

# Identificación molecular de brucelosis y tuberculosis bovina en Oaxaca: Impacto en salud pública

Mario Alfredo Urbina Mata

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Av. Universidad S/N, C. P. 68120, México

Ericel Hernández García

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca, Av. Universidad S/N, C. P. 68120, México

## Resumen

La brucelosis y tuberculosis bovinas son enfermedades zoonóticas producidas por las bacterias de los géneros *Brucella* y *Mycobacterium*, causan abortos y disminución de la producción de leche y carne. En los humanos, causan fiebre y pérdida de peso principalmente. Según el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), hasta julio de 2023, Oaxaca se encuentra en zona de erradicación en las regiones del Istmo y Tuxtepec, y en control en el resto del estado. Se tomaron 291 muestras de sangre bovina de la vena caudal, de bovinos de San Andrés Huaxpaltepec (58) y San Sebastián Ixcapa (61) de la región Costa, Rojas de Cuauhtémoc (46) y Tlacolula de Matamoros (62) de Valles Centrales y San Pedro Sochiapam (64) de La Cañada. El ADN fue extraído mediante un kit y se utilizaron cebadores específicos para la detección de brucelosis y tuberculosis mediante PCR de punto final. En total, se detectaron 34 muestras positivas a brucelosis y 18 a tuberculosis, lo que representa el 11.68% y el 6.18%, respectivamente. Se corroboró la presencia de brucelosis y tuberculosis bovina en Oaxaca, como lo estableció la SENASICA, aunque las prevalencias reportadas anteriormente son menores a las del presente proyecto, la brucelosis y tuberculosis bovina están presentes en Oaxaca. Es importante hacer notar que los ganaderos, veterinarios y personas que consumen productos no pasteurizados están en alto riesgo de contraer estas enfermedades, por lo cual su diagnóstico eficiente es esencial para evitar su contagio.

**Palabras clave:** Brucelosis, tuberculosis, bovinos, PCR, diagnóstico.

## Abstract

Bovine brucellosis and tuberculosis are zoonotic diseases caused by bacteria of the genera *Brucella* and *Mycobacterium*, leading to abortions and reduced milk and meat production in cattle. In humans, they primarily cause fever and weight loss. According to the National Health, Safety, and Agri-Food Quality Service (SENASICA), as of

July 2023, Oaxaca is in the eradication zone in the regions of Istmo and Tuxtepec, and under control in the rest of the state. A total of 291 bovine blood samples were taken from the caudal vein of cattle in San Andrés Huaxpaltepec (58) and San Sebastián Ixcapa (61) in the Costa region, Rojas de Cuauhtémoc (46) and Tlacolula de Matamoros (62) in the Central Valleys, and San Pedro Sochiapam (64) in La Cañada. DNA was extracted using a kit, and specific primers were used for the detection of brucellosis and tuberculosis through endpoint PCR. A total of 34 positive samples for brucellosis and 18 for tuberculosis were detected, representing 11.68% and 6.18%, respectively. The presence of bovine brucellosis and tuberculosis in Oaxaca was confirmed, as established by SENASICA, although the prevalences reported previously are lower than those of the present project. Bovine brucellosis and tuberculosis are present in Oaxaca. It is important to note that farmers, veterinarians, and individuals consuming unpasteurized products are at high risk of contracting these diseases. Therefore, efficient diagnosis is essential to prevent their spread.

## Introducción

La brucelosis y la tuberculosis son enfermedades que tienen un gran impacto en el ganado vacuno, lo que ha dado lugar a embargos económicos y depreciación del valor de la canal en el momento del sacrificio. Además, estas enfermedades son zoonosis de importancia en la salud pública y están directamente relacionadas con las condiciones socioeconómicas de cada país (Matope et al., 2023). Los países desarrollados, como Canadá y Estados Unidos en América del Norte, Europa, Australia y Nueva Zelanda, han logrado erradicar o mantener bajos índices de prevalencia de brucelosis y tuberculosis; sin embargo, los países subdesarrollados presentan problemas para erradicar estas enfermedades (Schwarz et al., 2023).

Los países desarrollados que han logrado erradicar la brucelosis y la tuberculosis bovina han llevado a cabo programas de control donde la prioridad es la detección y eliminación de casos positivos. Por ejemplo, en Estados

Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) establece como métodos de diagnóstico el cultivo, métodos de aglutinación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), siendo esta última la de mayor sensibilidad y especificidad (CDC, 2017).

En México, las pruebas oficiales de diagnóstico de brucelosis bovina, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, son el cultivo y las pruebas serológicas de la Rosa de Bengala y el RivanoI, las cuales son las mismas pruebas que se utilizan en los humanos. Con respecto a la tuberculosis, la NOM-031-ZOO-1995 establece que las pruebas oficiales de diagnóstico son el cultivo y las pruebas serológicas de la Tuberculina y la Cervical Comparativa. De acuerdo con ambas NOM, si un animal es detectado como reactivo, solo ese debe ser probado nuevamente para confirmar el resultado; considerando que ninguna prueba tamiz es perfecta (presentan márgenes de error), podrían estar pasando animales falsos positivos y falsos negativos, siendo estos últimos los que continúan diseminando la enfermedad.

Con respecto a los humanos, según la Organización Panamericana de la Salud (OPS), estos pueden adquirir las enfermedades por contacto directo o al respirar los aerosoles producidos por las heces. Las personas más afectadas son los propios ganaderos y aquellos que trabajan con los animales, como veterinarios y cuidadores; además, los consumidores de leche cruda y productos derivados de la leche no pasteurizados también pueden llegar a enfermarse (OPS, 2023).

## Metodología

### Toma de la muestra

Se tomaron un total de 291 muestras de sangre de bovinos a partir de la vena caudal en tubos Vacutainer rojos sin anticoagulante. Las muestras se dejaron reposar hasta que se separó el suero de la fase celular; el suero fue entonces colectado en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml y transportado en cadena fría al Laboratorio 3 de Biología Molecular Microbiana de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Del total de muestras, 64 se obtuvieron en noviembre de 2021 en San Pedro Sochiapam en la región de La Cañada, 58 fueron tomadas en febrero de 2022 en el municipio de San Andrés Huaxpaltepec, y 61 en marzo de 2022 en San Sebastián Ixcapa en la región de la Costa. Además, 46 muestras se obtuvieron en enero de 2022 de Rojas

de Cuauhtémoc, y 62 en abril de 2022 de Tlacolula de Matamoros en la Región de los Valles Centrales. Los muestreos fueron dirigidos ya que los dueños de los animales solicitaron la realización de las pruebas para la identificación por PCR de punto final de la brucelosis y tuberculosis.

## Extracción del ADN

Para la extracción del ADN de las muestras recolectadas, se utilizó el kit Quick-DNA Microprep (Zymo Research, catálogo D3020), y se siguieron las indicaciones establecidas para muestras de suero que a continuación se describen:

- Las muestras, previamente congeladas, fueron llevadas a temperatura ambiente hasta su completa descongelación. Posteriormente, se combinaron 200 µl de buffer de lisis genómico con 50 µl de suero en un tubo de 1.5 ml, la mezcla fue homogeneizada por inversión y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- La mezcla resultante fue transferida a una columna ubicada en un nuevo tubo colector y se centrifugó a 11500 rpm durante 1 minuto.
- El tubo colector con el sobrenadante fue descartado, y la columna se trasladó a un tubo colector limpio. Se añadieron 200 µl de buffer de prelavado a la columna, la cual fue sometida a centrifugación a 11500 rpm durante 1 minuto.
- Se incorporaron 500 µl de buffer de lavado g-DNA, seguido de una centrifugación a 11500 rpm durante 1 minuto.
- Descartado el tubo colector con el sobrenadante, la columna fue transferida a un nuevo tubo de 1.5 ml.
- Se adicionaron 30 µl de buffer de dilución a la columna, permitiéndose incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 11500 rpm durante 3 minutos, y el volumen obtenido en el tubo de 1.5 ml se almacenó a -20°C para su uso posterior en la PCR.

## Amplificación del ADN de *Brucella spp*

Para amplificar el ADN de *Brucella spp.*, se emplearon los iniciadores específicos previamente establecidos por Pacheco y Mosquera (2015), generando así un producto de amplificación de 200 pares de bases (pb) a partir del gen del antígeno de 31 kDa de *Brucella abortus*.

Las mezclas reactivas para la detección de la brucelosis se prepararon de la siguiente manera: en un tubo de PCR

de 200 µl se añadieron 0.5 µl del iniciador sentido y 0.5 µl del iniciador antisentido, junto con 5 µl del buffer Phusion Flash High Fidelity que contiene la enzima polimerasa y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), 1 µl de agua destilada estéril y 2 µl de la muestra. Para el control positivo, se incorporaron 2 µl de ADN de control, mientras que para el control negativo se sustituyeron 2 µl de la muestra por agua destilada estéril.

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: activación a 94°C durante 1 minuto; 35 ciclos con temperaturas de desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineamiento a 58°C durante 30 s y amplificación a 72°C durante 20 s; seguido de una extensión final a 72°C durante 5 minutos. Esta reacción se llevó a cabo utilizando el termociclador de punto final SC300 de Kyratec.

### Amplificación del ADN del complejo de la tuberculosis

Con respecto a la amplificación del ADN del complejo de la tuberculosis, los cebadores utilizados amplifican un fragmento de 445 pb que codifica al gen IS6110, de acuerdo con lo establecido por Sweetline y su grupo de trabajo (Sweetline et al., 2017). Los mismos volúmenes que se utilizaron para la reacción de detección de brucelosis fueron utilizados para la reacción de tuberculosis. Para la reacción, se utilizaron las siguientes condiciones: activación a 94°C durante 1 minuto; 35 ciclos con temperaturas de desnaturalización a 94°C por 30 s,

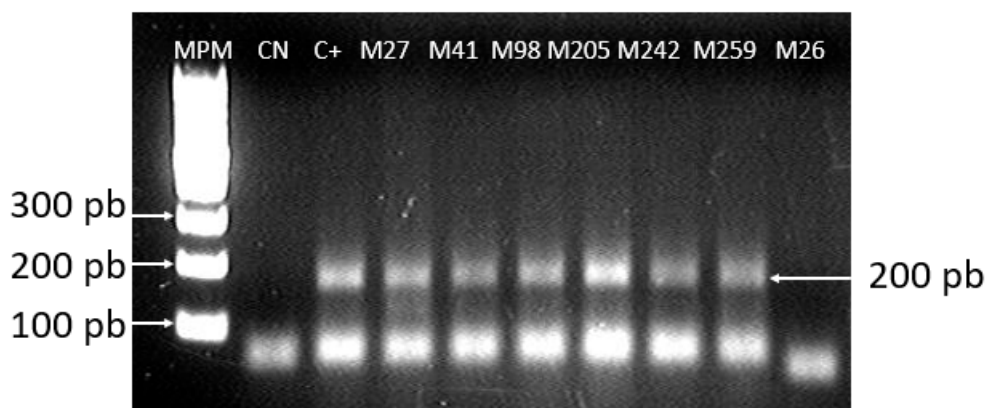
alineamiento a 54°C durante 30 s, y amplificación a 72°C durante 30 s; se aplicó una extensión final a 72°C durante 5 minutos.

### Identificación de las muestras positivas

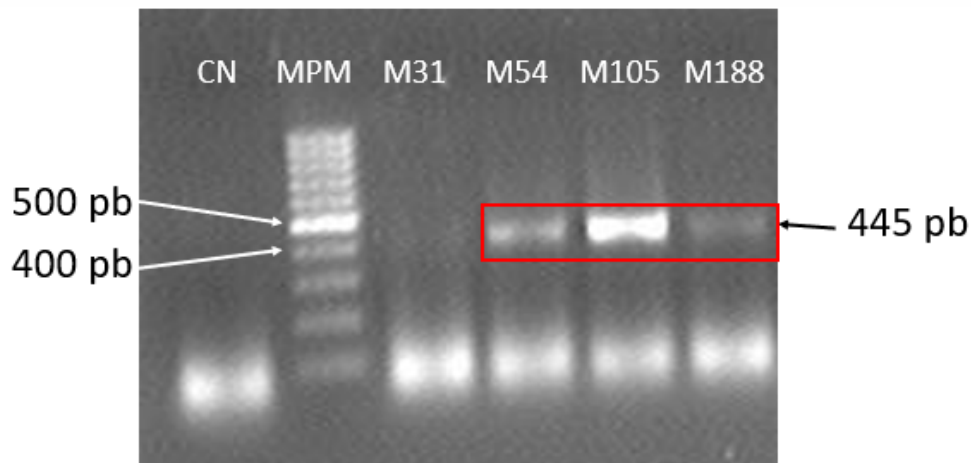
Para poder identificar las muestras positivas a brucelosis y tuberculosis, se elaboraron geles de agarosa al 1.5% con buffer TAE (Trizma base, ácido acético, EDTA). Para ello, se pesaron 1.5 g de agarosa y se mezclaron con 100 ml de buffer TAE 1X en un vaso de precipitados de 500 ml. Para disolver la agarosa, se calentó por 1 minuto en un horno de microondas y, una vez disuelto completamente, se agregaron 3 µl de bromuro de etidio al 0.5%. Los resultados de la amplificación fueron revelados en un espectro UV, y las muestras positivas fueron identificadas mediante la observación del tamaño del amplicón esperado para brucelosis (200 pb) y tuberculosis (445 pb).

### Resultados

Para identificar la procedencia de las muestras, estas fueron numeradas de la siguiente manera: muestra 1 (M1) a M64 provenientes de San Pedro Sochiapam, M65 a M122 de San Andrés Huaxpaltepec, M123 a M183 de San Sebastián Ixcapa, M184 a M229 de Rojas de Cuauhtémoc y M230 a M291 de Tlacolula de Matamoros. Ejemplos de muestras positivas a brucelosis y tuberculosis se presentan en las figuras 1 y 2, respectivamente; no se encontró ninguna coinfección.



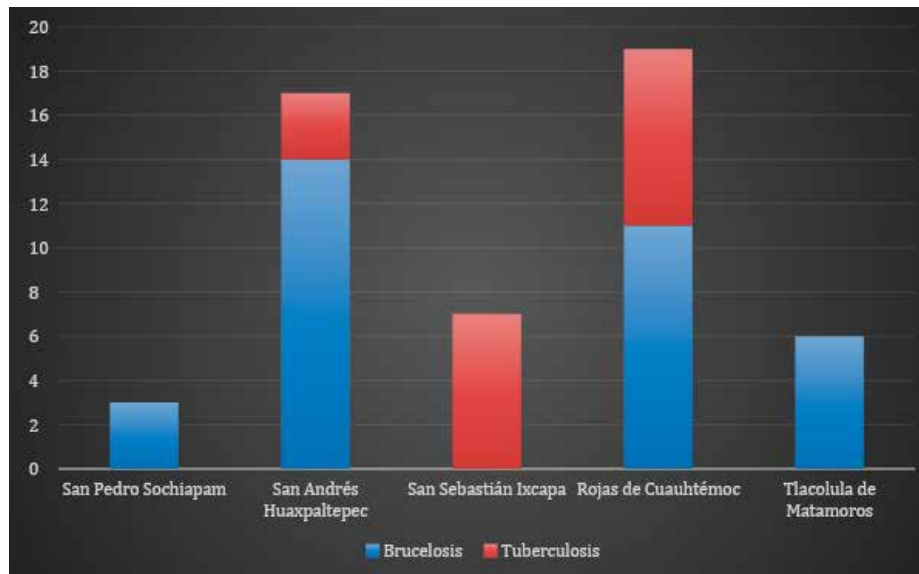
**Figura 1.** Productos de amplificación de *Brucella* spp. Se presentan siete muestras como ejemplo del producto de amplificación del gen del antígeno de 31 kDa de *Brucella*. Las muestras marcadas como M27, M41, M98, M205, M242 y M259 son positivas, mientras que la M26 es negativa.



**Figura 2. Productos de amplificación del complejo de la tuberculosis.** En la imagen se muestran cuatro muestras como ejemplo de la amplificación del gen IS6110 para la identificación de la tuberculosis, tres de las muestras marcadas como M54, M105 y M188 resultaron positivas mientras que M31 fue negativa.

Con respecto a la distribución de las muestras positivas por municipio, se encontró que la mayor frecuencia de brucelosis fue en San Andrés Huaxpaltepec con 14 positivos, seguido de Rojas de Cuauhtémoc con 11, Tlacolula de Matamoros con 6 y San Pedro Sochiapam con 3, mientras que San Sebastián Ixcapa no tuvo animales positivos (Figura 3). Para la tuberculosis, Rojas de Cuauhtémoc presentó 8 casos, San Sebastián Ixcapa 7 y San Andrés Huaxpaltepec 3. San Pedro Sochiapam y Tlacolula no tuvieron casos positivos (Figura 3). En suma, Rojas de Cuauhtémoc presentó la mayor

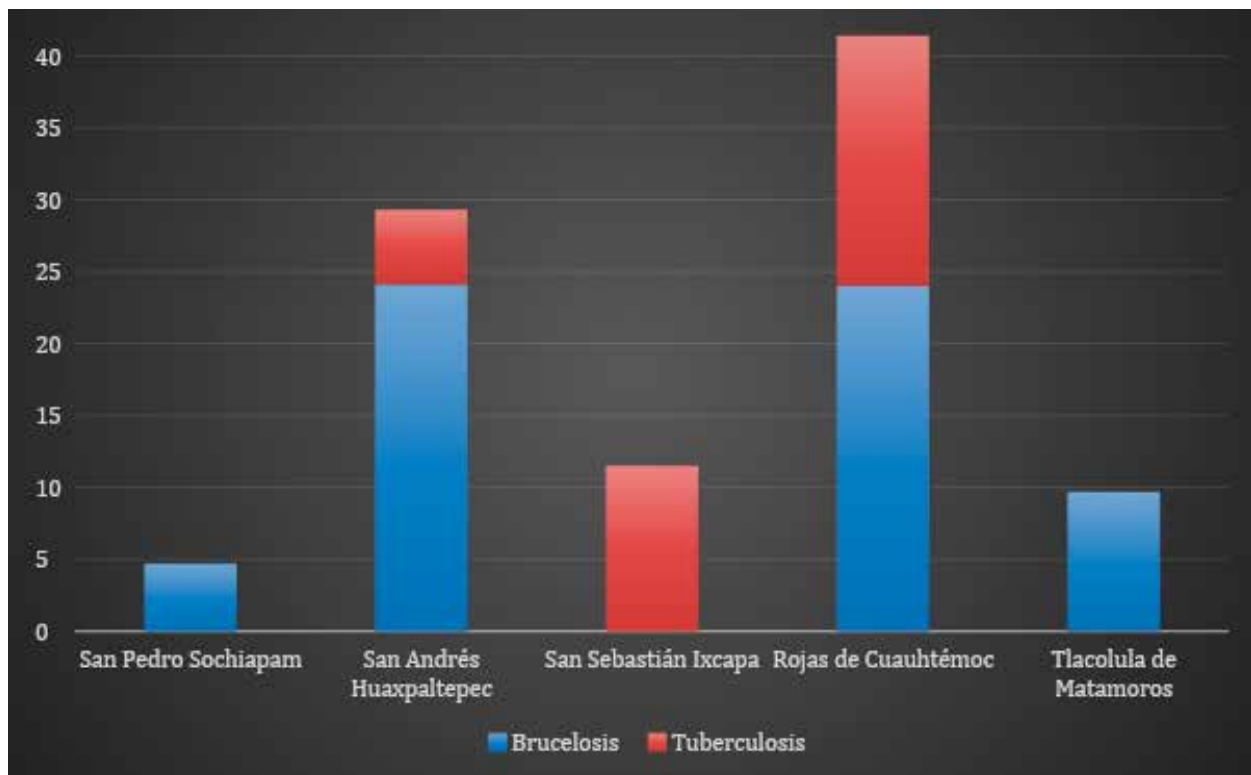
cantidad de animales enfermos con 19, seguido de San Andrés Huaxpaltepec con 17, San Sebastián Ixcapa tuvo 7, Tlacolula de Matamoros 6 y finalmente, San Pedro Sochiapam con solo 3 animales enfermos (Figura 3). Otro punto importante es que en los dos municipios con mayor frecuencia de animales enfermos se presentaron ambas enfermedades, mientras que en San Pedro Sochiapam y Tlacolula de Matamoros solo se presentó brucelosis y en San Sebastián Ixcapa solo tuberculosis.



**Figura 3. Frecuencias de brucelosis y tuberculosis.** Rojas de Cuauhtémoc y San Andrés Huaxpaltepec fueron los lugares con mayor frecuencia de animales enfermos y en ambos se presentó tanto brucelosis como tuberculosis, en los otros municipios solo se presentó una enfermedad.

Si bien es cierto que Rojas de Cuauhtémoc presentó la mayor cantidad de animales enfermos considerando ambas enfermedades, con respecto a la brucelosis, San Andrés Huaxpaltepec presentó una mayor frecuencia; sin embargo, los tamaños de muestra fueron diferentes, por lo cual se procedió a obtener las prevalencias de brucelosis y tuberculosis y así tener una mejor comparación. Rojas de Cuauhtémoc presentó la más alta prevalencia de animales enfermos con un 41.4% (24% de brucelosis y

17.4% de tuberculosis), San Andrés Huaxpaltepec tuvo un 29.3% de enfermedad (24.1% brucelosis y 5.2% de tuberculosis), San Sebastián Ixcapa tuvo un 11.5% (solo tuberculosis), Tlacolula de Matamoros presentó un 9.7% (solo brucelosis), y San Pedro Sochiapam tuvo la más baja prevalencia con solo un 4.7% (solo brucelosis). La prevalencia general de brucelosis fue del 11.68% y del 6.18% para brucelosis y tuberculosis, respectivamente.



**Figura 4. Prevalencias de brucelosis y tuberculosis bovina.** Se observa la gran diferencia entre la prevalencia de Rojas de Cuauhtémoc y San Andrés Huaxpaltepec, con respecto a los otros tres municipios.

## Discusión

La brucelosis y la tuberculosis bovina son enfermedades zoonóticas que continúan siendo un problema reemergente en países endémicos, es decir, países donde varias cepas o especies causantes de brucelosis y tuberculosis están presentes, ya que son áreas donde generalmente no se han adoptado sistemas de vigilancia de salud humana y animal adecuados para diagnosticar estas enfermedades, especialmente en zonas rurales.

En México, la NOM-031-ZOO-1995 establece que la prueba tamiz para el diagnóstico de tuberculosis es la prueba de la tuberculina y la prueba confirmativa es la cervical comparativa, mientras que la NOM- 041-ZOO-1995 dice que la prueba tamiz es la Rosa de Bengala y la confirmativa es el rivanol. Dichas pruebas son serológicas

y presentan el problema de que, al no ser tan eficaces, pueden derivar en resultados falsos positivos y falsos negativos, siendo estos últimos los que diseminan la enfermedad al resto de los animales y al humano.

De acuerdo con la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE) del Gobierno de México (Gutiérrez-Hernández et al., 2020), en 2018, 15 estados del país se encontraban en zona de erradicación con prevalencias menores al 0.5% y 17 estados en zona de control con prevalencia promedio de 2.5%. Oaxaca se encontró en zona de control con una prevalencia del 0.68%; sin embargo, en el presente estudio se determinó una prevalencia del 6.18% para la tuberculosis, casi 10 veces más de lo esperado.

Con respecto a la brucelosis, Gutiérrez-Hernández et

al. en 2020 reportaron un estudio donde identificaron una prevalencia del 9.1% de un total de 5382 animales muestreados de las regiones del Istmo, Costa y Valles Centrales. En el presente estudio se obtuvo una prevalencia del 11.68%, aunque el tamaño de muestra fue de solo 291 animales y no se tomaron muestras de bovinos de la región del Istmo y sí de La Cañada. Por otro lado, de acuerdo con el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA) en 2021, Oaxaca se encuentra en zona de control (prevalencias mayores al 0.5% de brucelosis), como lo fue corroborado por los estudios de Gutiérrez- Hernández y el presente proyecto, aunque en dicho reporte se considera una prevalencia de solo 0.7% de brucelosis.

Ahora bien, desde el punto de vista de la salud humana, la brucelosis y tuberculosis derivadas de contagios directos por bovinos han sido infraestimadas. Por ejemplo, en una nota del 27 de mayo del presente año publicada en el diario Noticias de Oaxaca (Altamirano-Díaz, 2023), se informó que hasta ese momento se habían presentado 38 casos de brucelosis humana, y Oaxaca estaba posicionada en el quinto lugar nacional; sin embargo, la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2023) ha establecido que la verdadera incidencia de la brucelosis humana es de 10 a 25 veces mayor que la establecida, esto debido a que las personas que se llegan a infectar y que muy probablemente tienen brucelosis (como ganaderos, veterinarios y personas que consumen leche cruda y sus derivados) no acuden al médico por presentar sintomatología no severa (Pacheco y Mosquera, 2015).

## Conclusiones

La brucelosis y la tuberculosis son enfermedades zoonóticas que se encuentran presentes en el Estado de Oaxaca, ambas con altas prevalencias. La tuberculosis resultó casi 10 veces más alta que la prevalencia esperada cuando se comparó con el valor previo, y la brucelosis tuvo una prevalencia casi 16 veces mayor a lo reportado por el Gobierno Federal, pero muy similar a lo reportado en otro estudio.

Los resultados cobran vital interés debido a las pérdidas económicas que la brucelosis y la tuberculosis ocasionan, ya que una mejor técnica diagnóstica, como lo es la PCR, ofrece resultados más verídicos y con ello se eliminarían correctamente los animales verdaderamente enfermos. Además, es una técnica que no requiere prueba confirmatoria.

Por otro lado, desde el punto de vista de la salud pública, diversas organizaciones de salud, entre ellas la OPS, han establecido una infraestimación en los casos de brucelosis y tuberculosis humana originadas por contagios a partir de los animales. Por lo tanto, el presente proyecto reviste vital importancia porque demuestra la presencia de estas enfermedades con altas prevalencias que son un riesgo importante para la salud humana. La PCR se posiciona como una herramienta importante de diagnóstico eficaz y oportuna para la detección de la brucelosis y tuberculosis, tanto en animales como en humanos.

## Referencias

1. Altamirano-Díaz, N. (2023). Oaxaca en el quinto a nivel nacional por brucelosis con 38 casos.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). Brucellosis reference guide: Exposures, testing and prevention.
3. Gutiérrez-Hernández, J., Palomares-Reséndiz, G., Hernández-Badillo, E., Leyva-Corona, J., Díaz-Aparicio, E., & Herrera-López, E. (2020). Frecuencias de enfermedades de impacto re productivo en bovinos de doble propósito ubicados en Oaxaca. *Abanico Veterinario*, 10, 1-11.
4. Matope, G., Gadaga, M. B., Bhebhe, B., Tshabalala, P. T., & Makaya, P. V. (2023). Bovine brucellosis and tuberculosis at a livestock-wildlife interface in Zimbabwe: A nexus for amplification of a zoonosis or a myth? *Veterinary Medicine and Science*, 9(3), 1327-1337.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995 [Internet]. Campaña Nacional contra la brucelosis en los animales.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 [Internet]. Campaña nacional contra la tuberculosis bovina.
7. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2023). Brucelosis. [Consultado el 16 de noviembre de 2023].
8. Pacheco, N., y Mosquera, O. (2015). Detección de *Brucella* spp. Por PCR en sangre de bovinos. *Gaceta Ciencia Veterinaria*, 20(2), 26-34.
9. Schwarz, D. G. G., de Sousa-Junior, P. F., Saraiva-da Silva, L., Polveiro, R. C., de Oliveira, J. F., Faria, M. P. O., et al. (2023). Spatiotemporal distribution and temporal trends of brucellosis and tuberculosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, 193, 105417.
10. Sweetline, A. N., Ronal, B. S. M., Kumar, T. M. A., Kannan, P., & Thangavelu, A. (2017). Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. *Veterinary Microbiology*, 198, 81-87.
11. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONAVIBE). (2018). Tuberculosis bovina en México.
12. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2021). Panorama Nacional de la brucelosis en los animales.