Of Popayan Cauca. September-December 2006. Facultad de Ciencias Agropecuarias Vol. 6 No. 2 Diciembre 2008
16. D'Pool G, Rivera S, Torres T, Pérez M, García G, Castejón O, et al. Prevalencia De Brucelosis Bovina Mediante Elisa Competitivo En El Municipio La Cañada De Urdaneta, Estado Zulia, Venezuela. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XIV, Nº 2, 168-176, 2004
17. Sánchez M, Cardona N. Design and evaluation of a PCR test for detection of *Brucella* spp. and *Brucella abortus*. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (2): 73-82.
18. Aguirre V, González M, Ibañez J, Hernández M, Aparicio E, Nevárez G, et al. Duplex polymerase chain reaction as a rapid, effective diagnostic test for bovine brucellosis using blood samples. Téc Pecu Méx 2008;46(2):147-158.
19. Vega CA, Ariza R, Rodríguez FL, Brucellosis. Una infección vigente. Acta Médica Grupo Ángeles. Volumen 6, No. 4, octubre-diciembre 2008
20. Martínez D, Abeledo M, Rodríguez M, Bautista R, Rivera E, Vallecillo A, et al. Aislamiento De *Brucella Melitensis* Biovar 1 en Leche de Cabras de la Comunidad de Tenextepec, Municipio De Perote, Veracruz, México. Rev. Salud Anim. Vol. 23 No. 2 (2001): 123-127
21. Godfroid J, Nielsen K y Saegerman C. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. REVIEW doi: 10.3325/cmj.2010.51.296.
22. Padrón O., Martínez D., Peniche A. y López L., Historia de la brucelosis. Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad veracruzana. Volumen XXIV. Número 2, mayo. - agosto de 2011.

23. Páez L., López N., Salas K., Saldillero A. y Verde O, Características físico-químicas de la leche cruda en las zonas de Aroa y Yaracal, Venezuela, Científica, vol. 12, núm. 2, abril, 2002, p. 0 Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México.
24. Sbriglio J., Sbriglio H y Sainz S. BRUCELOSIS Una patología generalmente subdiagnosticada en Humanos y que impacta negativamente en la producción pecuaria y desarrollo de nuestros países. Bionalisis Ene – Feb 2007, pag. 18 22.
25. Zamora D., Manual de procesamiento lácteo, INPYME, JICA
26. Gómez A., Antonio D., Mejía B., Oswaldo Composición nutricional de la leche de ganado vacuno, Revista Lasallista de Investigación, vol. 2, núm. 1, enero-junio, 2005, pp. 38-42. Corporación Universitaria Lasallista Antioquia, Colombia.
27. Frau S., Togo J., Pece N., Paz R. y Font G., Estudio comparativo de la producción y composición de leche de cabra de dos razas diferentes en la provincia de Santiago del Estero, Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata (2010) Vol 109 (1): 9-15
28. Acosta N., Calderón A., Cortez M., Correa D., Duran A., Gamboa et al. Identificación de riesgo biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Contrato de 2010, Republica de Colombia instituto Nacional de Salud Subdirección de investigación, Bogotá 2011.
29. Merlin G., Ricciuti N., Torres n., Pistones C., D'elmar R., Mujica G., et al. Seminario de proceso fundamentales físico -químicos y microbiológicos especialización y maestría en medio ambiente laboratorio química, ER. Bahia Blanca- U.T.N. 2009. Editorial de universidad tecnológica nacional. edutecne.
30. Bello J., Lizeldi B., Gonzales E., Manzo A., Nochebuena X., Quiñones E., et al. Productos lácteos: Ruta de la metamorfosis. Revista digital universitaria 10 de agosto 2004. Vol. 5 numero 7. ISSN: 1067 – 6079.

31. Garcia M., Maza M., Perez M., Legorreta P., Moncada A., Pelayo B., et al. Libro blanco de la leche y los productos lácteos. 1ª. Ed. Mexico. D. F. Litho offset. Marzo del 2011
32. Hazord S., Christen M., Composicion y calidad de la leche, Ganadería y praderas tierra adentro febrero 2006. INIA TE MEL AIKE.
33. Zirmmermann K., Ruiz H., Estructura y funcionalidad inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. Tema selectos de ingeniería de alientos 4-2 (2010): 24-37.
34. Pedraza C., Mansilla A., Fajardo P., Agüero H., Cambios de la producción y composición láctea por efecto del incremento de las células somáticas en leche de vacas. Agric. Tec. Vol. 60 n. 3 60 n. Santiago jul, 2000.
35. Rafiq S., Huma N., Pasha I., Sameen A., Mukhtor O., Khan M., Chemical compositon, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. Asian Austrulas J. Anim. Sci. Vol. 00, No. 00:0000 Month 000 October 2015.
36. Castro H., Gonzales S., Pract M., Brucelosis una revision practica, Acta Biquim clin Lat maam 2005; 39 (2): 203 – 16.
37. Castaño M. and Solera, Chronic brucellosis and persistence of Brucella melitensis DNA. J clin Microbiol. 42: 2034 – 2089, 2009.
38. IPSA, PROTOCOLO, Estudio para determinar la Prevalencia de Brucelosis bovina en los municipios del El Rama, La Cruz del Río Grande, El Coral, Boaco y El Viejo y su interrelación con la brucelosis en humano, así como la prevalencia de la Tuberculosis bovina en los municipios de Dolores y San Marco.. 2011
39. Cajina A., Producción y Comercialización de Productos Lácteos, 2010

## 9. Anexo

### 9.1. Cronograma

Actividades	Meses 2015												Meses 2016					
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio
Elaboración del protocolo		■	■															
Entrega de protocolo				■														
Defensa del protocolo					■													
Defensa del Anteproyecto					■													
Recolección de la información						■	■											
Toma de la muestra								■	■									
Análisis de las muestras										■								
Análisis de los resultados										■								
Escritura del documento final											■	■	■	■				
Entrega del documento final													■					
Revisión del documento (jurado)															■			
Defensa de la tesis																■		
Revisión final del documento																	■	
Envío del artículo a la revista																		■

## 9.. 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: \_\_\_\_\_

Terneritas 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 \_\_\_
- i. Ha aplicado la prueba de Rosa de Bengala. Sí \_\_\_ No \_\_\_
- j. Con que frecuencia. 3 Meses \_\_\_ 6 Meses \_\_\_ Anual \_\_\_

## **2.5. 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 \_\_\_\_\_