

Aislamiento de *Brucella melitensis* en el charal *Poblana letholepis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) del Lago Cráter La Preciosa en el Centro de México

Isolation of *Brucella melitensis* in the silverside *Poblana letholepis* (Atheriniforms: Atherinopsidae) from La Preciosa Crater Lake in Central Mexico

J. Ricardo Cruz-Aviña^{1,2*}, Elsa I. Castañeda-Roldan¹, Carlos Alfonso Álvarez-González², Karen N. Nieves-Rodríguez²
y Emry S. Peña-Marin^{2,3}

Recibido: 10 de marzo de 2020.

Aceptado: 05 de junio de 2020.

Publicado: agosto de 2020.

RESUMEN

¹ Laboratorio de Patogenicidad Microbiana, CICM-ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Av. San Claudio, Col. Jardines de San Manuel, Puebla, 72570. México.

² Laboratorio de Acuacultura Tropical, DABCIOL, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Carretera Villahermosa-Cárdenas Km 0.5, Villahermosa, Tabasco, 86139. México.

³ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor, Del. Benito Juárez, Ciudad de México, 03940. México.

*Corresponding author:

J. Ricardo Cruz-Aviña; e-mail: ambysto-mag@hotmail.com

To quote as:

Cruz-Aviña, J. R., E. I. Castañeda-Roldan, C. A. Álvarez-González, K. N. Nieves-Rodríguez & E. S. Peña-Marin. 2020. Aislamiento de *Brucella melitensis* en el charal *Poblana letholepis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) del Lago Cráter La Preciosa en el Centro de México. *Hidrobiológica* 30 (2): 163-171.

DOI:10.24275/uam/itz/dcbs/hidro/2020v30n2/
Cruz

Antecedentes: Las bacterias del género *Brucella* producen la enfermedad conocida como brucellosis (la zoonosis más importante del orbe). Actualmente se reconocen 14 especies, reportadas en mamíferos marinos, anfibios y peces comerciales. En los últimos años, en la Cuenca Oriental se detectó a *Brucella melitensis* en suelo agrícola y en el agua de los Lagos Cráter, por lo que se especulaba si *B. melitensis* tenía la capacidad de infectar a la ictiofauna nativa. **Objetivo:** Aislar e identificar a *Brucella melitensis* en el charal *Poblana letholepis* del Lago Cráter La Preciosa. **Métodos:** El primoaislamiento se realizó en placa-Agar a partir de tejidos blandos y la identificación del microorganismo a través de pruebas microbiológicas estándar. La identificación se corroboró por PCR-PF, utilizando cepas de referencia, mediante la amplificación el gen *bp26*, específico para el género *Brucella*. **Resultados:** Se aisló a *B. melitensis* en 66.66% de las muestras estudiadas n=60, los perfiles microbiológicos resultaron comparativamente idénticos con las cepas de referencia. La prueba por PCR amplificó el gen específico del género *bp26* con 1029 pb en 40% de las muestras analizadas. **Conclusiones:** El estudio generó el primer reporte de aislamiento e identificación para *B. melitensis* en un pez nativo, el cual da soporte a futuros estudios para comprender mejor esta enfermedad zoonotica y reconocer la importancia de la fauna nativa en la transmisión y permanencia de la brucellosis en ambientes acuáticos naturales.

Palabras clave: Axalapascos, biodiversidad, *Brucella* spp., conservación biológica, contaminación microbiológica.

ABSTRACT

Background: Bacteria of the genus *Brucella* yield the disease known as brucellosis (the most critical zoonosis in the world). Currently, 14 species are recognized, reported in marine mammals, amphibians, and commercial fish. In recent years, in the Eastern Basin, *Brucella melitensis* was detected in agricultural soil and the Crater Lakes' water, so it was speculated whether *B. melitensis* could infect native ichthyofauna. **Objective:** Isolate and identify *Brucella melitensis* in the charal of La Preciosa Crater Lake (*Poblana letholepis*). **Methods:** The first isolation was carried out on agar-plate from soft tissues and identifying the microorganism through standard microbiological tests. Which was corroborated by PCR-PF, using reference strains, by amplifying the *bp26* gene, specific for the genus *Brucella*. **Results:** *B. melitensis* was isolated in 66.66% of the samples studied n=60, the microbiological profiles were comparatively identical with the reference strains. The PCR test amplified the genus-specific gene *bp26* with 1029 bp in 40% of the samples analyzed. **Conclusions:** The study generated the first isolation and identification report for *Brucella melitensis* in a native fish, which supports future studies to better understand this zoonotic disease and recognize the importance of native fauna in the transmission and permanence of brucellosis in natural aquatic environments.

Keywords: Axalapazco, biodiversity, *Brucella* spp., biological conservation, microbiology pollution.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, nuevos patógenos zoonóticos emergen (Laperche, 2011), derivados principalmente de la fauna silvestre y de las malas prácticas del manejo de animales domésticos (vacas, cabras, entre otros), lo cual genera problemas en la salud pública (Gummow, 2010; Cabello & Cabello, 2008). Sin embargo, la dinámica ecológica y mecanismos de acción de este tipo de patógenos sigue siendo poco conocida (Whatmore *et al.*, 2015; Valenzuela & Medina, 2014; Woolhouse & Gowtage-Sequeria, 2005; Cleaveland *et al.*, 2001). En este sentido, la brucellosis es una enfermedad zoonótico emergente (EZE) que tiene un impacto significativo en la salud y la economía de comunidades rurales en muchas partes del mundo (Whatmore *et al.*, 2015; Cabello & Cabello, 2008).

Brucella son bacterias Gram negativas, aerobias, no motiles, no esporuladas, capaces de sobrevivir fuera del ambiente celular y otros medios como agua embotellada (2 meses, pH= 8.0 y 8°C) y agua mineral (hasta 72 días, pH 4.2-8.4, 20°C) (Falenski *et al.*, 2011). La supervivencia es de hasta 200 días en el agua natural (pH 9-9.3, 15-18°C, 0.5-9.8%) de la misma región donde el problema de la brucellosis humana data desde 1921 (Cruz-Aviña *et al.*, 2015, Pláceres, 1923). Actualmente, *Brucella* comprende 14 especies, de las cuales solo el 70% han sido descritas en los últimos 25 años, incluyendo la descripción de nuevos hospedadores acuáticos en cautiverio. Por ejemplo, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el bagre del Nilo (*Clarias gariepinus*) y diversas especies ranas (Whatmore *et al.*, 2015; Eisenberg *et al.*, 2012; Pappas, 2010; El-Tras *et al.*, 2010). Es por lo anterior que se considera un género en expansión hacia nuevos reservorios o nichos (O' Callaghan & Whatmore, 2011; El-Tras *et al.*, 2010; Pappas *et al.*, 2006; Gelev & Gelev, 1988). Esta expansión se detectó en el Lago Cráter de la Cuenca Oriental, el cual es de carácter endorreico y está considerado por CONABIO como área prioritaria importante (ANP 122 y RHP 71), que abarca los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz, donde se presenta una notable prevalencia y morbilidad de brucellosis en el humano (BrH 12-15 %) y en el ganado caprino (BrA 20-30 %) desde hace casi 100 años (Cruz-Aviña *et al.*, 2015; Cruz-Aviña, 2013; Castañeda-Roldán *et al.*, 2005; Pláceres, 1923).

Las infecciones por este tipo de bacterias presentan un efecto negativo sobre la biodiversidad, debido a que alteran significativamente sus tasas de crecimiento y reproducción (O'Callaghan & Whatmore, 2011; Cabello & Cabello, 2008), lo cual vulnera la fauna nativa como resultado de un aumento en la tasa de mortalidad y el potencial riesgo de extinción (Cabello & Cabello, 2008). En México existe un notable incremento en el impacto de las Enfermedades Zoonóticas Emergentes, mismas que pueden afectar la vida silvestre (Bulman & Lamberti, 2011; Jones *et al.*, 2008). El charal de La Preciosa, *Poblana letholepis* (Álvarez, 1950) es un aterinópsido endémico, restringido al lago cráter La Preciosa de la que existe poca información (Hernández-Rubio *et al.*, 2016; Ceballos & Ortega, 2011; Lira-Guerrero *et al.*, 2008; Flores-Negrete, 1998; Espinosa-Pérez *et al.*, 1993; Díaz-Pardo, 1992; Guerra Magaña, 1986; Álvarez, 1950; De Buen, 1945). Una especie que desde tiempos prehispánicos representa un recurso alimenticio y económicamente importante para los lugareños (Alcocer *et al.*, 2004). Las poblaciones silvestres de *P. letholepis* se encuentran en riesgo debido a la contaminación de su hábitat. La NOM-059-ECOL-2010 la reporta como una especie amenazada (A) y la lista roja de especies amenazadas IUCN la considera en peligro crítico (CR) (Cruz-Aviña *et al.*, 2015, Cruz-Aviña,

2013, SEMARNAT, 2010; Can-Chulim *et al.*, 2011; Castañeda-Roldán *et al.*, 2005; Alcocer *et al.*, 2004; Contreras-Balderas *et al.*, 2002).

A pesar del reconocimiento científico del charal del lago La Preciosa (*P. letholepis*), desde hace 70 años, poco se conoce sobre su ecología, enfermedades y aspectos específicos para el logro de su aprovechamiento sustentable. Además, a la fecha no existen acciones concretas para su conservación (Ceballos *et al.*, 2018; Cruz-Aviña *et al.*, 2015; Woolrich-Piña *et al.*, 2012; Alcocer *et al.*, 2010; Bloom *et al.*, 2009; Miller, 1986). El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de la bacteria *Brucella melitensis* en el charal *Poblana letholepis* de La Preciosa, mediante métodos microbiológicos y moleculares (PCR), para contribuir así a su preservación y al estudio científico de esta especie mexicana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio. El Lago La Preciosa (Las Minas) es un lago cráter tipo *Maar*, monomictico, cálido tropical de altura (2400 m. snm), de tipo atalasohalino e hipohalino (1.1 gL⁻¹), un pH alcalino (≤ 9) considerado oligotrófico y con una profundidad máxima de 36 m. Ubicado entre los 19° 21'N y 97° 23'W en la Cuenca Oriental (Alcocer & Bernal, 2010; Armienta *et al.*, 2008; Arredondo-Figueroa, 1983) (Fig. 1).

Trabajo de campo. Para este estudio se realizó un muestreo simple completamente aleatorizado para poblaciones finitas, lo que arrojó una N total de 263 individuos que deberían ser capturados en las estaciones planteadas. Sin embargo, el esfuerzo de muestreo (abril 2014 a mayo 2016) solamente permitió capturar un total de 60 ejemplares de *P. letholepis* del lago cráter La Preciosa en sitios cercanos a la orilla. La colecta se realizó con un chinchorro (12 x 3 m) de malla cerrada a diferentes profundidades. Los ejemplares se colocaron en bolsas de plástico con agua del lago y hielo conforme a las técnicas descritas por Hernández-Rubio *et al.*, (2016) y Blancas-Arroyo *et al.*, (2014). Los peces se transportaron al Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CICM-IC-BUAP) para su análisis respectivo. Los organismos fueron sacrificados por shock térmico y se diseccionaron para obtener el tracto digestivo y gónadas. Los charales estudiados se donaron institucionalmente a la Colección Nacional de Peces del Instituto de Biología de la UNAM (CNPE), con número de colección: PE 10146- PE10203.

Trabajo de laboratorio. Se diseñaron dos análisis a partir de métodos diagnóstico directo (aislamiento en placa-agar y PCR punto final).

1. Aislamiento de *Brucella sp.* en placa-agar. De los ejemplares de *P. letholepis* se obtuvieron muestras del tracto digestivo y gónadas conforme a la técnica de Amato *et al.*, (1991). Los tejidos fueron centrifugados en tubos Falcon de 50 mL con suero fisiológico (Ringer lactato) y del botón del sedimento se tomó una alícuota de 10 mL para realizar series de diluciones por triplicado en el intervalo de 10³ a 10⁸ L, las cuales fueron inoculadas en placas de Petri con agar del medio específico BrucellaBUAP® (Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, CICM, IC, BUAP, Puebla, 2015), con cristal violeta y antibióticos (Alton *et al.*, 1988; Alton *et al.*, 1976; Alton *et al.*, 1972). Las placas se incubaron dentro de frascos de vidrio (2.5 L), con una atmósfera de CO₂ al 5%, a 37°C por 48 h (Castañeda-Roldán *et al.*, 2005 modificado; Alton *et al.*, 1988; Alton *et al.*, 1976).

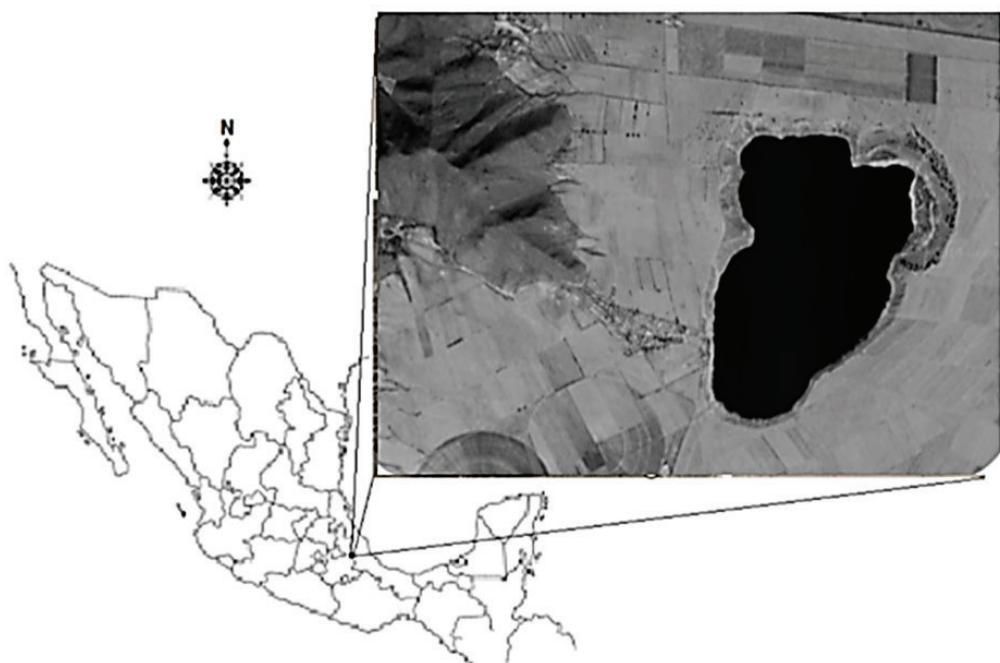


Figura 1.- Ubicación de la zona de muestreo, Lago Cráter La Preciosa, Puebla, México.

La identificación inicial de *Brucella* fue por morfología, donde a partir del total de colonias obtenidas se seleccionaron colonias con características típicas del género *Brucella*, a las cuales se les realizaron pruebas de aglutinación con suero específico anti-*Brucella*, tinción de Gram, tinción de Zihel-Neelsen (ZH) modificada y pruebas bioquímicas (TSI, Citrato; Urea, LIA, producción de H₂S en tiras de acetato de plomo, aglutinación con acriflavina). La identificación de *Brucella melitensis* se estableció mediante pruebas de sensibilidad a colorantes con Tionina (diluciones 1:100,000, 1:50,000 y 1:25,000), Fucsina (115937 Merck Millipore) (dilución 1:10,000) y Safranina (115948 Merck Millipore) (dilución de 1:10,000) (Alton *et al.*, 1988). También se calculó el total de resultados positivos obtenidos para *Brucella melitensis* derivados de las muestras. Los primeros aislamientos se separaron durante las siguientes 8 a 24 h y se resembraron en el medio BrucellaBUAP® bajo las condiciones anteriormente descritas. Posteriormente se les realizaron las pruebas (SAT), 2-β-mercaptopropionato (2BME) y Serion ELISA classic Brucella IgG/IgM/IgA. Éstos se llevaron a cabo en el depósito y comparativamente con los controles positivos de cepas vacunales de *Brucella* Rev-1 y *Brucella* M16 (Yagupsky, 1999; Alton *et al.*, 1988).

Test rosa de Bengala.- El antígeno rosa de Bengala (8% concentración celular) y suero control positivo (22°C), se mezclaron con la suspensión bacteriana (30 µL cada uno). La mezcla se agitó suavemente en un agitador de balanceo (Boyn, SK-R330-Pro), durante 5 min y se depositó la suspensión como gota de 2 cm de diámetro, en placa de vidrio esmerilada. La aglutinación visible se consideró positiva (OIE, 2004; Alton *et al.*, 1988).

Test de Rivanol.- El antígeno de Rivanol-*Brucella* y la solución de Rivanol fueron obtenidos en el Laboratorio de Patogenicidad bacteriana

del CICM-IC-BUAP. El ensayo se realizó mezclando 40 mL de muestra de suero con igual volumen de Rivanol. La solución se agitó en un tubo de ensayo, se dejó reposar durante 5-60 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm. Se mezclaron 30 mL de antígeno de Rivanol con 80 mL, 40 mL, 20 mL y 10 mL del sobrenadante, respectivamente, para obtener diluciones 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200. Las placas se rotaron y mantuvieron durante seis minutos bajo cubierta para evitar la evaporación, seis minutos después las placas fueron rotadas de nuevo. La aglutinación completa a la 1:25 fue considerada positiva (Quinn *et al.*, 1994).

2. PCR-Punto Final

- **Purificación de ADN.** Se procedió a purificar el ADN bacteriano de los aislamientos derivados del tejido de *P. letholepis* con sospecha de *Brucella*, a través de un Kit genómico de purificación ADN-Norgen 21550 (Norgen Biotek Corporation, Ontario, Canadá) que permite obtener ADN de alta calidad, a partir de tan sólo 10 células bacterianas en 1 mL de muestra (Shell *et al.*, 2013) hasta obtener 5 ng/µL de ADN bacteriano en cada muestra, con una pureza en la absorbancia de 260/280 nm.
- **Análisis Molecular.** Se realizó un análisis de la cadena en reacción de la polimerasa PCR para comprobar que el ADN de las colonias aisladas pertenecía al género *Brucella*, para lo cual se extrajo el ADN total bacteriano de cepas de referencia. La amplificación del gen *bp26* se realizó con cebadores específicos para el género *Brucella* (Cloeckaert *et al.*, 2011), mediante el Kit comercial (Genomic DNA Purification, Thermo Scientific™, Kit Fermentas). Para la cuantificación de ADN extraído se usó un Kit comercial (Quant-iT® ds DNA HS Assay Kit, de Invitrogen). En los cebadores y la PCR se usó el método descrito por García-Yoldi

et al., (2006) y el programa miniPCR™ (Cambridge, Ma, USA). Los cebadores utilizados fueron: Oligo 1: 5'GCCCTGACATAACCGC-TT3' y Oligo 2: 5'GAGCGTGACATTGCCGATA3'. El carril M indica el Marcador molecular. Las cepas de referencia empleadas como controles positivos fueron *B. S19* (carril 1) y *B. M16* (carril 2) y como control negativo se utilizó *Escherichia coli* (carril 3), y el ADN bacteriano extraído de *P. letholepis* (carril 4).

RESULTADOS

Analisis Microbiológico y Primoaislamiento.- Se logró el primoaislamiento para *Brucella* en 40 de las 60 muestras de *P. letholepis* (66.66%) en el tracto digestivo y góndadas de los ejemplares. Las muestras se resembraron por triplicado y posterior a las 48 hrs fueron positivas a pruebas de diagnóstico de rutina para *Brucella melitensis*: rosa de Bengala, Gram, Rivanol, SAT y 2ME (Tabla 1). Las muestras restantes de este estudio resultaron negativas o indeterminadas con un bajo porcentaje en concentraciones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en rango de 1×10^6 hasta 1×10^{10} .

Actividad metabólica.- CO_2 independiente. No produjo H_2S . Mostró crecimiento positivo en presencia de fucsina básica y de tioniina, positivo para safranina e hidrolizó de manera normal la urea.

Detección por PCR punto final.- Se obtuvo la ampliación del gen *bp26* con longitud de 1029 pb (carril M, marcador molecular) de las muestras del ADN bacteriano purificado (carril 4) y se les comparó con los controles positivos *B. M16* (carril 1), *B. S19* (carril 2), se utilizó ADN de *E. coli* como control negativo (carril 3); siendo positivas 24 muestras a *Brucella* (40%) del total analizado (Fig. 2).

DISCUSIÓN

Aunque la brucellosis ha sido reportada con anterioridad en humanos, animales domésticos, animales silvestres y animales marinos (Godfroid *et al.*, 2011; Godfroid *et al.*, 2010; OIE, 2004; Pedley & Pond, 2003; Moreno *et al.*, 2002; Godfroid, 2002; Corbel & Brinley-Morgan, 1984), este es el primer reporte sobre la presencia de *Brucella melitensis* en *P. letholepis* dentro de un sistema acuático lítico endorreico, siendo descritos los peces de agua dulce como portadores sintomáticos. El reporte de la diseminación de *Brucella* hacia nuevos organismos o reservorios representa un hito epistemológico, ya que antiguamente se consideraba que la brucellosis era una patología exclusiva de los mamíferos (Jones *et al.*, 2008; OIE, 2004). Los resultados encontrados comprueban la complejidad del problema ambiental, así como la evo-

lución constante del patógeno; su migración y colonización hacia nuevos hospederos, incluido el ambiente acuático (Cruz-Aviña *et al.*, 2015; Osterman & Moriyón, 2006). Además, su función de vector para varios patógenos bacterianos zoonóticos, donde se incluyen *Aeromonas* spp. (Palumbo *et al.*, 1985), *Vibrio* spp. (Lehane & Rawlin, 2000), algunas especies de la familia de las enterobacterias como *Edwardsiella* spp. (Meyer & Bullock, 1973), *Mycobacterium* spp. (Ho *et al.*, 2006), *Streptococcus* spp. (Weinstein *et al.*, 1997) y *Erysiplothrix* (Gorby & Peacock, 1988). En cuanto a la relación con *Brucella melitensis*, El-Tras *et al.* (2010) y Salem & Mohsen (1997), reportan que el bagre del Nilo (*Clarias gariepinus*) es susceptible a contraer esta bacteria. Sin embargo, se trata de *B. melitensis* biovar 3, una biovariedad que no está reportada para México. Los resultados del presente estudio ($n_1=60$; $n_2=40$ muestras positivas en placa de Agar (66.66%) y $n_2=24$ muestras positivas para PCR (40%)), demuestran que el charal endémico del lago cráter La Preciosa puede ser infectado naturalmente por *B. melitensis* biovar 1 y sugerir que *P. letholepis* debe ser considerada como potencial reservorio para *B. melitensis* biovar 1, representando un papel clave en la epidemiología de la enfermedad en la región del Cuenca Oriental, área endémica de brucellosis humana y de ganado caprino (Cruz-Aviña *et al.*, 2015). Aunque el objetivo del estudio no era estimar la frecuencia de la infección por *Brucella* en el charal del lago La Preciosa en la región, la detección de *B. melitensis* biovar 1 en un 66.66% de las muestras de peces en varios sitios del lago cráter, sugiere un alto nivel de exposición en estos cuerpos de agua de la Cuenca Oriental. En contraste, a lo reportado por Salem & Mohsen (1997) y El Tras *et al.* (2010); los resultados de esta investigación mostraron un número de positivos por PCR importante (40%). Adicionalmente, en estos cuerpos de agua endorreicos y líticos, hay una mayor probabilidad de contaminación microbiológica como resultado del acceso directo al ganado caprino que pace sin control (libre) en la zona y sus materiales contaminantes (fetos abortados, membranas fetales, placenta, orina, etc.). Por lo que se incrementa el potencial de contaminación por *Brucella*. Aunado que los peces pueden infectarse con facilidad por bacterias zoonóticas en ambientes acuáticos contaminados (Guzmán & Campos 2004; Pal & Gupta, 1992; Geldreich & Clarke, 1966).; Por su parte, Salem & Mohsen (1997) reportan lesiones cutáneas en bagres (*Clarias gariepinus*) inoculados experimentalmente con 105 células de *B. melitensis* biovar 3. Sin embargo, en la recolección de organismos, no se detectaron lesiones cutáneas superficiales visibles. Aunque hay que hacer énfasis entre la gran diferencia de tamaño del bagre *C. gariepinus* comparado con el aterínido *P. letholepis*. La evidencia sugiere por primera vez, un posible vínculo entre la brucellosis en peces de agua dulce y la brucellosis en otras especies. En este sentido, *B. melitensis* biovar 1 es la causa principal de la brucellosis en caprinos y humanos en la zona de

Tabla 1.- Resultados de las pruebas positivas a las pruebas bioquímicas de diagnóstico de rutina para la identificación de *Brucella* aislado de MM de *P. letholepis*: rosa de Bengala, Gram, Rivanol, SAT y 2ME. Las muestras restantes de este estudio resultaron negativas o indeterminadas a estas pruebas con un bajo porcentaje en concentraciones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de 1×10^6 hasta 1×10^{10} .

Especie	Biotipo	Oxidasa	Necesidad de CO_2	Producción de H_2S	Ureasa	Tioniina 1:25 000 y 1:50 000	Safranina 1: 10 000	Fucsina 1:50 000
<i>B. melitensis</i> 16 M	Biotipo 1	(+)	(-)	(-)	V	(+)	(+)	(+)
<i>B. melitensis</i> aislada de MM de <i>P. letholepis</i>	Biotipo 1	(+)	(-)	(-)	V (24 horas) (+)	(+)	(+)	(+)

la Cuenca Oriental, donde existe una incidencia del 10% de brucelosis en humanos y del 30% de brucelosis en ganado caprino, datos que se encuentran por encima de la media nacional (Cruz-Aviña *et al.*, 2015; García-Juárez, 2014). Lo anterior también se relaciona con el hecho de que las cabras infectadas pacen libres por el campo abierto y a la orilla de los Lagos Cráter (La Preciosa), ambientes susceptibles debido al tipo de suelo (cinerítico) y la naturaleza endorreica de estos cuerpos de agua, lo que facilita la contaminación microbiológica de tipo mecánica por arrastre, misma que se maximiza en la época de lluvias (Cruz-Aviña *et al.*, 2017; Cruz-Aviña *et al.*, 2015; Cotruvo *et al.*, 2004; Alcocer *et al.*, 2004). Asimismo, persiste entre los lugareños una alta incidencia de brucelosis humana por el contacto con rumiantes (ganado caprino) expuestos e infectados y el consumo de algunos de sus productos o derivados, por ejemplo, leche sin pasteurizar y queso crudo (Cruz-Aviña *et al.*, 2015). Esta alta incidencia también se ha reportado para el bagre del Nilo (*Clarias gariepinus*), derivado del consumo humano de productos lácteos crudos o sin hervir procedentes de los hatos de ganado artiodáctilo o camellos (Jennings *et al.*, 2007; Almuneef *et al.*, 2004; Namiduru *et al.*, 2003; Kiel & Khan, 1993; Bilal *et al.*, 1991).

Por su parte, la aparición de un nuevo agente patógeno tras un salto de taxón o de especie representa la colonización exitosa de un nuevo hábitat. Pese a poseer distintos hospedadores preferentes, tanto *B. abortus* como *B. suis* se han aislado en varias especies silvestres en el mundo, lo que resulta menos frecuente con *B. melitensis* (Dobson & Foufopoulos, 2001; Daszak *et al.*, 2000).

Cabe señalar, que los resultados del estudio por métodos microbiológicos son más cercanos a *B. melitensis* biovar 1, lo cual coincide en línea a lo reportado por Cruz-Aviña *et al.* (2017) y Cruz-Aviña *et al.* (2015) en este cuerpo de agua (Lago Cráter La Preciosa). Sin embargo, la patogénesis de *Brucella* spp. en las especies silvestres no se ha

definido todavía con suficiente precisión (Kang *et al.*, 2011), su prevalencia es generalmente baja o muy baja, por lo que el comportamiento individual y las interacciones entre fauna silvestre y ganado doméstico, no son los factores de mayor relevancia epidemiológica en la potencial transmisión de esta bacteria. Puesto que las pruebas indirectas, basadas normalmente en el diagnóstico serológico en muestras de sangre o leche, no pueden identificar la especie de *Brucella* involucrada. Es preciso recurrir, siempre que sea posible, al diagnóstico bacteriológico utilizando técnicas clásicas que siguen vigentes como confirmatoria a nivel mundial (OIE, 2004) o aquellas basadas en la biología molecular (PCR). Sin embargo, las pruebas serológicas no siempre son capaces de determinar el microorganismo patógeno, y menos aún; cuando no hay información de las capacidades genéticas de respuesta al ambiente de la brucelas procedente del medio silvestre (Kang *et al.*, 2011). Por estas razones, se utilizaron tanto las técnicas clásicas microbiológicas como por PCR, donde se amplificó al gen *bp26* específico del género *Brucella*. Estos resultados concuerdan con lo sugerido por Cloeckaert *et al.* (2011), Pappas (2010), Scholz *et al.* (2008) y Pappas *et al.* (2006), quienes sugieren que el género *Brucella* puede potencialmente afectar a una gama ecológica amplia (Scholz *et al.*, 2016), incluyendo actualmente a peces nativos como *P. letholepis*. Al respecto, *P. letholepis* ha aumentado su potencial estatus de peligro crítico (CP), debido área de distribución restringida ($\leq 100 \text{ km}^2$) de Grado 4 de acuerdo con el criterio de distribución (MER) de carácter microendémica (Aldama *et al.*, 2007). La especie *P. letholepis* solo reside en el lago cráter La Preciosa y este lago al igual que los otros lagos cráter de la Región sufre problemas de contaminación microbiológica sistemática e histórica (Cruz-Aviña *et al.*, 2017 Alcocer *et al.*, 2004). Adicionalmente se reportan hasta 22 tipos diferentes de parásitos para este Atherinido, incluyendo especies zoonóticas (Moreno-Navarrete & Aguilar-Aguilar, 2013; De León *et al.*, 2008 y Coyote, 2000) y ahora se incluye a *Brucella* como de potencial riesgo zoonótico (López-Goñi *et al.*, 2011).

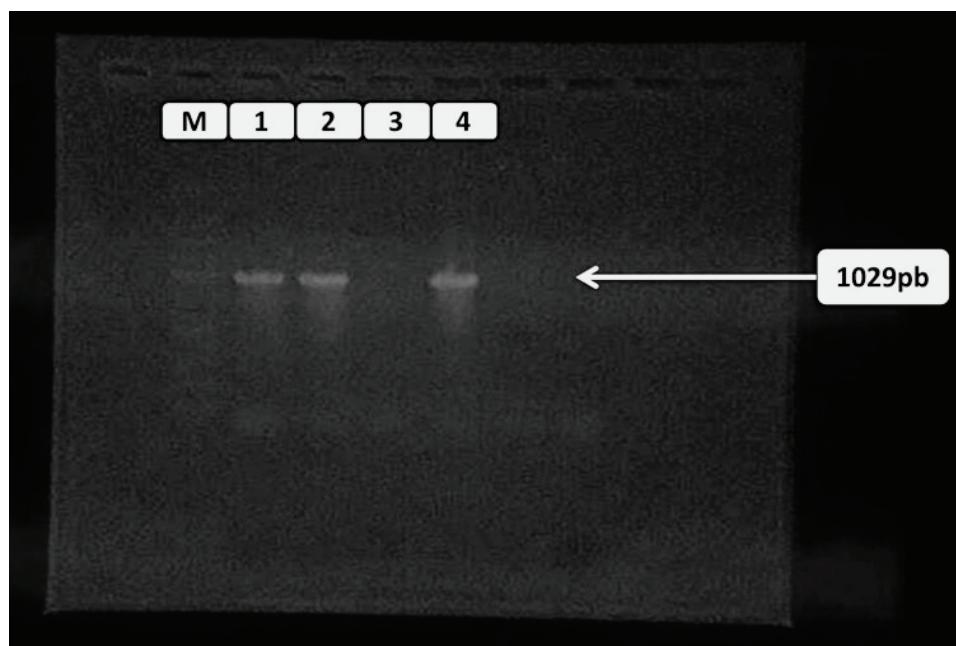


Figura 2.- Ampliación del gen *bp26* (específico para el género *Brucella*). Los cebadores fueron: (Oligo 1: 5'GCCCTGACATAACCGCTT3', Oligo 2: 5'GAGCGTGACATTGCGATA3'). Carril M (Marcador molecular); Carril 1 y 2, cepas de referencia empleadas como controles positivos, *B. S19* y *B. M16*, respectivamente y Carril 3, cepa de referencia de *E. coli* como control negativo; línea 4, ADN bacteriano extraído de tejidos blandos de *Poblana letholepis*.

Hasta hace unas décadas se reconocía históricamente las diferencias entre especies de *Brucella* por el tropismo, la patogenicidad y la expresión fenotípica del huésped, hoy en día habrá que pensar en otros aspectos, nuevas posibilidades y generar nuevos métodos de diagnóstico para especies nativas. La cepa aislada de *Brucella melitensis* biovar 1, es capaz de migrar del ganado caprino, al agua natural, peces y potencialmente al resto de biodiversidad nativa, con incidencia directa en los habitantes de las comunidades aledañas. A pesar de las nulas prácticas zoosanitarias en la Cuenca Oriental (cabras infectadas pastando sin control), esta investigación aporta datos relevantes para mejorar entendimiento del papel que juegan estos nuevos hospederos de la enfermedad. Aunque faltan estudios concluyentes a largo plazo para entender el rol de estos "nuevos jugadores" epidemiológicos, se requiere alertar sobre la incidencia potencial de este patógeno en reservorios no convencionales, para establecer medidas de prevención en la Región de estudio, con la finalidad de comprender mejor a esta enfermedad zoonótica y reconocer la importancia de la fauna nativa en la transmisión y permanencia de la brucellosis en áreas naturales.

CONCLUSIONES

Se determinó la presencia de *Brucella melitensis* en tejidos blandos del Charal *Poblana letholepis* del lago cráter La Preciosa Puebla, México, por medio de métodos microbiológicos y moleculares, con una incidencia del (66%) del primoaislamiento y (40%) de las pruebas confirmatorias por PCR, demostrándose la transmisión por interfaz de la enfermedad y el potencial riesgo ecológico en la ictiofauna nativa de la región de los lagos cráter como nuevo reservorio de *Brucella*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONACYT por el apoyo financiero de la beca de Posdoctorado del primer autor. Agradecemos la ayuda y colaboración de las siguientes instituciones: UJAT, CICART, Laboratorio de Acuacultura Tropical, UAM- Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, PEXPA, FES-I UNAM Laboratorio de Limnología Tropical, Dr. Miroslav Macek, y Dr. Jorge Quiroz; Colección Nacional de Peces (CNPE) IBUNAM, Dr. Héctor Espinosa; SS Puebla, Departamento de Zoonosis, MVZ Juan Manuel Balderas, habitantes de San Luis Atexcac y San Juan La Muralla, Municipio Guadalupe Victoria (Doña Lety, Don Juan, Don Lupe y Don Pedro) por último a Ricardo Daniel Cruz Guerrero por su invaluable ayuda en campo.

REFERENCIAS

- ALCOCER, J. & F. W. BERNAL-BROOKS. 2010. Limnology in Mexico. *Hydrobiologia* 644(1): 1-54.
- ALCOCER, J. D., F. O. A. ESCOLERO, S. L. E. MARTÍN. 2004. Problemática del agua de la Cuenca de Oriental, estados de Puebla, Veracruz y Tlaxcala. In: Jiménez, B. & L. E. Marín. (eds.). *El Agua en México Vista desde la Academia*. Academia Mexicana de Ciencias, México, D.F, pp. 57-77.
- ALCOCER, J., E. ARCE, L. ZAMBRANO & X. CHIAPPA-CARRARA. 2010. *Poblana alchichica*: A threatened silverside species? *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen* 30(9): 1429-1432. DOI:10.1080/03680770.2009.11902347
- ALDAMA, A., B. GOETTSCH, J. S. MAINERO, M. TAMBUTTI, O. SÁNCHEZ, R. MEDELLÍN. 2007. *Método de evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México* (MER) Instituto Nacional de Ecología, México. 300 p.
- ALMUNEED, M. A., Z. A. MEMISH, H. H. BALKHY, B. ALOTAIBI, S. ALGODA, M. ABBAS & S. ALSUBAIE. 2004. Importance of screening household members of acute brucellosis cases in endemic areas. *Epidemiology and infection* 132(3): 533-540. DOI:10.1017/s0950268803001857
- ÁLVAREZ, J. 1950. Contribución al conocimiento de los peces de la Región de los Llanos, Estado de Puebla. México. *IPN Anales Escuela Nacional Ciencias Biológicas* 6: 81-107.
- ALTON, G. G., M. L. M. JONES, C. GARCÍA-CARRILLO & D. M. V. A. TRENCHI. 1972. *Brucella melitensis* Rev-1 and *Brucella abortus* Vaccines in Goats: Immunity. *Am. J. Vet. Res* 33(9): 1747-1751.
- ALTON, G. G., L. M. JONES & D. E. PIETZ. 1976. *Técnicas de laboratorio en la brucellosis*. OMS, Genove. 177 p.
- ALTON, G. G., L. M. JONES, R. D. ANGUS, J. M. VERGER. 1988. *Techniques for the brucellosis laboratory*. Institut National de la Recherche Agronomique INRA, Paris, Francia. 190 p.
- AMATO, J. F. R., W. A. BOEGER & S. B. AMATO. 1991. *Protocolos para laboratorio: coleta e processamento de parasitos de pescado*. Seropédica, Gráfica da Universida de Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil. 81 p.
- ARMIENTA, M. A., G. VILA CLARA, S. DE LA CRUZ-REYNA, S. RAMOS, N. CENICEROS, O. CRUZ & F. ARCEGA-CABRERA. 2008. Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 178(2): 249-258.
- ARREDONDO-FIGUEROA, J. L., R. L. C. BORREGO, M. VALLADOLID. 1983. Batimetría y morfometría de los lagos "Maars" de la Cuenca de Oriental, Puebla, México. *Biótica* 8: 31-47.
- BILAL, N., J. GHAZI, A. B. RAYMOND, F. M. OLFAT, M. E. NARIMAN. 1991. Brucellosis in Asia region of Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal* 12: 37-41.
- BULMAN, G. M. & J. C. LAMBERTI. 2011. Parásitos y enfermedades parásitarias emergentes y reemergentes: Calentamiento global, cambio climático, transmisión y migración de especies. Evaluación de la participación del hombre. *Vet Argentina* 28(282): 1-15.
- BLANCAS-ARROYO, G. A., R. FRÍAS-SEVILLA, E. DE LA ROSA-PIMENTEL, V. SUÁREZ-NAVARRO, J. R. CASTRO-GÓMEZ & J. MAGAÑA-MORALES. 2014. Efecto de la salinidad en la sobrevivencia de peces silvestres del género *Chirostoma* durante el transporte y mantenimiento en laboratorio. *Hidrobiológica* 24(3): 223-230.
- BLOOM, D. D., K. R. PILLER, J. LYONS, N. MERCADO-SILVA & M. MEDINA-NAVA. 2009. Systematics and Biogeography of the Silverside Tribe Menidiini (Teleostomi: Atherinopsidae) Based on the Mitochondrial ND2 Gene. *Copeia* 2009(2): 408-417. DOI:10.1643/ci-07-151
- CASTAÑEDA-ROLDAN, E. I., F. F. AVELINO, A. ESPINOSA & E. CHÁVEZ. 2005. Determinación de *Brucella melitensis* en una red, agua residual, agua de lluvia, suelo de una comunidad de alta morbilidad en el estado de Puebla. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* 25: 4-15.
- CABELLO, C. C. & C. F. CABELLO. 2008. Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. *Revista Médica de Chile* 136(3):385-393. DOI:10.4067/s0034-98872008000300016

- CAN-CHULIM, Á., H. M. ORTEGA-ESCOBAR, N. E. GARCÍA-CALDERÓN, A. L. REYES-ORTIGOZA, V. A. GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ & D. FLORES-ROMÁN. 2011. Origen y calidad del agua subterránea en la cuenca oriental de México. *Terra Latinoamericana* 29(2): 189-200.
- CEBALLOS, G. & P. ORTEGA-BÁEZ. 2011. La sexta extinción: la pérdida de especies y poblaciones en el Neotrópico. In: Simonetti, J. & R. Dirzo (eds.). *Conservación Biológica: Perspectivas de Latinoamérica*. Editorial Universitaria Chile, pp. 194.
- CEBALLOS, G., E. D. PARDO, L. M. ESTÉVEZ & H. E. PÉREZ. 2018. *Los peces dulceacuícolas de México en peligro de extinción*. Fondo de Cultura Económica, México. 487 pp.
- CLEAVELAND, S., M. K. LAURENSEN & L. H. TAYLOR. 2001. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356(1411): 991-999. DOI:10.1098/rstb.2001.0889.
- CLOECKAERT, A., N. BERNARDET, M. S. KOYASSI, A. M. WHATMORE & M. S. ZYGMUNT. 2011. Novel IS711 Chromosomal Location Useful for Identification of Marine Mammal *Brucella* Genotype ST27, Which Is Associated with Zoonotic Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 49(11): 3954-3959. DOI:10.1128/jcm.05238-11
- CONTRERAS-BALDERAS, S., P. ALMADA-VILLELA, M. D. L. LOZANO-VILANO & M. GARCÍA-RAMÍREZ. 2002. Freshwater fish at risk or extinct in México, a checklist and review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12(3): 241-251. DOI:10.1023/a:1025053001155
- COYOTE, H. B. A. 2000. Análisis de las relaciones taxonómicas entre las especies de *Poblana*, De Buen 1945 (Pisces: Atherinopsidae) mediante marcadores RAPD. Tesis Licenciatura, IPN, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México. 91 p.
- CORBEL, M. J. & W. J. BRINLEY-MORGAN. 1984. Genus *Brucella*. In: Krieg, N. R. & J. G. Holt. (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 942.
- COTRUVO, J. A., A. DUFOUR, G. REES, J. BARTRAM, R. CARR, D. O. CLIVER & V. P. J. GANNON. 2004. *Waterborne zoonoses*. World Health Organization by IWA Publishing, London, UK. 255 p.
- CRUZ-AVIÑA, J. R. 2013. Factores fisicoquímicos que influyen en la sobrevivencia de *Brucella* spp. en sistemas acuáticos en un área del Eje Neovolcánico en Puebla, México. Tesis de Maestría, BUAP. Puebla, México. 116 p.
- CRUZ-AVIÑA, J. R., E. CASTAÑEDA-ROLDÁN & M. MACEK. 2015. *Brucella* spp. como contaminante potencial en el agua de los axalapazcos de Puebla, México. In: Alcocer, J., M. Merino-Ibarra & E. Escobar-Briónes (eds.). *Tendencias de Investigación en Limnología Tropical Perpectivas Universitarias en Latinoamérica*, CONACYT, pp. 88-98.
- CRUZ-AVIÑA, J. R., E. CASTAÑEDA-ROLDÁN, S. E. SILVA-GÓMEZ. 2017. La problemática ambiental de la Región de los Axalapazcos de Puebla: erosión, pobreza, enfermedades emergentes, biodiversidad y etnocicultura. In: Rodríguez H. A. L. (ed.). *El Desarrollo Sustentable*. Plaza y Valdés, México, pp. 1-99.
- DASZAK, P., A. A. CUNNINGHAM, A. D. HYATT. 2000. Emerging infectious diseases of wildlife threats to Biodiversity and Human Health. *Science*. 287: 443-449.
- DE BUEN, F. 1945. Investigaciones sobre Ictiología Mexicana I. *Atherinidae* de aguas continentales de México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM*, México 6: 475-532.
- DE LEÓN, G. P. P., L. G. PRIETO & G. L. GUERRERO. 2008. Helmintos parásitos de aterinópsidos de agua dulce (Osteichthyes: Atheriniformes) del centro de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 79: 325-331.
- DÍAZ-PARDO, E. 1992. Bioecología de los lagos cráter de Puebla. Tesis Doctorado, Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N. México. 87 p.
- DOBSON, A. & J. FOUFOPOULOS. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356(1411): 1001-1012. DOI:10.1098/rstb.2001.0900
- EISENBERG, T., H. P. HAMANN, U. KAIM, K. SCHLEZ, H. SEEGER, N. SCHAUERTE, M. ZSCHÖCK. 2012. Isolation of potentially novel *Brucella* spp. from frogs. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 3753-3755.
- EL-TRAS, W. F., A. A. TAYEL, M. M. ELTHOLTH & J. GUITIAN. 2010. *Brucella* infection in fresh water fish: Evidence for natural infection of Nile catfish, *Clarias gariepinus*, with *Brucella melitensis*. *Veterinary Microbiology* 141(3-4): 321-325. DOI:10.1016/j.vetmic.2009.09.017
- ESPINOZA-PÉREZ, H., M. T. GASPAR-DILLANES & P. FUENTES-MATA. 1993. *Listados Faunísticos de México III Los peces dulceacuícolas mexicanos*. Instituto de Biología, UNAM, México. 62 p.
- FALENSKI, A., A. MAYER-SCHOLL, M. FILTER, C. GöLLNER, B. APPEL & K. NÖCKLER. 2011. Survival of *Brucella* spp. in mineral water, milk and yogurt. *International Journal of Food Microbiology* 145(1): 326-330. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.033
- FLORES-NEGRENTE, E. 1998. Estudio poblacional de tres especies de *Poblana* (Pisces: Atherinopsidae) en tres lagos de cráter de Puebla, México. Tesis de Maestría, UNAM. México. 101 p.
- GARCÍA-JUÁREZ, G., J. E. RAMÍREZ-BRIBIESCA, M. HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, L. M. HERNÁNDEZ-CALVA, E. DÍAZ-APARICIO & H. OROZCO-BOLAÑOS. 2014. Análisis de riesgos de la brucellosis en el estado de Tlaxcala. *Salud Pública de México* 56: 355-362.
- GARCÍA-YOLDI, D., C. M. MARÍN, M. J. DE MIGUEL, P. M. MUÑOZ, J. L. VIZMANOS, G. I. LÓPEZ. 2006. Multiplex PCR assay for the identification and differentiation of all *Brucella* species and the vaccine strains *Brucella abortus* S19 and RB51 and *Brucella melitensis*. *Rev. Clin. Chemistry* 52: 779-781.
- GELDREICH, E. E. & N. A. CLARKE. 1966. Bacterial pollution indicators in the intestinal tract of freshwater fish. *Applied Environmental Microbiology* 14(3): 429-437.
- GELEV, I. & E. GELEV. 1988. A new species of fish-pathogenic bacterium antigenically related to classical brucellae. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* 269(1): 1-6. DOI:10.1016/s0176-6724(88)80078-6
- GODFROID, J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique-Office international des épizooties* 21(1): 277-286.

- GODFROID, J., K. NIELSEN & C. SAEGERMAN. 2010. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal* 51(4): 296-305. DOI:10.3325/cmj.2010.51.296
- GODFROID, J., H. C. SCHOLZ, T. BARBIER, C. NICOLAS, P. WATTIAU, D. FRETIN, J. J. LETESSON. 2011. Brucellosis at the animal ecosystem human interface at the beginning of the 21st century. *Preventive Veterinary Medicine* 102: 118-131.
- GORBY, G. L. & J. E. PEACOCK. 1988. *Erysipelothrix rhusiopathiae* Endocarditis: Microbiologic, Epidemiologic, and Clinical Features of an Occupational Disease. *Clinical Infectious Diseases* 10(2): 317-325. DOI:10.1093/clinids/10.2.317
- GUERRA-MAGAÑA, C. 1986. Análisis taxonómico poblacional de peces aterinídos (*Chirostoma* y *Poblana*), de las cuencas endorreicas del extremo sur del altiplano mexicano. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, México* 30: 81-113.
- GUMMOW, B. 2010. Challenges posed by new and re-emerging infectious diseases in livestock production, wildlife and humans. *Livestock Science* 130(1-3): 41-46. DOI:10.1016/j.livsci.2010.02.009
- GUZMÁN, C. & C. CAMPOS. 2004. Indicadores de contaminación fecal en biosólidos aplicados en agricultura. *Universitas Scientiarum* 9(1): 59-67.
- HERNÁNDEZ-RUBIO, M. C., T. C. FRAUSTO-ILLESCAS & G. FIGUEROA-LUCERO. 2016. Ontogenia temprana de *Pobiana letholepis* (Actinopterygii: Atherinopsidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(3): 1118-1123 DOI:10.1016/j.rmb.2016.06.002
- HO, M. H., C. K. HO & L. Y. CHONG. 2006. Atypical mycobacterial cutaneous infections in Hong Kong: 10-year retrospective study. *Hong Kong Medical Journal* 12(1): 21-26.
- JENNINGS, G. J., R. A. HAJJEH, F. Y. GIRGIS, M. A. FADEEL, M. A. MAKSOUD, M. O. WASFY, N. EL-SAYED, P. SRIKANTIAH, S. P. LUBY, K. EARHART, F. J. MAHONEY. 2007. Brucellosis as a cause of acute febrile illness in Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101(7): 707-713. DOI:10.1016/j.trstmh.2007.02.027
- JONES, K. E., N. G. PATEL, M. A. LEVY, A. STOREYGARD, D. BALK, J. L. GITTLEMAN & P. DASZAK. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451(7181): 990-993. DOI:10.1038/nature06536
- KANG, S. I., M. HER, J. W. KIM, J. Y. KIM, K. Y. KO, Y. M. HA & S. C. JUNG. 2011. Advanced Multiplex PCR Assay for Differentiation of *Brucella* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 77(18): 6726-6728. DOI:10.1128/aem.00581-11
- KIEL, F. W. & M. KHAN. Y. 1993. Brucellosis among Hospital Employees in Saudi Arabia. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 14(5): 268-272. DOI:10.1086/646733
- LAPERCHE, S. 2011. Definition of emerging infectious diseases. *ISBT Science Series* 6(1): 112-115. DOI:10.1111/j.1751-2824.2011.01452.x
- LEHANE, L. & G. T. RAWLLN. 2000. Topically acquired bacterial zoonoses from fish: a review. *Medical Journal of Australia* 173(5): 256-259.
- LIRA-GUERRERO, G., L. GARCÍA-PRIETO & G. PÉREZ-PONCE DE LEÓN. 2008. Helmintos parásitos de aterinópsidos de agua dulce (Osteichthyes: Atheriniformes) del centro de México. *Revista mexicana de biodiversidad* 79(2): 325-331.
- LÓPEZ-GOÑI, I., Y. D. GARCÍA, C. M. MARÍN, M. J. DE MIGUEL, C. E. BARQUERO, V. C. GUZMÁN & B. B. GARIN. 2011. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol* 154(1): 152-155.
- MEYER, F. P. & G. L. BULLOCK. 1973. *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Applied Microbiology* 25(1): 155-156.
- MILLER, R. R. 1986. Composition and derivation of the freshwater fish fauna of Mexico. *Anales Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, México* 30: 121-153.
- MORENO-NAVARRETE, R. G. & R. AGUILAR-AGUILAR. 2013. Helminth parasites of the alchichica silverside *Pobiana alchichica* (Atheriniformes: Atherinopsidae) from the Alchichica Crater-Lake, Central Mexico. *World Journal of Zoology* 8(1): 52-54.
- MORENO, E., A. CLOECKAERT, I. MORIYON. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology* 90(1): 209-227.
- NAMIDURU, M., K. GUNGOR, O. DIKENSOY, I. BAYDAR, E. EKİNCİ, I. KARAOGLAN, N. A. BEKİR. 2003. Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. *International Journal of Clinical Practice* 57(1): 20-24.
- O'CALLAGHAN, D. & A. M. WHATMORE. 2011. *Brucella* genomics as we enter the multi-genome era. *Briefings in Functional Genomics* 10(6): 334-341. DOI:10.1093/bfgp/elr026
- OIE (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH). 2004. Bovine brucellosis. In: OIE (ed.). *Manual of the Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Office International Des Epizooties, Paris, France, pp. 782.
- OSTERMAN, B. & I. MORIYÓN. 2006. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56(1): 1173-1175.
- PAL, D. & C. D. GUPTA. 1992. Microbial Pollution in Water and Its Effect on Fish. *Journal of Aquatic Animal Health* 4(1): 32-39. DOI:10.1577/1548-8667(1992)004<0032:mpiwai>2.3.co;2
- PALUMBO, S. A., F. MAXINO, A. C. WILLIAMS, R. L. BUN & D. W. THAYER. 1985. Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 50(4): 1027-1030.
- PAPPAS, G. 2010. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36: S8-S11. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.013
- PAPPAS, G., P. PAPADIMITRIOU, N. AKRITIDIS, L. CHRISTOU & E. V. TSIANOS. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* 6(2): 91-99. DOI:10.1016/s1473-3099(06)70382-6
- PEDLEY, S. & K. POND. 2003. *Emerging issues in water and infectious disease*. WHO, France. 1690 p.
- PLÁCERES, A. 1923. Estudios bacteriologicos y serologicos In: Silva R. (ed.). *Contribución al estudio de la bibliografía mexicana sobre la brucellosis*. Primera Reunión Interamericana de la Brucellosis: Hospital General de México, D.F, pp. 1948.
- QUINN, P. J., B. K. MARKEY & G. R. CARTER. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby, London. 6 p.

- SALEM, S. F. & A. MOHSEN. 1997. Brucellosis in fish. *Veterinarni Medicina* (Praha) 42(1): 5-7.
- SEMARNAT (SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES). 2010. *Norma Oficial Mexicana NOM 059-ECOL-2010. Protección Ambiental. Especies Nativas de México de flora y fauna silvestres, Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio de lista de especies en riesgo*. Diario Oficial de la Federación, México. Marzo 6: 78.
- SCHOLZ, H. C., A. L. DAHOUK, H. TOMASO, H. NEUBAUER, A. WITTE & M. SCHLOTER. 2008. Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum-Brucella* group by *recA* and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. *Syst Appl Microbiol* 31: 1-16. DOI: 10.1016/j.syapm.2007.10.004
- SCHOLZ, H. C., K. MUHLDORFER, C. SHILTO, S. BENEDICT, A. WHATMORE, J. BLOM & T. EISENBERG. 2016. The Change of a Medically Important Genus: Worldwide Occurrence of Genetically Diverse Novel *Brucella* Species in Exotic Frogs. *PLoS ONE* 11(12): e0168872. DOI:10.1371/journal.pone.0168872
- SHELL, S. M., E. K. HAWKINS, M. S. TSAI, A. S. HLAING, C. J. RIZZO & W. J. CHAZIN. 2013. *Xeroderma pigmentosum* complementation group C protein (XPC) serves as a general sensor of damaged DNA. *DNA Repair* 12(11): 947-953. DOI:10.1016/j.dnarep.2013.08.013
- VALENZUELA-SÁNCHEZ, A. & G. MEDINA-VOGEL. 2014. Importancia de las enfermedades infecciosas para la conservación de la fauna silvestre amenazada de Chile. *Gayana (Concepción)* 78(1): 57-69. DOI:10.4067/s0717-65382014000100008
- YAGUPSKY, P. 1999. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *Journal of clinical microbiology* 37(11): 3437-3442.
- WEINSTEIN, M. R., M. LITT, D. A. KERTESZ, P. WYPER, D. ROSE, M. COULTER & D. E. LOW. 1997. Invasive Infections Due to a Fish Pathogen, *Streptococcus iniae*. *New England Journal of Medicine* 337(9): 589594. DOI:10.1056/nejm199708283370902
- WHATMORE, A. M., K. K. GOPAUL, M. KOYLASS, A. LAWRIE, J. MUCHOWSKI, E. DALE & M. JONES. 2015. Isolation of *Brucella* from a White's tree frog (*Litoria caerulea*). *JMM Case Reports* 2(1): 1-5. DOI:10.1099/jmcr.0.000017
- WOOLHOUSE, M. E. J. & S. GOWTAGE-SEQUERIA. 2005. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 11(12): 1842-1847. DOI:10.3201/eid1112.050997
- WOOLRICH-PÍÑA, G. A., G. R. SMITH, J. A. LEMOS-ESPINAL, R. MONTOYA-AYAL, L. E. AVILA-BOCANEGRA & E. BENAVIDES-GARDUÑO. 2012. Temporal variation in the abundance of *Poblana alchichica* in near-shore habitat of the high elevation lake, Lago de Alchichica, Puebla, México. *Acta biológica colombiana* 17(1): 205-210.