

# Detección de *Brucella abortus* en leche fresca y queso Crema de vaca en cuatro regiones económicas del estado de Chiapas

## *Detection of Brucella abortus in fresh cow milk and Cream cheese in four economic regions of the State of Chiapas*

GONZÁLEZ G.M.F.<sup>1</sup>, GUTIÉRREZ H.J.L.<sup>2</sup>, LEÓN V.H.<sup>1</sup>, ARELLANO R.B.<sup>3</sup>, PALOMARES R. G.<sup>2</sup>, RUIZ H.H.<sup>1</sup> Y DÍAZ- APARICIO E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Chiapas. Correo electrónico: holeve 2001@yahoo.com

<sup>2</sup> Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México

### RESUMEN

Uno de los quesos más emblemáticos en el estado de Chiapas es el queso crema, el cual es elaborado artesanalmente desde sus orígenes hasta hoy en día. Sin embargo, no existe evidencia científica de que representen un riesgo para el consumo humano por la transmisión de alguna enfermedad zoonótica. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *Brucella abortus* en leche fresca y queso crema de tipo artesanal elaborados en las principales regiones queseras del estado de Chiapas. La investigación se llevó a cabo en cuatro regiones económicas: Centro, Frailesca, Costa y Norte. En este estudio se tomaron 215 muestras de leche de diferentes unidades de producción y 31 muestras de quesos en las plantas procesadoras de lácteos. Las muestras fueron analizadas en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal – INIFAP- Ciudad de México. Se realizó un muestreo estratificado al azar con un 95% de confianza. Se realizaron aislamientos bacteriológicos y se utilizó Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). Fue detectado un caso positivo de las muestras analizadas de leche (0.5%) en la región costa del estado tanto en aislamiento como en la prueba de PCR. en el caso de las muestras de queso no reportó la presencia de *Brucella spp.* Por lo tanto, es necesario cumplir con los lineamientos de Buenas Prácticas de Manufactura en las plantas procesadoras de lácteos para evitar el riesgo al consumidor.

**Palabras Claves:** Brucelosis, zoonosis y queserías

### AVANCES DE LA INVESTIGACIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de distribución mundial que afecta al humano y a diferentes especies animales domésticas y silvestres. En México es considerada endémica en la mayoría de los estados en donde la cría y explotación de bovinos está presente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que, el consumo de leche y productos lácteos no pasteurizados, son factores de riesgo para contraer brucelosis.

En México la brucelosis humana es un padecimiento sujeto a vigilancia epidemiológica, de notificación semanal obligatoria de acuerdo a lo establecido en los artículos 3o. fracción XV, 133 fracción I y II, 134 fracción V, 135, 136 fracción

### ABSTRACT

One of the most emblematic cheeses in the state of Chiapas is cream cheese, which is made by hand from its origins until today. However, there is no scientific evidence that it represents a risk for human consumption due to zoonotic disease transmission. Therefore, the objective of this research was to determine the presence of *Brucella abortus* in fresh milk and artisanal cream cheese made in the main cheesemaking regions of the state of Chiapas. The research was conducted in four economic regions: Central, Frailesca, North and Coast. In this study, 215 milk samples were taken from different production units and 31 samples of cheese, from dairy processing plants. These samples were analyzed at the National Center of Disciplinary Research in Animal Microbiology - INIFAP Mexico City. Stratified random sampling with 95 percent confidence, bacterial isolation and polymerase chain reaction (PCR) were performed. With regards to the results, only one positive case was detected in milk (0.5 percent) in the coastal region of the state, both through bacteriological isolation of *B. abortus* and through specific detection by PCR. No presence of *Brucella spp* was reported for processed cream cheese. Therefore, it is necessary to comply with the guidelines of Good Manufacturing Practices in dairy processing plants to prevent risks to the consumer.

**Key words:** Brucellosis, zoonoses, cheeseshops

II, 137 y 138 de la Ley General de Salud; art. 32 bis 2 del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud y lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-1994, para la vigilancia epidemiológica. Los reportes de vigilancia epidemiológica de la Secretaría de Salud, hasta la semana 36 del año 2015, mencionan que se han diagnosticado 1,828 casos en el país. En Chiapas se han reportado durante 2015, 105 casos de esta enfermedad, convirtiéndolo en una de las entidades federativas con mayor incidencia a nivel nacional.

En Chiapas se tiene una producción de un millón de litros de leche de ganado bovino al día en las principales cuencas lecheras: Norte, Centro-Frailesca, Selva y Costa. Alrededor del 70% de esta producción se canaliza a la elabo-

ración de quesos artesanales (Mendoza y Farrera, 2009). El 30% restante de la producción láctea es recolectada por empresas comercializadoras locales como PRADEL establecida en la región Centro del estado, o nacionales como LICONSA, quien se encuentra establecida en la región Norte y la empresa NESTLE en la región Centro del Estado.

El queso crema de Chiapas desde hace varios siglos forma parte importante de la dieta básica de los habitantes de este estado y constituye una actividad económica que da sustento a miles de familias (Culebro et al., 2011). Sin embargo, este queso se elabora de manera artesanal (sin pasteurización) y en la gran mayoría de los casos no cumplen con las normas de inocuidad para un producto terminado, lo que pone en alto riesgo al consumidor con la transmisión de enfermedades zoonóticas como la salmonelosis o brucelosis. Ante esta situación, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de *Brucella abortus* (*B. abortus*) en leche y queso crema de tipo artesanal elaborados en las principales regiones queseras del estado de Chiapas.

El estado de Chiapas se localiza al sureste de México, colinda al norte con el estado de Tabasco, al oeste con Veracruz y Oaxaca, al sur con el Océano Pacífico y al este con la República de Guatemala. Sus coordenadas son 17°59' norte, 14°32' sur, 90°22' este y 94°14' oeste (INEGI, 2013).

La investigación se llevó a cabo en cuatro regiones económicas del estado de Chiapas que comprenden los municipios de Venustiano Carranza y Ocozocoautla (Centro), Villaflores, Villacorzo y La Concordia (Frailesca), Tonalá, Pijijiapan y Mapastepec (Costa), Reforma, Juárez y Rayón (Norte). Este trabajo contó la colaboración de la Asociación de Procesadores de Queso Chiapas S.P.R. de R.L., la cual cuenta con un padrón de 50 empresas y un total de dos mil productores primarios de leche (Figura 1).

Las muestras de leche (45 ml) fueron colectadas directamente en las unidades de producción en tubos asépticamente e identificadas. Asimismo, las muestras de queso crema (25 g) se colectaron en el proceso de amasado/salado en bolsas de cierre hermético (marca Ziploc) e iden-

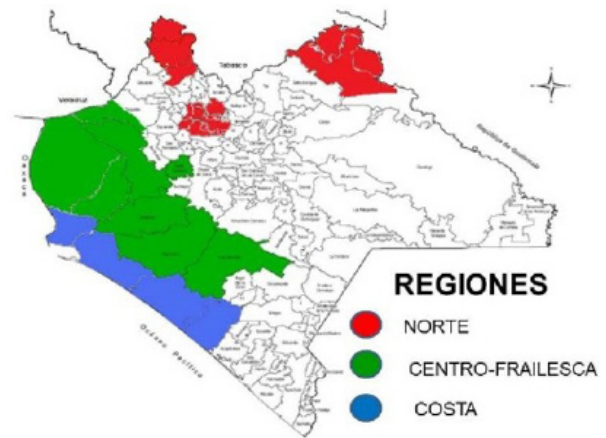


Figura 1. Principales cuencas lecheras del estado de Chiapas.

tificadas con el nombre de la quesería. Ambas muestras se conservaron en congelación -20°C en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chiapas y fueron transportadas a 4 °C al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal – INIFAP- Ciudad de México. Con referencia al estudio bacteriológico y de PCR se realizó según lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994. Se tomaron 5 g de la muestra y se colocaron en un tubo de plástico estéril adicionando 45 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2, la muestra se mantuvo en agitación durante 1 o 2 minutos hasta que se obtuvo una suspensión completa y homogénea, luego que las partículas grandes se sedimentaron, se tomó una alícuota del sobrenadante. Para realizar el aislamiento bacteriológico, se tomaron 100 µL y se colocaron en medio sólido Farrell, posteriormente se incubó a 37°C con 10% de CO<sub>2</sub> durante un periodo máximo de 10 días. El material aislado se procesó mediante Tinción de Gram y pruebas bioquímicas convencionales. Las colonias bacterianas determinadas como pertenecientes al género *Brucella*, fueron sometidas a la prueba de PCR para su diferenciación entre cepas vacunales y de campo.

Mediante el uso de un kit comercial (QIA-amp DNA minikit, QIAGEN), se realizó la extracción de DNA a partir de las colonias obtenidas en el cultivo bacteriológico de las alícuotas de las muestras de leche y queso fresco. El DNA obtenido se conservó en congelación hasta la realización de la prueba PCR. Para la amplificación del genoma de *Brucella abortus*

Se utilizaron los iniciadores S19-1 (5' TTG GCG GCA AGT CCG TCG GT 3'), S19-2 (CCC AGA AGC GAG ACG AAA CG 3') RB51-1 (5' TTA AGC GCT GAT GCC ATT TCC TTC AC 3') y RB51-2 (5' GCC AAC CAA CCC AAA TGC TCA CAA 3'). Se utilizó un volumen final de reacción de 50µL, el cual se constituyó por 2µL de ADN templado, 25µL de una mezcla comercial (1mM de Mg, 200µM de cada dNTP, 2UI Taq polimerasa), 1µL de cada iniciador (1 µM) y 19µL de agua libre de DNAsa. Las condiciones en el termociclador fueron: de un ciclo de desnaturalización a 94°C por cinco minutos, 30 ciclos a 94°C por un minuto de desnaturalización, 59 °C por 30 segundos de alineación, 72 °C por 1.5 min de extensión, y finalmente un ciclo más de extensión por cinco minutos a 72°C. Los productos de amplificación obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado en una solución amortiguadora de Tris base 40mM, ácido acético 20mM y EDTA 1mM (TAE 1X), teñidos con bromuro de etidio (0.5µg/ml) en una cámara horizontal.

### Determinación del tamaño de la muestra

Con base en la población de los productores primarios (n= 1,970) que son proveedores a la S.P.R de R.L de Procesadores de Queso Crema (n= 49), la toma de muestra se realizó en forma aleatoria en 215 unidades de producción pecuaria para obtener la leche fresca. El muestreo se definió dentro de las rutas de la recolección de la leche y fue apoyado por el procesador de productos lácteos. En el caso del queso crema, se recolectó en forma aleatoria en 31 queserías y estos fueron transportados al laboratorio para su procesamiento. Se realizó un muestreo estratificado al azar con 95% de confianza (Snedecor y Cochran, 1980). (Cuadro 1)

Con base en la distribución de las empresas procesadoras de queso crema de Chiapas y al número de proveedores primarios de leche, la región Costa y Frailesca cuentan con el mayor número de queserías y de productores primarios. Por lo tanto, estas regiones tuvieron el mayor porcentaje para el muestreo de quesos que corresponden a 26 y 48%, y en las muestras de leche fue de 37.2 y 34% respectivamente y los

**Cuadro 1.** Distribución del muestreo de leche y queso crema de Chiapas.

Región	Municipios	T.E.P. <sup>1</sup>	E.P.M. <sup>2</sup>	T.U.P. <sup>3</sup>	U.P.M. <sup>4</sup>
Costa	Tonalá, Pijijiapan, Mapastepec	12	8	620	80
Frailesca	Villaflores, Villa Corzo, La Concordia	20	15	750	73
Norte	Rayón, Juárez, Reforma	9	4	350	29
Centro	Ocozacoautla, Venustiano Carranza	8	4	250	33
	TOTAL	49	31	1970	215

<sup>1</sup>Total de empresas procesadoras. <sup>2</sup>Empresas procesadoras muestreadas.

<sup>3</sup>Total de unidades productivas. <sup>4</sup>Unidades procesadoras muestreadas.

porcentajes restantes son para la región Norte y Centro del estado (Figura 2).

Se detectó un caso positivo en leche (0.5 %) en el municipio de Pijijiapan perteneciente a la región Costa del estado, tanto para el aislamiento bacteriológico de *B. abortus* como en la detección específica por PCR. Sin embargo, no se aisló *Brucella spp.* en las muestras procesadas del queso crema de Chiapas.

En México las Campañas Oficiales se basan en la detección de anticuerpos de *Brucella spp.* empleando las pruebas serológicas de Tarjeta, Rivanol y Fijación de complemento, y la bacteriología es considerada como prueba confirmatoria (NOM-041-ZOO-1995). Sin embargo, hay evidencias por otros investigadores (Valencia et al., 2013) que, no obstante los resultados negativos en los aislamientos, los resultados se deben de tomar con cautela, ya que las muestras pueden no tener la concentración bacteriana necesaria para lograr el aislamiento bacteriológico.

La aplicación del plan estratégico de esta campaña en el estado de Chiapas, ha logrado avances de acuerdo a las disposiciones zoonitarias que marca la normatividad vigente. Al respecto, en el año 2013, a Chiapas se le otorgó el reconocimiento en Fase de Erradicación a las regiones Costa, Centro y Frailesca, quedando en Fase de Control la región Norte (SENASICA, 2016). Los avances de Campaña; en parte, explican los resultados de la baja probabilidad encontrados en el presente estudio en la detección de *Brucella spp* tanto en leche como en queso crema

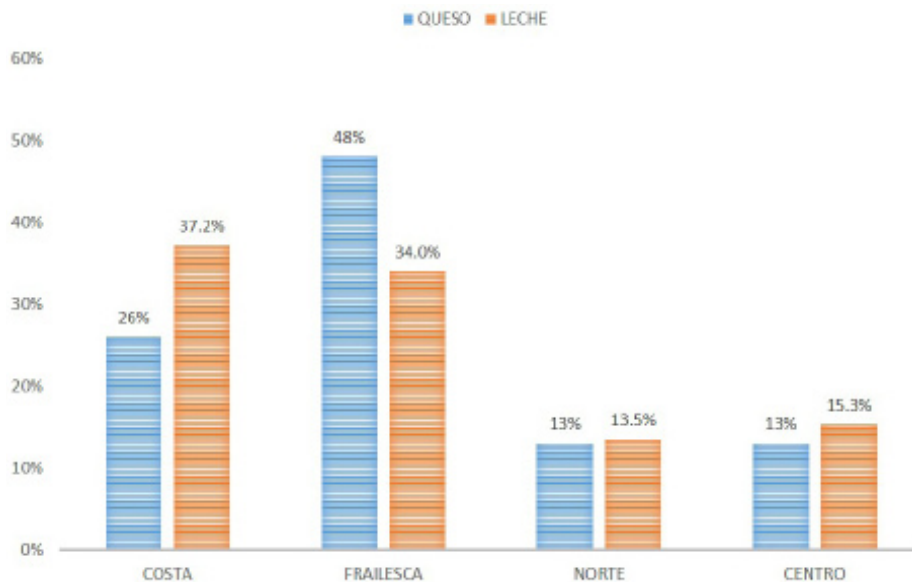


Figura 2. Distribución porcentual del muestreo en plantas procesadoras y unidades productivas.

de Chiapas. No obstante los resultados encontrados, es necesario, es necesario cumplir con los lineamientos de Buenas Prácticas de Manufactura, Buenas Prácticas Pecuarias, Análisis de Riesgos en las plantas procesadoras de lácteos para evitar el riesgo sanitario al consumidor.

## REFERENCIAS

- Culebro P.M. Ortiz, J. Herrera M.R., Jiménez R.L.A. Esponda H.W. y León V.H (2011). Historia y tradición del queso crema Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Ley General de Salud artículo. 3o. fracción XV, 133 fracción I y II, 134 fracción V, 135, 136 fracción II, 137 y 138.
- Mendoza P.R. y Farrera Z.I. (2009). Política sanitaria en materia de lácteos en Chiapas. En: Red Sanitaria Revista trimestral del Sistema Federal Sanitario. Volumen 5, No.19.
- Norma Oficial Mexicana NOM-022-SSA-1994, para la prevención y control de la Brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención.
- Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA-1994, para la vigilancia epidemiológica.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural.
- Rivers, R., Andrews, E., González, S.A., Donoso, G., Oñate, A. (2006). Revisión bibliográfica: *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. Arch. Med. Vet. 38 No. 1. 7-18
- Reglamento Interior de la Secretaría de Salud art. 32 bis 2
- Rentería, E.T.B., De Los Santos, O.H., Licea, N.A.F., Medina, B.E.G., Nielsen, Klaus., Montañón, G.M.F., et al. (2005). Evaluación de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. Tec. Pecu. Méx. 43(1):117-126.
- Rodríguez, V.L. (1990). XXX Aniversario de la Sociedad Poblana de Patología Clínica. Revista Mexicana de Patología Clínica. Vol. 37:1-2 Enero-Junio.
- Romero, C.R. (2007). Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Ed. Médica Panamericana, 911-916
- SENASICA. (2016). Situación actual de la Brucelosis en México. www.senasica.gob.mx
- Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. (1980). Statistical Methods. 7th ed. The Iowa State University, Ames, IA.
- Vega, L.C.A., Ariza, A.R., Rodríguez, W.F.L. (2008). Artículo de revisión: Brucelosis una infección vigente. Acta Médica Grupo Ángeles. Vol. 6 No. 4 158-165.
- Villanueva, V.M., Martínez-Herrera, D.I., Peniche, C.A., López M.A., Rosas, S.T., Morales, E.A.I., et al. (2013). Presencia de *Brucella spp.* en quesos frescos elaborados con leche sin pasteurizar en Veracruz, México. VII Congreso Internacional de Epidemiología, San Andrés Cholula, Puebla.
- Villegas, G.A y Cervantes, E.F. (2011). La genuinidad y tipicidad en la revalorización de los quesos artesanales mexicanos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Vol. 19, No. 38 147-164.