

AISLAMIENTO Y DETECCIÓN DE *BRUCELLA* SP. (PROTEOBACTERIA) EN *SCELOPORUS MEGALEPIDURUS* (LAGARTIJA ESPINOSA CORREDORA DE VIENTRE BLANCO) DE LA CUENCA ORIENTAL, PUEBLA, MÉXICO

ISOLATION AND DETECTION OF *BRUCELLA* SP. (PROTEOBACTERIA) IN *SCELOPORUS MEGALEPIDURUS* (WHITE BELLIED CURSORIAL SPINY LIZARD) FROM THE EASTERN BASIN, PUEBLA, MEXICO

JUAN RICARDO CRUZ-AVIÑA^{1,2*}, CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ-GONZALEZ², EMYR SAUL PEÑA-MARÍN², ELSA IRACENA CASTAÑEDA-ROLDÁN³ & GABRIEL BARRIOS-QUIROZ⁴

¹Universidad Tecnológica de Calakmul, Departamento de Recursos Naturales, Carr Xpujil-Dzibalchen Km. 2+260, Xpujil, Calakmul CP 24640, Campeche, México.

²Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. DACBIOL. Laboratorio de Acuicultura Tropical, Carretera Villahermosa-Cárdenas km 0.5, Villahermosa, Tabasco, 86139, México.

³Posgrado en Ciencias Ambientales, CICM, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Jardines de San Manuel, 72570, Puebla, México.

⁴Centro de Investigación y Experimentación de Alternativas Agroecológicas CIEA S. C., Fresnos 52 Edif. F 501 Col. Santa Úrsula Coapa, 04650, Coyoacán, CDMX.

*Correspondence: ambystomag@hotmail.com

Received: 2020-07-09. Accepted: 2021-01-02.

Abstract.—Brucellosis is a zoonosis that affects humans, livestock, and wildlife. Currently, 14 species of the genus *Brucella* are recognized, some of them have been reported in marine mammals, fish and amphibians. However, its role in wild herpetofauna is currently unknown. In recent years, in the Mexican Eastern Basin, *Brucella* sp. was detected in agricultural soil and water samples from the Crater Lakes, so it was speculated whether *Brucella* had the ability to infect lacertilian *Sceloporus megalepidurus*. Between February 2014 and April 2015, 75 specimens of *Sceloporus megalepidurus* were collected in the crater lake region of central Mexico. An experiment was designed in triplicate, by performing the soft tissue-derived agar-plate isolation; identification was made using standard microbiological tests. It was compared by PCR with the reference vaccine strains (BM16 and BS19). *Brucella* sp. was isolated in adults (40%) of the studied samples, the microbiological profiles were comparatively similar with the reference strains and the specific gene for the *Brucella* genus, *bp26* was amplified with 1029 bp. This is the first report of isolation and identification for *Brucella* in a native Mexican lizard. These data may be a useful tool to improve understanding of the pathogenesis and virulence of the genus *Brucella* in the wild and its potential effect on wildlife, as new reservoirs of the disease.

Keywords.—Axalapazcos, brucellosis, emerging diseases, herpetozoonosis.

Resumen.— La brucelosis es una zoonosis que afecta al humano, al ganado y fauna silvestre, la cual se ha ido expandiendo hacia nuevos reservorios. Se reconocen actualmente 14 especies reportadas para mamíferos marinos, peces y anfibios; sin embargo, actualmente se desconoce su papel en la saurofauna silvestre mexicana. En los últimos años, en la Cuenca Oriental Mexicana, se

detectó a *Brucella* sp. en muestras de suelo agrícola y en el agua de los Lagos Cráter, por lo que se especula si *Brucella* sp. tiene la capacidad de infectar algún lacertilio nativo. Entre febrero del 2014 y abril del 2016, se colectaron 75 ejemplares de *Sceloporus megalepidurus*. Se diseñó un experimento, realizando el primoaislamiento en placa-de Agar derivado de muestras de tejido blando, la identificación se planteó mediante las pruebas microbiológicas estándar. Se comparó por PCR, con las cepas vacunales de referencia (BM16 y BS19). Se aisló a *Brucella* sp. en ejemplares adultos con (40%) de positivos de las muestras estudiadas, los perfiles microbiológicos resultaron comparativamente idénticos con las cepas de referencia, se amplió el gen específico para el género *Brucella*, *bp26* con 1029pb. Este es el primer reporte de aislamiento e identificación para *Brucella* en un lacertilio nativo mexicano. Estos datos pueden ser una herramienta útil para mejorar la comprensión sobre la patogénesis y virulencia del género *Brucella* en el medio natural y su efecto potencial en la fauna silvestre, así como nuevos reservorios de la enfermedad.

Palabras clave.— Axalapascos, brucelosis, enfermedades emergentes, herpetozoonosis.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, nuevos patógenos zoonóticos emergen (Laperche, 2011) derivados principalmente de la fauna silvestre, los cuales generan problemas en la salud pública y la biodiversidad local (Cabello & Cabello, 2008), derivado de las malas prácticas agrícolas, así como del manejo de animales domésticos, como vacas, cabras y otros (Gummow, 2010), pero la dinámica, ecología y mecanismos de acción, prevalencia, sobrevivencia, de este tipo de patógenos sigue siendo poco conocida (Cleaveland et al., 2001; Woolhouse et al., 2005; Valenzuela-Sánchez & Medina-Vogel, 2014; Whatmore et al., 2015).

Desde hace varios años se ha observado una rápida y constante disminución en las poblaciones de herpetofauna

en todo el mundo, llegando al grado de que un 40% de las especies descritas se encuentran en algún grado de amenaza, incluyendo poblaciones nativas en Áreas Naturales Protegidas (Pechmann & Wilbur, 1994; Houlahan et al., 2000; Alford et al., 2001; IUCN 2019). Las principales causas son la pérdida de hábitat, la sobreexplotación de acuíferos, las especies invasoras introducidas, el cambio climático, la contaminación ambiental y las nuevas enfermedades zoonóticas (Young et al., 2001; Heatwole, 2013). La brucelosis es una también una enfermedad zoonótica emergente (EZE), que tiene un impacto significativo en la salud y la economía de comunidades rurales, en muchas partes del mundo (Cabello & Cabello, 2008; Whatmore et al., 2015). En México, existe un notable incremento en el impacto de las EZE, que se tiene documentadas para humanos y animales de granja; sin embargo, se desconoce cómo esta enfermedad pueda afectar a la fauna silvestre local (Jones et al., 2008; Bulman & Lamberti, 2011).

Brucella es un género de bacterias Gram negativas, aerobias, inmóviles, no esporuladas, capaz de sobrevivir fuera del ambiente celular, en otros medios, por ejemplo, en agua embotellada (2 meses, pH= 8 y 20°C), en agua mineral (hasta 58-72 días, pH 8.0-8.3, 20°C) (Falenski et al., 2011) y ahora sabemos que hasta 200 días en agua natural de los lagos Cráter: Alchichica, Atexcac, La Preciosa y Quechulac (pH 9-9.3, 15-18°C, 0.5-9.8 o/oo) (Cruz-Aviña et al., 2015). Actualmente, el género *Brucella* comprende 14 especies, de las que el 60% han sido descritas los últimos 25 años, incluyendo la descripción de nuevos hospederos, como la trucha arcoiris (*Onchorynchus mykiss*), el bagre del Nilo (*Clarias gariepinus*), la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y diversas ranas (El-Tras et al., 2010; Pappas et al., 2010; Whatmore et al., 2015; Ramos-Ramírez et al., 2020) por lo que se considera que este género está en expansión hacia nuevos hospederos y nichos (Pappas, 2006; El-Tras et al., 2010; Gelev & Gelev, 2010; O' Callaghan & Whatmore, 2011).

Por su parte *Sceloporus megalepidurus* (Smith, 1934; Fig. 1), es



Figure 1. Specimen of *Sceloporus megalepidurus* in the crater lake Atexcac, Puebla. Photo: Juan Ricardo Cruz Aviña.

Figura 1. Especimen de *Sceloporus megalepidurus* en el Lago cráter Atexcac, Puebla. Foto: Juan Ricardo Cruz Aviña.

una especie de lagartija vivípara endémica de México (Aldama et al., 2007), nativa de la Cuenca Oriental Mexicana (COM) en los límites de los estados de Puebla, Tlaxcala y Veracruz, en el centro de México (Camarillo-Rangel, 1998). La Región de la COM, es una zona con alta prevalencia y alta morbilidad de brucelosis caprina (Herrera et al., 2001; Alcocer et al., 2004; García-Juárez et al., 2014) y de brucelosis humana (*Brucella abortus* y *Brucella melitensis*), entre los habitantes de las comunidades cercanas a estos lagos cráter (Herrera et al., 2001; Arredondo-Figueroa, 2002; Cruz-Aviña et al., 2015; Cruz-Aviña et al., 2017), por lo que se le considera una zona endémica de esta enfermedad (Caron et al., 2011). El advenimiento registrado de la brucelosis en esta zona, fue a partir de las importaciones de cabras Murcianas infectadas, en 1921 (Pláceres, 1921), actualmente se ha aislado a *Brucella* sp. de muestras de suelo y de agua de estos lagos cráter, además de otras especies silvestres como charales, ajolotes y ratones de campo (Castañeda-Roldán et al., 2010; Cruz-Aviña et al., 2015; Cruz-Aviña et al., 2017, Cruz-Aviña et al., 2020). Por lo que el propósito de este trabajo fue, el realizar el aislamiento e identificación de bacterias del género *Brucella* en un lacertilido

nativo (*Sceloporus megalepidurus*), de una zona endémica de brucelosis humana y de ganado caprino, reconociéndose a los reptiles como una extensión del nicho ecológico y hospederos para el género *Brucella*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Entre febrero del 2014 y abril del 2016, se recolectaron conforme a Heyer et al., (1994), 75 ejemplares de *S. megalepidurus* (45 hembras, 15 machos y 15 juveniles) en la ribera de los lagos cráter La Preciosa y Atexcac (19°20'-19°22' N y 97°27'-97°25' W a 2350 m s.n.m.; Fig. 2). Los organismos capturados fueron colocados en cámaras de plástico con anestesia hasta provocar la inconsciencia y expiración (Dolensek, 1971; Martínez & Ramis, 2012). Posteriormente fueron puestos en hielo para su transporte ($t \leq 3$ h) y trasladados para su análisis respectivo en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana (LPB) del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) en

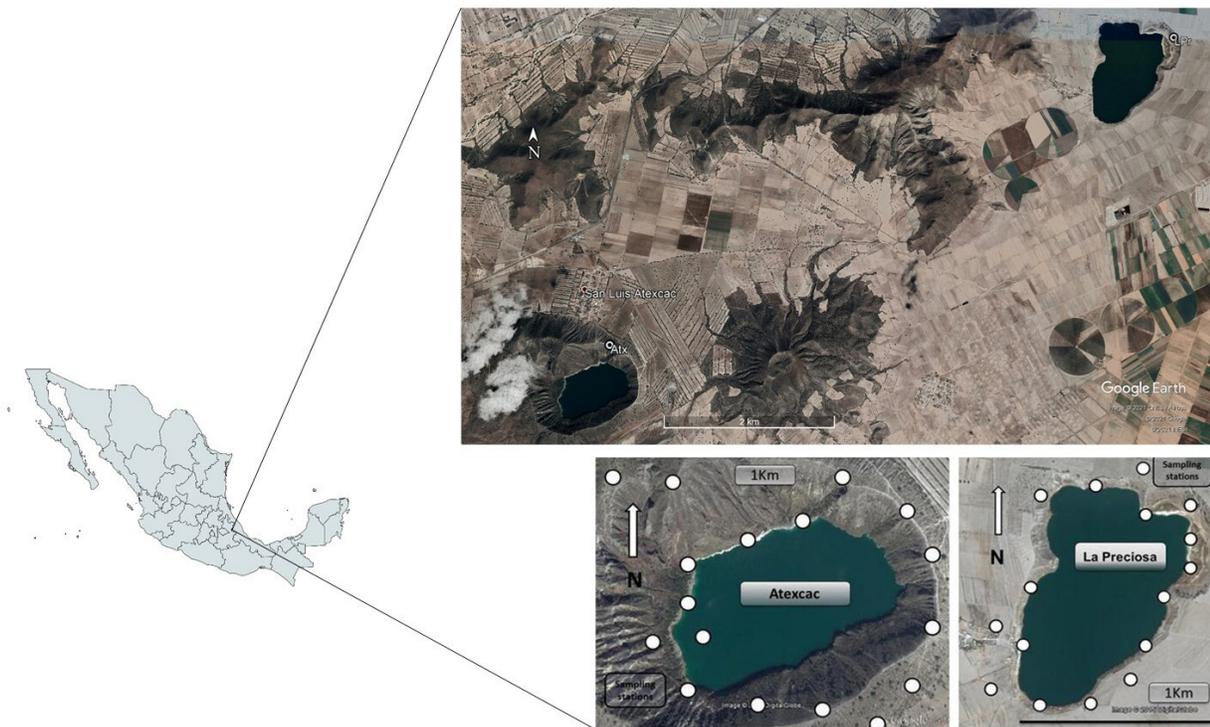


Figure 2. Study site: Shoreline of the crater lakes La Preciosa and Atexcac, Puebla, the circles show the collection sites for *S. megalepidurus* GPS Garmin XL12. Images taken from Google Earth, 2015.

Figura 2. Sitio de estudio: Ribera de los lagos cráter La Preciosa y Atexcac, Puebla, los círculos muestran los lugares de colecta de *S. megalepidurus* GPS Garmin XL12. Imágenes tomadas de Google Earth, 2015.

la Ciudad de Puebla, México. Los ejemplares estudiados se encuentran actualmente depositados en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR) en el Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México con números de catálogo (CNAR: 28199-28274).

Métodos bacteriológicos

De los ejemplares de *S. megalepidurus* colectados, se obtuvieron muestras serológicas y se practicaron las pruebas de rutina estándar, conforme a Alton et al., (1976) y Alton et al., (1988); posteriormente se tomaron muestras de tejidos y de órganos internos por separado (hígado, riñón, bazo y placenta) para cada organismo (Dolensek, 1971; Jacobson, 2007). Estos se maceraron con solución (Ringer lactato) y se sembraron en placas de Petri Agar con medio BRUCELLA-BUAP® (Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, CICM, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, 2015), medio específico para *Brucella* sp. y cristal violeta (Alton et al., 1976; Eisenberg et al., 2012), a las colonias cultivadas se realizaron pruebas de microbiología estándar conforme a lo establecido por Alton et al., (1976). Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 h con una atmósfera de CO₂ al 5 % (Alton et al., 1988) para el primoaislamiento (cepas número BMS001-BMS0018 de *S. megalepidurus*) del Banco de Cepas de *Brucella* del LAB- CICM-BUAP. Los primoaislamientos se sembraron y se separaron durante las siguientes 8-24 h, posteriormente se realizaron pruebas de tinción de Gram y de actividad metabólica (TSI, LIA, URE, CIT, MIO, OXI, CAT, RM-VP, H₂S, HEMOL) y curva de crecimiento (Alton et al., 1976 y Alton et al., 1988). Se realizaron pruebas estándar de rutina para diagnóstico por sensibilidad a diferentes tintes colorantes de anilina: Tionina (115929 Merck Millipore) a las diluciones 1:100,000, 1:50,000 y 1:25,000, Fucsina (115937 Merck Millipore) a una dilución 1:10,000, Safranina (115948 Merck Millipore) a una dilución de 1:10,000 (Alton et al., 1976; Alton et al., 1988). Se calculó el total de resultados positivos obtenidos para *Brucella* sp. derivados de los cultivos. Los primoaislamientos cultivados se separaron durante las siguientes 8 a 24 h y se sembraron en el medio BrucellaBUAP® bajo las condiciones anteriormente descritas. Posteriormente se les realizaron las pruebas (SAT), 2-β-mercaptoetanol (2BME), y Serion ELISA classic Brucella IgG/IgM/IgA. Estos se llevaron a cabo en el depósito y comparativamente con los controles positivos de cepas vacunales de *Brucella*, Rev-1 y M16 (Yagupsky, 1999 y Alton et al., 1988).

Test rosa de Bengala.- El antígeno (3.0 mL cada uno) se mezcló en una placa de vidrio esmerilada. La mezcla se agitó suavemente en un balancín durante 5 min. La aglutinación visible se consideró positiva (Alton et al., 1988; OIE, 2004). Sueros de control positivo

y negativo y Antígeno de rosa de Bengala.

Test de Rivanol. - El antígeno de Rivanol *Brucella* y la solución de Rivanol fueron obtenidos en el Laboratorio de Patología del CICM-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, luego se dejó reposar durante 5-60 minutos y finalmente 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 se mantuvieron durante 6 min bajo cubierta para evitar la evaporación, 6 min después las placas, fueron rotadas de nuevo. La aglutinación completa a la 1:25, fue considerada positiva (Quinn et al., 1994). Finalmente, se realizó extracción y purificación de ADN genómico bacteriano, Kit comercial QIAamp Tissue kit (QiaGen Inc, Valencia, CA) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (QiaGen, 2009). Los pellets bacterianos fueron resuspendidos en la solución ATL, luego para provocar la lisis y digerir las proteínas se añadió 200 µg de Proteinasa K y la solución AL incubándose las muestras a 65°C-70°C por 1 h. Luego de añadir etanol absoluto (Merck, CAS No. 64-17-5, EC Number 200-578-6) se colocó las muestras en las columnas de purificación. Después de lavados de las columnas, se eluyó el ADN genómico en 100 µL de agua tridestilada. La integridad del ADN se confirmó en 1.5% de gel agarosa, mientras que la pureza y concentración se determinó y calculo mediante espectrofotómetro NanoDrop 2000, Thermo SCIENTIFICMR a 260 y 280 nm (Sambrook et al., 1989).

Análisis molecular

Se realizaron corridas de PCR con el ADN bacteriano (Genomic DNA purification Kit, Fermentas life Science) conforme al Manual de Laboratorio de Clonación Molecular y las instrucciones del fabricante (Sambrook et al., 2001), buscando la amplificación del gen *bp26/IS711* que es específico del género *Brucella* (Cloeckaert et al., 2000). El gen *bp26* codifica la proteína BP26 (Omp28) que es un antígeno inmunodominante en la infección de *Brucella* sp. en fauna silvestre y humanos.

Los oligonucleótidos utilizados fueron conforme a Cloeckaert, (2000): Oligo 1: 5'GCCCTGACATAACCCGCTT3'y Oligo 2: 5'GAGCGTGACATTGCGATA3'. Las cepas de referencia empleadas como controles positivos fueron B. S19 (carril 1), B. M16 (carril 2) y como control negativo se utilizó una cepa de referencia de *Escherichia coli* (carril 3), la muestra problema del estudio se situó en la (carril 4). Se utilizó un termociclador MultiGene Optimax con ciclos: (95 °C) 07', (95 °C) 35", (64 °C) 15", (72 °C) 03' Rep 35 ciclos, (07 °C) 06', (04 °C) indefinido. Los

productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.3% (p/v) y se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) 15". Se observaron las bandas de amplificación del gen *bp26* en un transiluminador de rayos UV marca Spretoline, las fotografías de los geles fueron tomadas con un equipo marca Kodak Edas.

RESULTADOS

Análisis Microbiológico y Primoaislamiento.— De las 75 muestras analizadas de *S. megalepidurus* para primoaislamiento de *Brucella*, se obtuvieron 40 resultados positivos solo de los ejemplares adultos (66%), con un radio de infección aproximado por sexo de 2:1 a favor de las hembras (25 hembras y 15 machos), estas se resembraron por triplicado, posteriormente se examinaron a las 48 horas y el (40%) del total (24 ejemplares, todas hembras) fueron positivas a las pruebas de diagnóstico de rutina para brucelosis: rosa de Bengala, tinción de Gram, Rivanol, SAT y 2ME (Tabla 1). Las muestras restantes de este estudio (15 ejemplares juveniles), resultaron negativos o indeterminados, con un bajo porcentaje en concentraciones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en rango de 1x10⁶ hasta 1x10¹⁰.

Actividad metabólica.— CO₂ independiente. No produjo H₂S, Mostró crecimiento positivo en presencia de fucsina básica y de tionina, positivo para safranina e hidrolizó de manera normal la urea.

Detección por PCR.— Se obtuvo la ampliación del gen *bp26* con longitud de 1029 pb (carril M, marcador molecular) de las muestras problema del ADN bacteriano purificado (carril 4) y se les comparó con los controles positivos B. M16 (carril 1), B. S19 (carril 2) y ADN de *E. coli* (carril 3) como control negativo (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Las nuevas infecciones por *Brucella* se han documentado en todo el mundo en una amplia variedad de mamíferos silvestres (Godfroid, 2002; Eisenberg et al., 2017). Se han reportado también casos de brucelosis en mamíferos marinos (Foster et al., 2007), además de peces de agua dulce (Wael et al., 2010, Eisenberg et al., 2016, Ramos et al., 2020). En el periodo de 2012-2017 ya se consideraron algunas ranas como hospederos de éste género bacteriano (Eisenberg et al., 2012; Fischer et al., 2012; Whatmore et al., 2014; Mühlendorfer et al., 2017). Hasta la fecha no se tenía el registro en el mundo de casos para los reptiles, aunque al extenderse el rango del genero *Brucella* hacia otros grupos taxonómicos diferentes a los mamíferos, se abría esa posibilidad (Moreno et al., 2002; Pappas, 2010; Eisenberg et al., 2012). Eisenberg et al., (2012) también reportan el crecimiento de sus aislados bacterianos para la rana toro, *Pyxicephalus edulis*, en placa de Petri Agar (Agar Gassner®, Oxoid, Alemania y Agar Brucella®, Merck, Alemania) en un ambiente atmosférico aeróbico con, o sin cristal violeta.

En contraste con esta investigación, los aislados bacterianos de *Brucella* sp. en placa de Petri Agar selectivo con (BRUCELLA-BUAP®) crecieron mejor en un ambiente con 5% de CO₂ y cristal violeta más antibióticos. Conforme a Alton et al., (1988), los resultados de Corbel (2006) y de Eisenberg et al., (2012) demuestran un comportamiento diferente de sus cepas de resiembra de *Brucella* sp. a las brucelas clásicas o tradicionales. Por su parte Shahzad et al., (2017) realizaron un estudio en varios taxones de Pakistán usando la prueba de rosa de Bengala (RB, n=117), donde incluyeron aves de corral (pavos, pavos reales, guineas, patos y paloma azul) y especies silvestres de anfibios y reptiles (serpiente ratonera oriental *Ptyas mucosus*, serpiente

Table 1. Comparative table of routine diagnostic biochemical tests for *Brucella* sp. vs MM isolated from adult organisms (male and female) of *S. megalepidurus*. The remaining samples of this study were negative (in juveniles) or indeterminate to these tests with a low percentage in concentrations of Colony Forming Units (CFU) from 1x10⁶ to 10¹⁰. Taken and modified from De Alton et al. (1988), Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis (1986), Whatmore (2009), y Whatmore et al. (2014).

Tabla 1. Cuadro comparativo de las pruebas bioquímicas de diagnóstico de rutina para *Brucella* sp. vs aislado de MM de organismos adultos (machos y hembras) de *S. megalepidurus*. Las restantes muestras de este estudio resultaron negativas (en juveniles) o indeterminados a estas pruebas con un bajo porcentaje en concentraciones de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de 1x10⁶ hasta 10¹⁰. Tomado y modificado de De Alton et al. (1988), Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis (1986), Whatmore (2009), y Whatmore et al. (2014).

Cepa de Referencia	Biotipo	Apariencia	Oxi	CO ₂	H ₂ S	Urea	Tionina	Safra	Fucsina
<i>B. melitensis</i> 16 M ATCC 23456 NCTC 10094	Biotipo 1	S	(+)	(-)	(-)	V	(+)	(+)	(+)
MM de <i>S. megalepidurus</i>		S	(+)	(-)	(-)	V (24h)(+)	(+)	(+)	(+)



Figure 2. Agarose gel results from PCR for the detection of *Brucella* genus, amplification of the bp26 gene with 1029 bp. Lane M, Molecular Weight DNA Marker, Lanes 1 and 2, *Brucella* S19, *Brucella* M16, Lane 3, *E. coli* DNA negative control, Line 4, sample sample, bacterial DNA derived from MM of adults *S. megalepidurus*.

Figura 2. Resultados en gel agarosa del PCR para la detección de género *Brucella*, amplificación del gen bp26 con 1029 pb. carril M, Marcador de ADN de peso molecular, Carriles 1 y 2, *Brucella* S19, *Brucella* M16, Carril 3, control negativo ADN de *E. coli*, Línea 4, muestra problema, ADN bacteriano derivado de MM de ejemplares adultos de *S. megalepidurus*.

lobo *Lycodon aulicus* y tortuga del barro de manchas amarillas, *Geoclemys hamiltoni*), en donde *Geoclemys hamiltoni* fue el único reptil seropositivo para anticuerpos de *Brucella*, ($n=31$; 32.3%). Cabe señalar que en dicho estudio no se hicieron pruebas confirmatorias, ni metabólicas, ni moleculares, sin embargo; el estudio es relevante ya que deducen la infección vertical o de interfaz entre los taxones, por el estiércol de animales de granja enfermos, conforme a lo reportado también por (Scholz et al., 2009; Aune et al., 2011, Cruz-Aviña et al., 2015; Cruz-Aviña et al., 2017) donde refieren que *Brucella* es capaz de sobrevivir ambientalmente por años, en materia fecal, suelo y agua natural.

Con respecto a la detección de anticuerpos, esto no es novedoso, anteriormente Maung (1963) ya había realizado experimentos *in vitro* con la tortuga griega, *Testudo graeca* ibera inoculándola con *B. abortus*, generando infección y por ende identificando anticuerpos. Posteriormente, Fiebig (1972) obtuvo resultados similares con la tortuga rusa, *Testudo horsfieldii*, por lo que se infería que el grupo de los testudines es un potencial hospedero de esta zoonosis. Del mismo modo, existen estudios que describen el aislamiento de *Brucella inopinata* y bacterias cocoides parecidas a *Brucella* móviles de ranas toro africanas, *Ptychocheilus edulis* y de la rana arbórea blanca, *Litoria caerulea*, respectivamente (Dominik et al., 2012; Eisenberg et al., 2012;

Whatmore et al., 2015).

Para este estudio, los resultados de las pruebas de rutina y metabólicas son cercanos a *Brucella melitensis* Var 1 (Corbel, 2016). Sin embargo; con fines prácticos, se limitó en este trabajo a reportarlo a nivel de género. Lo anterior concuerda con lo reportado por Castañeda-Roldán et al., (2005) para suelo y por Cruz-Aviña et al., (2015) para agua de los lagos cráter de esta zona. En contraparte, Castañeda-Roldán et al., (2005) demostraron contaminación en suelo en un área cercana a estos lagos cráter (Emilio Portes Gil, municipio de San Nicolás Buenos Aires), por lo que la infección por el sustrato es factible, ya que el suelo es reservorio de *Brucella* hasta por 80 días, adicionalmente otras especies de *Brucella* han sido aisladas del suelo y se han relacionado con procesos infecciosas en fauna silvestre (Pappas, 2010). En otro orden de ideas, con respecto a la afinidad sexual de *Brucella* por las hembras adultas resultado de este estudio, se debe señalar que existen reportes para hembras silvestres con radio 2:1, como el caso de la rana toro de Tanzania, los zorros rojos en Austria, y los armadillos de Argentina (Eisenberg et al., 2012; Hofer et al., 2012; Kin et al., 2014). Es de resaltar que, en organismos ungulados, también existe una mayor afinidad por las hembras, mismo caso que en humanos (Salem & Mohnsen, 1997; Pappas et al., 2006; Pappas, 2010).

Por otra parte, en correspondencia, los datos de la prueba de 2-ME que detecta las IgG1 y la IgG2 en mamíferos (en este caso su correspondiente ortólogo es IgY en reptiles), demuestran que estas inmunoglobulinas se encuentran *a posteriori* a la infección y pueden persistir durante un largo período de tiempo (Godfroid et al., 2011). Sin embargo, como lo refieren Jaffredo et al., (2006), la mayoría de los reptiles sintetizan dos clases de anticuerpos diferentes, uno de alto peso molecular que es el equivalente del IgM sérico y otro de bajo peso molecular llamado IgY que sería el caso de este trabajo. En contraste, Jacobson & Origi (2002); Gambon-Deza et al., (2007); Jacobson, (2007); y Zhang et al., (2017), coinciden en que los ensayos serológicos, son una herramienta poderosa para diagnóstico de infecciones emergentes en reptiles, pero también reconocen, el gran vacío que existe en la información básica al respecto, por lo que estos datos son importantes como aporte al conocimiento del sistema inmunológico, en reptiles vivíparos de altura, que presupone relaciones evolutivas, de complemento o redundantes (Scholz et al., 2016). Por lo que se propone hacer más pruebas en un futuro, al respecto.

En la fase aguda de la infección del organismo, existe una excreción elevada de *Brucella* sp. en el medio ambiente que puede perdurar hasta 18 semanas (Bathke, 1981). Además, la transmisión

de la brucelosis en los animales rumiantes ocurre a través de la excreción de materiales contaminados del aparato genital femenino (placenta, mortinatos, fluidos, etc.), constituyendo la principal forma de transmisión infectiva a otros animales y al hombre en concentraciones incluso del orden de los UFC 1x10¹² (WHO, 1997; Godfroid et al., 2013). Desde luego no existe esta información en reptiles, pero es de importancia señalar que *S. megalepidurus* potencialmente podría tener un rol como reservorio de este género bacteriano, ya que las hembras son vivíparas y presentan una placenta rudimentaria (Godínez, 1985; Méndez de la Cruz y Manríquez, 2014; Scholz et al., 2016), y tanto las crías como la madre no presentan lesiones aparentes, por tanto, la afección por *Brucella* sp. en estas lagartijas sigue siendo incierta, por lo que los siguientes estudios estarán enfocados a conocer la patología. Las pruebas serológicas realizadas en el test de este estudio, demostraron una prevalencia importante de la infección en los ejemplares adultos estudiados de *S. megalepidurus* (40%). Mientras que los juveniles estudiados fueron negativos a las pruebas serológicas o la carga bacteriana es indeterminada, por tanto, es probable que los ejemplares adultos infectados adquirieron a esta bacteria en una edad posterior, o incrementaron su carga bacteriana tal vez después de su primer año de vida, debido a que las hembras positivas a las pruebas de *Brucella* sp. en algunos casos estaban preñadas lo que pudiera estar ligado a eventos de placentación como en otros grupos (Godfroid et al., 2013).

Existe un problema zoonótico importante en esta región, mismo que ha permeado a otros grupos taxonómicos (Cruz-Aviña et al., 2015; Cruz-Aviña et al., 2017), estos resultados aportan información novedosa, reconociéndose a los reptiles como una extensión del nicho ecológico del género *Brucella* como nuevos vectores, anfitriones u hospederos; sin embargo; aún no conocemos su papel ecológico (Scholz et al., 2016; Eisenberg et al., 2017). 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 y nuevas posibilidades epidemiológicas.

Las fuentes contaminadas adquieren una gran importancia epidemiológica, debido a la gran resistencia ambiental del género *Brucella* (Moreno, 2002). Por su parte *B. melitensis* fue reportada en la zona para pastos, suelo, establos, medios de transporte y agua (Castañeda-Roldán et al., 2005; Tiller et al., 2010; Cruz-Aviña, 2013; Cruz-Aviña et al., 2015). Con base en lo anterior, es viable que el suelo como sustrato sea una fuente importante de contaminación para *S. megalepidurus* en esta zona en particular (Castañeda-Roldán et al., 2005; Scholz et al., 2009;

Scholz et al., 2016).

Por su parte, el diagnóstico de la detección de *Brucella* sp. por PCR como herramienta confirmatoria presenta muchas ventajas, por poseer mayor sensibilidad y mayor especificidad que otras pruebas. No obstante el aislamiento y resiembra del patógeno sigue siendo la prueba en el estudio de la brucelosis (Godfroid, 2002; Godfroid et al., 2005) y en el caso de la Organización Mundial para la Salud Animal (OIE) las pruebas de rosa de Bengala (RB) y aglutinación en Placa (SAT) son el estándar para la confirmación de *Brucella* en fauna silvestre (<http://www.oie.int>, 2017). Por su parte Eisenberg et al., (2012) en su trabajo en rana toro amplificaron el gen *bscp31* (IS711) comparándolo con cepas de referencia de *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis* respectivamente. En contraste para este estudio, se utilizó PCR punto final, buscando la amplificación del gen *bp26/IS711* que es específico del género *Brucella* (Cloeckert et al., 2000). El gen *bp26* codifica la proteína BP26 (Omp28) que es un antígeno inmunodominante en la infección de *Brucella* en fauna silvestre y humanos. De acuerdo con la secuencia de genes en el ARNr 16S, el género *Brucella* está categorizado como una proteobacteria (α -2) con relación filogenética con *Agrobacterium*, *Rickettsia*, *Rhizobium* y Rhodobacteraceae (Moreno et al., 2002). La clasificación de las especies de *Brucella* es controvertida porque los estudios de hibridación DNA-DNA han demostrado una alta homología (mayor a un 95%) entre los distintos tipos y especies de *Brucella*. Sin embargo; se tiende a utilizar la taxonomía clásica, considerando las especies y las biovariedades, cuyo eje clasificador es la afinidad por distintos huéspedes, aunque no existe una adaptación absoluta a los mismos (Ortega et al., 2013). A diferencia de lo que sucede con otras bacterias patógenas, la identificación de las distintas especies de *Brucella* no se logra mediante la secuenciación del ARNr 16S (Gee et al., 2004) ni con la amplificación de la región del ADN ribosómico situada entre el 16S y el 23S. (Ortega et al., 2013). Por lo que para este trabajo se optó por la región BP26 (Omp28).

Por otra parte, las cepas de referencia de *B. abortus* S19 y *B. melitensis* M16 son parte importante en los programas gubernamentales de control y erradicación de la brucelosis en el ganado en esta Región, por parte de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), de ahí la importancia de este estudio, además, recientemente se ha reportado su potencial efecto deletéreo en la fauna nativa, como contaminante ambiental en suelo (Almuneef et al., 2004; Castañeda-Roldán et al., 2005; Godfroid et al., 2011; Godfroid et al., 2013; Scholz et al., 2009; Papas, 2010) y agua natural (Cruz-Aviña et al., 2017). Actualmente no hay vacuna disponible para la vida silvestre, ni tampoco vacuna para la brucelosis humana

(Yang et al., 2013). La prevención de la infección ambiental por brucelosis vertical y horizontal depende del control de la enfermedad en el ganado y animales de granja en lo general (WHO, 1997; Azpiri et al., 2000; Pappas et al., 2006). Nuevas especies de *Brucella* pueden emerger y coexistir con las especies tradicionales debido a su capacidad de adaptación a cambios sociales, culturales, viajes y prácticas agropecuarias; es decir a cambios medio-ambientales (Godfroid, 2002; Godfroid et al., 2005; Pappas et al., 2006; Pappas, 2010).

CONCLUSIONES

Se aisló y determinó la presencia de *Brucella* sp. en muestras de tejido por métodos microbiológicos y moleculares, derivado de *Sceloporus megalepidurus* (lagartija corredora de vientre blanco), Puebla, México, con una incidencia del (53%) del primoaislamiento y (40%) de las pruebas confirmatorias y por PCR, en 75 muestras para este estudio. Este es el primer reporte de aislamiento de *Brucella* sp. en un lacertilio nativo de México. Existe un problema zoonótico importante en esta Región, mismo que ha permeado a otros grupos taxonómicos, estos resultados aportan información novedosa, reconociéndose a los lacertilios como una extensión del nicho ecológico del género *Brucella* como nuevos vectores, anfitriones u hospederos.

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que tiene importancia socioeconómica, veterinaria, ecológica en muchas áreas del mundo. Su presencia en especies no target u objetivo es una indicación de su diversificación y de la gama de potenciales hospederos. Esta es también una condición alarmante en un país, donde no hay control o erradicación de brucelosis silvestre. Además, la presencia de brucelosis en reptiles, no solo aumentan el riesgo potencial de dicha enfermedad para el ganado, si, no también para los seres humanos.

Agradecimientos.— Agradecemos al CONACYT por el apoyo financiero de la beca de Posdoctorado del primer autor. Agradecemos la colaboración de las siguientes instituciones: UJAT, CICART, Laboratorio de Acuicultura Tropical, UAM-Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, PEXPA, FES-I UNAM Laboratorio de Limnología Tropical, Dr. Miroslav Macek, y Dr. Jorge Ciro-Pérez; Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR) IBUNAM, Dr. Victor Hugo Reynoso-Rosales y Adriana J. X. González-Hernández; SS Puebla, Departamento de Zoonosis, MVZ Juan Manuel Balderas, habitantes de San Luis Atexcac y San Juan La Muralla, Municipio Guadalupe Victoria, Puebla (Doña Lety, Don Juan, Don Lupe y Don Pedro), Permiso de colecta SEMARNAT 08578/12.

LITERATURA CITADA

- 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. Pp. 57-77. En: Jiménez, B. & L.E. Marín (Eds.), El Agua en México Vista desde la Academia. Academia Mexicana de Ciencias, D.F, México.
- Al Dahouk, S., S. Köhler, A. Occhialini, M.P. Jiménez de Bagüés, J.A. Hammerl, T. Eisenberg & H.C. Scholz. 2017. *Brucella* spp. of amphibians comprise genomically diverse motile strains competent for replication in macrophages and survival in mammalian hosts. Scientific Reports 7:44420-44437.
- Aldama, A., B. Goetsch, J.S. Mainero, M. Tambutti, M., O. Sánchez & R. Medellín. 2007. Método de evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER). INE. México.
- Alford, R.A., P.M. Dixon & J. Pechmann. 2001. Ecology: Global amphibian population declines. Nature 412-499.
- Ali, S., S. Saleem, M. Imran, M. Rizwan, K. Iqbal, G. Qadir & I. Khan. 2018. Detection of *Brucella* antibodies in selected wild animals and avian species in Pakistan. Indian Journal of Animal Research B 799:1-4.
- Almuneef, 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 132:533-540.
- Alton, G.G., M. Jones, C. García-Carrillo & D.M.V.A. Trenchi. 1972. *Brucella melitensis* Rev-1 and *Brucella abortus* Vaccines in Goats: Immunity. American Journal of the Veterinary Research 33:1747-1756.
- Alton, G.G., L.M. Jones & D. Pietz. 1976. Técnicas de laboratorio en la brucelosis. Organización Mundial de la Salud, O.M.S., Génova, Italia.
- Alton, G.G., L.M. Jones, R.D. Angus & J.M. Verger. 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Institut National de la Recherche Agronomique I.N.R.A., Paris, France.
- Arredondo-Figueroa, J.L. 2002. Los Axalapascos de la Cuenca Oriental, Puebla Pp.81-106. En: De la Lanza, G. & J.L. García

- (Eds.), Lagos y presas de México. AGT., México.
- Aune, K., J.C. Rhyon, R. Russell, T.J. Roffe & B. Corso. 2011. Environmental persistence of *Brucella abortus* in the Greater Yellowstone Area. *The Journal of Wildlife Management* 76:253-261.
- Azpíri, S.G., F. Galindo & G. Ceballos. 2000. La importancia del estudio de las enfermedades en la conservación de fauna silvestre. *Veterinaria México* 31:223-230.
- Bathke, W. 1981. Brucelosis. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Editorial Acirbia, Zaragoza, España.
- Bilal, N., J. Ghazi, A.B. Raymond, F.M. Olfat & M. Nariman. 1991. Brucellosis in Asia region of Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal* 12:37-41.
- Bulman, G.M. & J. Lamberti. 2011. Parásitos y enfermedades parasitarias emergentes y reemergentes: Calentamiento global, cambio climático, transmisión y migración de especies evaluación de la participación del hombre. *Veterinaria Argentina* 28:1-15.
- Camarillo-Rangel, J.L. 1998. Observaciones preliminares sobre los anfibios y reptiles de los lagos cráter, Puebla-Veracruz. *Anales del Instituto de Biología UNAM, serie zoología* 69:125-127.
- Caron, A., S. Morand & M. De Garine-Wichatitsky. 2011. Epidemiological interaction at the wildlife/livestock/human interface: can we anticipate emerging infectious diseases in their hotspots? A framework for understanding emerging diseases processes in their hot spots. Pp. 311-332. En: Morand, S., F. Beaudou & J. Cabaret (Eds.), *New frontiers of molecular epidemiology of infectious diseases*. Springer, Berlin, Germany.
- Castañeda-Roldán, E.I., S. Ouahrani-Bettache, Z. Saldaña, F. Avelino, M.A. Rendon, J. Dornand & J.A. Giron. 2006. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. *Cellular Microbiology* 8:1877-1887.
- Castañeda-Roldán, 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* 136:385-393.
- 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* 29:189-200.
- Ceballos, G. & B.P. Ortega. 2011. La sexta extinción: la pérdida de especies y poblaciones en el Neotrópico. Pp. 95-108. En: J., Simonetti & R. Dirzo (Eds.), *Conservación Biológica Perspectivas de Latinoamérica*, Editorial Universitaria. Chile.
- Cleaveland, S., M.K. Laurenson & 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* 356:991-999.
- Cloekaert, A., N. Bernardet, M.S. Koylass, 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* 49:3954-3959.
- Cotruvo, J.A., A. Dufour, G. Rees, J. Bartram, R. Carr, D.O. Cliver & V.P.J. Gannon. 2004. *Waterborne Zoonoses*. Published on behalf of the World Health Organization by IWA Publishing, London, UK.
- Corbel, M.J. 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization in collaboration with the Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organization for Animal Health, WHO, Switzerland.
- Corbel, M.J. 2016. Brucellosis en humanos y animales. Organización Mundial de la Salud, en colaboración con la Organización de las Naciones y la Organización en Salud Animal, Editorial de la OMS, Ginebra, Suiza.
- Corbel, M.J. & W.J. Brinley-Morgan. 1984. Genus *Brucella*. Pp. 377-388. En: N.R. Krieg & J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Cruz Aviña J. R, Álvarez-González, C. A., Peña, E., Castañeda Roldan E. I. (2020). Aislamiento de *Brucella melitensis* en el charal del Lago Cráter La Preciosa *Poblana letholepis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) en el Centro de México. *Hidrobiológica*, 29: 419-427.

- Cruz-Aviña, J.R., Castañeda-Roldán. E.I., S.E. Silva-Gómez. 2017. La problemática ambiental de la Región de los Axalapascos de Puebla: erosión, pobreza, enfermedades emergentes, biodiversidad y etnocultura. Pp. 129-150. En: Rodríguez, H.A.L. (Eds.), El Desarrollo Sustentable, Plaza y Valdés, México.
- Cruz-Aviña, J.R., Silva-Gómez, S.E., Torres-Ramírez, E. & E.I. Castañeda-Roldán. 2017. Transmisión vertical de brucelosis (ganado-humano-vida silvestre) en dos comunidades endémicas de Puebla, México. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias BUAP* 8:11-25.
- Cruz-Aviña, J.R., Castañeda-Roldán, E. I. & M. Macek. 2015. *Brucella* spp. como contaminante potencial en el agua de los Axalapascos de Puebla. Pp. 89-97. En: Alcocer, J. Merino-Ibarra, M & E. Escobar-Briones (Eds.), Tendencias de Investigación en Limnología Tropical, Perspectivas Universitarias en Latinoamérica, CONACYT. México.
- 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. Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas, ICUAP, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Daszak, P. 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 28:443-449.
- Dobson, A. & J. Foufopoulos. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 356:1001-1012.
- Dolensek, E.P. 1971. Necropsy techniques in reptiles. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 159:1616-1617.
- Eisenberg, T., K. Riße, N. Schauerte, C. Geiger, J. Blom & H.C. Scholz. 2016. Isolation of a novel "atypical" *Brucella* strain from a bluespotted ribbontail ray (*Taeniura lymma*). *Antonie van Leeuwenhoek* 110:221-234.
- 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* 141:321-325.
- 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* 145:326-330.
- Ficht, T. 2010. *Brucella*, Taxonomy and evolution. *Future Microbiology* 5:859-866.
- Fiebig, H. 1972. Vergleichende untersuchung der affinität von antihapten antikörpern von vertretern verschiedener wirbeltierklassen. Dissertation, Karl-Marx Universität, Leipzig, Germany.
- Fischer, D., N. Lorenz, W. Heuser, P. Kämpfer, H.C. Scholz & M. Lierz. 2012. Abscesses associated with a *Brucella inopinata*-like bacterium in a big-eyed tree frog (*Leptopelis vermiculatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43:625-628.
- Foster, G., B.S. Osterman, J. Godfroid, I. Jacques & A. Cloeckeaert. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2688-2693.
- Foster, G., A.M. Whatmore, M.P. Dagleish, J.L. Baily, R. Deaville, N.J. Davison & A.C. Brownlow. 2015. Isolation of *Brucella ceti* from a Long-finned Pilot Whale (*Globicephala melas*) and a Sowerby's Beaked Whale (*Mesoploden bidens*). *Journal of Wildlife Diseases* 51:868-871.
- Franco, M.P., M. Mulder, R.H. Gilman & H.L. Smits. 2007. Human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* 7:775-786.
- Gambon-Deza, F., C.S. Espinel & J. Beneitez. 2007. A novel IgA-like immunoglobulin in the reptile *Eublepharis macularius*. *Developmental & Comparative Immunology* 31:596-605.
- García-Juárez, G., J.E. Ramírez-Briebesca, M. Hernández-Vázquez, L.M. Hernández-Calva, E. Díaz-Aparicio & H. Orozco-Bolaños. 2014. Análisis de riesgos de la brucelosis en el estado de Tlaxcala. *Salud Pública de México* 56:355-362.
- García-Yoldi, D. 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* Rev1. *Clinical Chemistry* 52:779-781.

- Gee, J.E., De, B.K., P.N. Levett, A.M. Whitney, R.T. Novak & T. Popovic. 2004. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid confirmatory identification of *Brucella* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 42:3649-3654.
- 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* 269:1-6.
- Godfroid, J., B.B. Garin, C. Saegerman & J.M. Blasco. 2013. Brucellosis in terrestrial wildlife. *Revue Scientifique et Technique International Office des Epizootics* 3:27-42.
- 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.
- Godfroid, J., K. Nielsen & C. Saegerman 2010. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal* 51:296-305.
- Godfroid, J. 2002. Brucellosis in wildlife. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 21:277-286.
- Godínez-Cano, E. 1985. Ciclo reproductivo de *Sceloporus megalepidurus megalepidurus*, Smith (Reptilia:Sauria: Iguanidae), en la parte oriental de Tlaxcala, México. Tesis de Licenciatura, FESI, Universidad Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, México.
- Gorby, G.L. & J.E. Peacock. 1988. *Erysipelothrix rhusiopathiae* Endocarditis: Microbiologic, Epidemiologic, and Clinical Features of an Occupational Disease. *Clinical Infectious Diseases* 10:317-325.
- Gummow, B. 2010. Challenges posed by new and re-emerging infectious diseases in livestock production, wildlife and humans. *Livestock Science* 130: 41-46.
- Guzmán, C. & C. Campos. 2004. Indicadores de contaminación fecal en biosólidos aplicados en agricultura. *Universitas Scientiarum* 9:59-67.
- Heatwole, H. 2013. Worldwide decline and extinction of amphibians. Pp. 259-278. En: Rohde, K. (Eds.), *The balance of nature and human impact*. Cambridge University Press. U.K.
- Heyer, W.R., M.A. Donnelly, R.W. McDiarmid, L.C. Hayek & M.S. Foster. 1994. *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Amphibians*. Smithsonian Institution Press. Washington, USA.
- Hernández, M.G., A. Palacios, J.D. Alfaro & B.R. González. 2013. Wildlife reservoirs of brucellosis: *Brucella* in aquatic environments. *Revue Scientifique et Technique International Office of Epizootics* 32:89-103.
- Herrera, D.M., M.A. Abeledo, M.R. Chessani, J.J. Ruíz, E.R. Romero, E.R., J.V. Maza & J.L. Martínez. J.L. 2001. Prevalencia de brucelosis caprina y su relación con la humana en Tenextepec, Municipio de Perote, Veracruz, México. *Revista de Salud Animal* 23:160-165.
- 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* 10:12-21.
- Hofer, E., F.S. Revilla, S. Al Dahouk, J.M. Riehm, K. Nöckler, M.S. Zygumt & H. C. Scholz. 2012. A potential novel *Brucella* species isolated from mandibular lymph nodes of red foxes in Austria. *Veterinary Microbiology* 155:93-99.
- Houlahan, J.E., C.S. Findlay, B.R., Schmidt, A.H., Meyer & S.L. Kuzmin. 2000. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 404:752-755.
- IUCN, 2019. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2019-2. <https://www.iucnredlist.org> [Consultado en noviembre 2019].
- Invitrogen. 2005. *The Molecular Probes Handbook*. EUA.
- Jacobson, E.R. 2007. *Infectious diseases and pathology of reptiles: color atlas and text*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- Jacobson, E.R. & F. Origgi. 2002. Use of serology in reptile medicine. In *Seminars in avian and exotic pet medicine*. WB Saunders 11:33-45.
- Jaffredo, T., J.S. Fellah, & D. Dunon. 2006. Immunology of birds and reptiles. *eLS* 2001:1-11
- Jennings, G.J., R.A. Hajjeh, F.Y. Girgis, M.A. Fadeel, M.A. Maksoud, M.O. Wasfy, & F.J. Mahoney. 2007. Brucellosis as a cause of acute febrile illness in Egypt. *Transactions of the Royal Society of*

- Tropical Medicine and Hygiene 101:707-713.
- 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* 451:990-993.
- 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* 77:6726-6728.
- Kiel, F.W. & M.Y. Khan. 1993. Brucellosis among Hospital Employees in Saudi Arabia. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 14:268-272.
- Kin, M.S., M. Fort, S.T. De Echaide & E.B. Casanave. 2014. *Brucella suis* in armadillos (*Chaetophractus villosus*) from La Pampa, Argentina. *Veterinary Microbiology* 170:442-445.
- Laperche, S. 2011. Definition of emerging infectious diseases. *ISBT, Science Series* 6:112-115.
- López-Goñi, I., D. García-Yoldi, 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*. *Veterinary Microbiology* 154:152-155.
- Martínez, S.A. & A. Ramis. 2012. Macroscopic pathological anatomy in reptile's pathology of reptiles. *Canis et Felis, España*.
- Maung, H.T. 1963. Immunity in the tortoise, *Testudo ibera*. *Journal of Pathology and Bacteriology* 85:51-66.
- Méndez de la Cruz, F.R. & N.L. Manríquez. 2014. Male Reproductive Cycles in Lizards. Pp. 302-339. En: J.L. Rheubert, D.S. Siegel, S.E. Trauth. (Eds.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Lizards and Tuatara*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Moreno, E., A. Cloeckart & I. Moriyón. 2002. *Brucella* evolution and taxonomy. *Veterinary Microbiology* 90:209-227.
- Mühdorfer, K., G. Wibbelt, C.A. Szentiks, D. Fischer, H.C. Scholz, M. Zschöck & T. Eisenberg. 2016. The role of "atypical" *Brucella* in amphibians: are we facing novel emerging pathogens? *Journal of Applied Microbiology* 122:40-53.
- Namiduru, M., K. Gungor, O. Dikensoy, I. Baydar, E. Ekinci, I. Karaoglan & N.A. Bekir. 2003. Epidemiological, clinical and laboratory features of brucellosis: a prospective evaluation of 120 adult patients. *International Journal Clinical Practice* 57:20-24.
- O'Callaghan, D. & A.M. Whatmore. 2011. *Brucella* genomics as we enter the multi-genome era. *Briefings in Functional Genomics* 10:334-341.
- OIE, World Organization for Animal Health. 2004. Bovine brucellosis. En: *Manual of the Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, Office International Des Epizooties, Paris, France.
- Origgi, F.C. 2007. Reptile immunology. Pp.145-180. En: Jacobson, E. (Eds.), *Infectious diseases and Pathology of Reptiles*. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
- 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: 1173-1175.
- 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* 3:1027-1030.
- Pappas, G. 2010. The changing *Brucella* ecology: novel reservoirs, new threats. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36:S8-S11.
- Pappas, G., P. Papadimitriou, N. Akritidis, L. Christou & E.V. Tsianos. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases* 6:91-99.
- Pechmann, J.H.K. & H.M. Wilbur. 1994. Putting declining amphibian populations in perspective: natural fluctuations and human impacts. *Herpetologica* 50:65-84
- Pláceres, 1921. (reprint). Brucelosis, diagnóstico diferencial, pruebas de laboratorio, En: Ruiz, C. (Eds.), *Métodos de identificación, complicaciones, terapéutica y descripción clínica*. 1986. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México.
- QiaGen Inc. QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA blood Mini Kit Handbook; Dic 2009
- Quinn, P.J., B.K. Markey & G.R. Carter. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wiley, New Jersey, USA.

- Ramos-Ramírez, L. D.C., Saldaña-Ahuactzi, Z., Morales-Lara, L., Martínez-Laguna, Y., & Castañeda-Roldán, E. I. (2020). Aislamiento e Identificación de dos Especies de *Brucella* de un Lago Volcánico en México. *Microbiología actual* 77: 3565-3572.
- Salem, S.F. & A. Mohsen.1997. Brucellosis in fish. *Veterinarni medicina (Praha)* 42:5-7.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- 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* 12:1-11.
- Scholz, H.C., K. Nockler, C. Gollner, P. Bahn, G. Vergnaud, H. Tomaso & B.K. De. 2009. *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60:801-808.
- Scholz, H.C., S. Al Dahouk, H. Tomaso, H. Neubauer, A. Witte & M. Schlöter. 2008. Genetic diversity and phylogenetic relationships of bacteria belonging to the *Ochrobactrum-Brucella* group by recA and 16S rRNA gene-based comparative sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology* 31:1-16.
- Smith, H.M. 1934. Descriptions of new lizards of the genus *Sceloporus* from Mexico and Southern United States. *Transactions of the Kansas Academy of Science* 37:263-285.
- Tiller, R.V., J.E. Gee, M.A. Frace, T.K. Taylor, J.C. Setubal, A.R. Hoffmaster & B.K. De. (2010). Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Applied Environmental Microbiology* 76:5837-5845.
- Valenzuela-Sánchez, A. & G. Medina-Vogel. 2014. Importancia de las enfermedades infecciosas para la conservación de la fauna silvestre amenazada de Chile. *Gayana (Concepción)* 78:57-69.
- 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*). *Journal of Medical Microbiology Case Reports* 2:1-5.
- Whatmore, A.M., N. Davison, A. Cloeckert, S. Al Dahouk, M.S. Zygmunt, S.D. Brew & N.E. Schlabritz-Loutsevitch. 2014. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (*Papio* spp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:4120-4128.
- Whatmore, A.M. 2009. Current understanding of the genetic diversity of *Brucella*, an expanding genus of zoonotic pathogens. *Infection, Genetics and Evolution* 9:1168-1184.
- Woolhouse, M.E.J., & S. Gowtage-Sequeria. 2005. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 11:1842-1847.
- WHO, World Health Organization, 1997. The development of new/improved brucellosis vaccines. WHO/EMC/ZD1/98.14
- Yagupsky, P. 1999. Detection of *Brucellae* in blood cultures. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3437-3442.
- Young, B.E., K.R. Lips, J.K. Reaser, R. Ibáñez, A.W. Salas, J.R. Cedeño, L.A. Coloma, S. Ron, E. La Marca, J.R. Meyer, A. Muñoz, F. Bolaños, G. Chaves & D. Romo. 2001. Population declines and priorities for amphibian conservation in Latin America. *Conservation Biology* 15:1213-1223.
- Zhang, X., R.A. Calvert, B.J. Sutton, & K.A. Doré. 2017. IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biological Reviews* 92:2144-2156

