

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

Brucelas en los Quesos de la Ciudad de México

TESIS QUE PRESENTA
JOSEFINA ALANIS RAMIREZ
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

MEXICO, D. F.
1945



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES,
CARIÑOSAMENTE.

AL SR. DR.

DON JESUS ARROYO.

BRUCELAS EN LOS QUESOS DE LA CIUDAD DE MEXICO

GENERALIDADES

El grupo de micro-organismos llamado genéricamente "Brucela", comprende tres tipos principales.

El primer miembro del grupo, la *Brucela Melitensis*, fué aislada por Bruce, en 1887, de individuos muertos de fiebre de Malta. Habita en las cabras y se le encuentra frecuentemente en la leche de estos animales, hecho que fué descubierto por Zammit, miembro de la Comisión de Fiebre Mediterránea, en 1905. El micro-organismo se localiza en la ubre, bazo y nódulos linfáticos de la cabra. Puede infectar también a otros animales, y se le ha encontrado en la leche de las vacas en Estados Unidos de Norte América, Francia e Italia, y en los fetos abortados por borregos y cabras, en Francia, Italia y Argentina. En el hombre produce la fiebre ondulante. Se encuentra ampliamente distribuída en el mundo.

El segundo miembro del grupo, la *Brucela Abortus*, fué descubierta por Bang, de Copenhague, en 1887. Aisló el organismo de las vacas que sufrían abortos, y por una serie de experimentos, trabajando junto con Stribolt, demostró su papel específico en esta enfermedad. Bang describió este micro-organismo como un bacilo. Se encuentra habitualmente en el ganado vacuno, pero puede infectar a otros animales. En el hombre produce la fiebre ondulante. Está mucho más extendida que la *Brucela Melitensis*, y ha sido encontrada prácticamente en todos los países del Mundo.

El tercer miembro importante del grupo es la *Brucela Suis*, que fué aislada por Traum del feto de un cerdo. Es parásito de los cer-

dos, en los que produce una enfermedad caracterizada frecuentemente por lesiones inflamatorias en los órganos reproductores. Puede ocasionalmente infectar a otros animales. En el hombre produce la fiebre ondulante. Está mucho más extendida que los otros dos tipos; se le encuentra principalmente en los lugares donde hay grandes criaderos de cerdos en el Oeste de Norte América. En Dinamarca se han encontrado cepas de Brucela Suis que difieren un poco del tipo Suis Americano, y se les ha llamado de Tipo Danés. Estas cepas producen muy poco o nada de ácido sulfhídrico, cuando se desarrollan en medios apropiados. El tipo Americano ha sido encontrado ocasionalmente en Europa y reportado de Brasil, Argentina y Australia.

Originalmente Bruce colocó al micro-organismo que él describió, en el grupo de los micro-cocos; Bang llamó al Abortus bacilo, y Traum clasificó al micro-organismo aislado de los cerdos como un bacilo. Después Evans, estudiando juntos el Melitensis y el Abortus, les dió el nombre genérico de "Bacterium" por la poca diferencia que presentaban. Meyer y Shaw hicieron un estudio más amplio y les dieron el nombre genérico de "Brucela", que ha sido aceptado por todos los investigadores para el estudio de estos micro-organismos.

MORFOLOGIA

Los micro-organismos de este grupo se presentan en forma de cocos o de pequeños bacilos. Los cocos se encuentran aislados o en diplococos; son mucho más pequeños que los otros cocos Gram negativos.

Los bacilos son cortos y delgados, con los extremos redondeados.

La Brucela Melitensis tiene casi siempre la forma cocoide, mientras que la Abortus se desarrolla con la forma bacilar.

BRUCELA MELITENSIS.—Su tamaño y forma dependen de la cepa que se examina, de la edad del cultivo, y del medio en el cual se desarrolla. Algunas cepas de brucela Melitensis presentan invariablemente formas cocoides, pero hay otras con formas bacila-

res, aunque muy rara vez. Su longitud varía de 0.4 a 2.2 micras de largo y de 0.4 a 0.8 micras de ancho. Es Gram negativa.

BRUCELA ABORTUS.—Su tamaño y forma es variable, aunque no tanto como en la brucela Melitensis. Además de las formas bacilares puede presentar, en raras ocasiones, formas cocoides. Es Gram negativa.

BRUCELA SUIS.—Tiene forma bacilar, su tamaño varía de 0.6 a 3 micras de largo y de 0.4 a 0.8 micras de ancho. Es Gram negativa.

CULTIVOS

La brucela Melitensis crece en condiciones aerobias y no necesita condiciones especiales para su desarrollo, basta con ponerla en medios apropiados. La brucela Abortus necesita para su desarrollo un diez por ciento de CO_2 , sobre todo cuando se va a aislar de leche, o de alguna otra secreción, pero después de algunas resiembras puede adaptarse a las condiciones atmosféricas ordinarias. La brucela Suis es aerobia y no requiere condiciones especiales para su desarrollo, aunque éste será más rápido si la tensión de CO_2 se aumenta en un diez por ciento.

El desarrollo de cualquiera de las tres especies, en placas de agar-hígado, después de tres días de incubación a 37 grados centígrados, presenta colonias de 2 a 7 milímetros de diámetro, de forma esferoidal, opalescentes y translúcidas, con una apariencia grasosa. Los cultivos viejos de brucela Melitensis y algunos de Abortus, producen un pigmento café que se hace más notable en el cultivo en patata. Se desarrolla bien en gelosa glicerizada. En gelatina el desarrollo es moderado y no la licúa.

Los medios especiales usados para el aislamiento de brucelas, son:

Agar-hígado, Agar-bacto-triptosa, Caldo-hígado, Caldo-bacto-triptosa y la Patata. Su preparación se describe a continuación.

MEDIO AGAR-HIGADO.—El hígado de buey, desprovisto de grasa, se pica finamente hasta obtener una masa plástica; se pone en un matraz medio kilo de hígado y 500 c.c. de agua destilada;

se mezcla bien y se pone al refrigerador por veinticuatro horas; se tapa el matraz y se lleva al autoclave con la llave abierta, durante veinte minutos; se agita para hacer homogénea la temperatura y se continúa el calentamiento en corriente de vapor durante una hora y media. Se agita la mezcla y se filtra a través de lana de vidrio. La infusión así preparada puede transformarse en medio sólido o bien ser usada como medio líquido.

Las repetidas esterilizaciones de esta infusión reducen los factores promotores del crecimiento contenidos en ella, debido a que son compuestos sulfurados que experimentan descomposiciones en presencia del calor.

Para preparar un litro de agar-hígado, se necesita:

Agar lavado	20 gramos
Agua destilada	500 c.c.
Infusión de hígado	500 c.c.
Bacto-peptona. (Difco)	5 gramos
Cloruro de Sodio (Q. P.)	5 gramos

Todo se coloca en un matraz adecuado; se tapa y se pone al autoclave con la llave abierta, durante una hora; se enfría a 60 grados centígrados y se ajusta el pH a 7.2. El proceso de esterilización hace que el pH baje hasta 6.6 o 6.8, que es el óptimo para el crecimiento de las brucelas. Se vuelve a colocar al autoclave una media hora; se reparte en tubos y se esteriliza a quince libras de presión por treinta minutos.

CALDO BACTO-TRIPTOSA.—Los Laboratorios Difco han preparado un caldo peptonado excelente para la iniciación de un cultivo de brucelas. El medio deshidratado da un desarrollo de cuarenta y ocho horas tan bueno como el obtenido en medio agar-hígado a los diez días. Para su preparación se necesita:

Bacto-triptosa	20 gramos
Agua destilada	1.000 c.c.
Cloruro de Sodio	5 gramos.

La mezcla de todos los ingredientes se calienta en corriente de vapor diez minutos para obtener la completa disolución de los mismos. El pH se ajusta a 7.2; se filtra la mezcla a través de papel fil-

tro grueso y se esteriliza a quince libras de presión durante veinte minutos. El pH final deberá ser de 6.6 a 6.8. (Si se agrega la infusión de hígado que proviene de 125 gramos de hígado, el desarrollo continúa por varias semanas).

AGAR BACTO-TRIPTOSA.—Lo preparan los Laboratorios Difco y es completamente deshidratado.

Se prepara:

Agar-bacto-triptosa (deshidratada)	46 gramos
Agua destilada	1,000 c.c.

La mezcla se lleva a ebullición por algunos minutos para disolver el agar; se esteriliza a quince libras de presión por veinte minutos; el pH final deberá quedar de 6.6 a 6.8.

CALDO DE HIGADO.—Fórmula:

Infusión de hígado	500 c.c.
Agua destilada	500 c.c.
Bacto-peptona	5 gramos
Cloruro de Sodio	5 gramos

Se calienta en autoclave con la llave abierta para disolver los ingredientes, se ajusta el pH a 7.2, se vuelve a calentar por quince minutos, se reparte en tubos y se esteriliza a quince libras de presión durante treinta minutos. El pH final deberá ser de 6.6 a 6.8.

MEDIO DE PATATA.—Se rebanan 250 gramos de patatas; se ponen en mil centímetros cúbicos de agua destilada y se deja la mezcla 24 horas a sesenta grados centígrados, en una vasija tapada; se filtra, se lleva el filtrado a mil centímetros cúbicos y se añaden los siguientes ingredientes:

Cloruro de sodio	5 partes.
Bacto-peptona	10 partes.
Extracto de carne	5 partes.
Dextrosa	10 partes.
Agar lavado	20 partes.

La mezcla se calienta para disolver el agar, se añaden 20 c.c. de glicerina y el medio se ajusta a un pH. de 7.4; se filtra y se es-

teriliza a 120 grados centígrados durante 20 minutos. El pH queda de 6.8.

VITALIDAD Y PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Los miembros de este grupo tienen la habitual sensibilidad de las bacterias vegetativas al calor y a los desinfectantes. En suspensiones acuosas son destruidas por el calor a sesenta grados centígrados durante diez minutos, y por 1% de fenol en quince minutos. En la leche se destruyen por el proceso de pasteurización. En los cultivos es muy resistente, puede durar hasta nueve meses; en la orina vive por varios días y en el agua por varias semanas; en la leche cruda no puede vivir mucho por la reacción ácida que se establece.

El pH óptimo para su desarrollo es de 6.6 a 6.8.

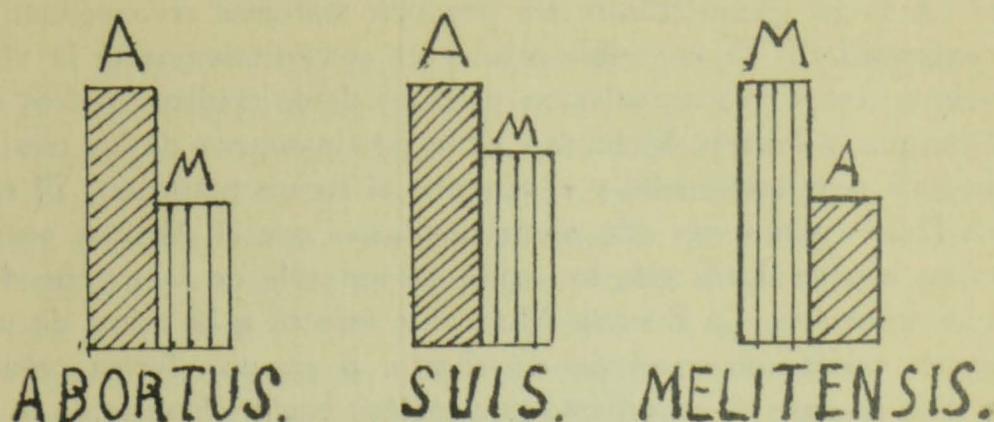
Los micro-organismos de este grupo producen ácido sulfhídrico, produciéndolo en mayor cantidad el tipo Suis. Los nitratos son reducidos a nitritos y estos a su vez se reducen rápidamente dando gas nitrógeno, sobre todo si se trata del tipo Suis. El amoníaco es producido en mayor cantidad por la brucela Melitensis que por las otras especies. La leche tornasolada se vuelve ligeramente alcalina. En los medios con azúcares ordinarios no hay fermentación. No produce indol en los cultivos. En presencia de ciertos colorantes se inhibe la reproducción de determinados tipos, lo cual constituye un medio para diferenciar las tres especies de brucelas.

AGLUTINACION

La diferenciación de los tres tipos de brucelas, Melitensis, Abortus y Suis, basada en su estructura antigénica, ha dado lugar a muchas confusiones que se deben probablemente a que los investigadores no tienen en cuenta las variaciones causadas por la transición S.....R (colonias lisas a colonias rugosas). Si se trabaja solo con cepas S, es posible, por medio de la prueba de aglutinación, diferenciar entre la brucela Melitensis por una parte, y la brucela Abortus y Suis por otra.

La estructura antigénica de los tres tipos está constituida por

dos antígenos comunes, pero con una diferente distribución cuantitativa. Si llamamos A y M los dos antígenos, tendremos que el antígeno M domina en el Melitensis y el antígeno A en el Abortus.



Si en un suero se quitan las aglutininas "minor", es decir, las que están en menor proporción, sin remover más que una pequeña parte de las aglutininas "major" se obtendrán sueros monoespecíficos que aglutinarán sólo a aquellos micro-organismos en los cuales predomina el correspondiente antígeno. Con estos sueros es posible establecer la identidad antigénica de cepas desconocidas, aunque no constituye esto una prueba concluyente para diferenciar los tipos del grupo brucela.

Se han encontrado cepas cuyas propiedades morfológicas y de cultivo, son semejantes a las de brucela Melitensis o a las de Abortus, pero que no se aglutinan en presencia de los sueros respectivos; en cambio, son aglutinadas por agentes no específicos. A estas cepas se les ha llamado para-Melitensis y para-Abortus.

En los cultivos viejos hay una transición de las cepas Melitensis y Abortus en para-Melitensis y para-Abortus respectivamente, que va acompañada de un cambio en la apariencia de las colonias y un descenso en la virulencia para los animales de laboratorio. Este cambio es solo una manifestación de la variación S.....R. Las cepas R son aglutinadas por el suero de personas normales y por el de enfermos febriles, lo que puede ocasionar errores de diagnóstico.

PAPEL PATOGENO

La brucela *Melitensis*, la brucela *Abortus* y la *Suis*, son infectantes para el hombre. La enfermedad que producen es la fiebre de Malta, pero la infección puede tener otras muchas manifestaciones. A veces queda latente sin producir síntomas reconocibles de la enfermedad. Es imposible establecer comparativamente la virulencia de estos tres organismos, pero los datos epidemiológicos sugieren que la brucela *Melitensis* es la más patógena de las tres; el tipo *Suis* sería intermedio y el *Abortus* el menos patógeno. El tipo *Suis* Danés parece ser aún menos patógeno que el *Abortus* puesto que no existen datos que lo hagan responsable de la enfermedad en los animales. La *Brucela Melitensis* infecta a la cabra de una manera aguda, acompañada de aborto, o en una forma crónica que sólo se pone de manifiesto por análisis bacteriológicos de la leche, sangre u orina, o por pruebas alérgicas.

Pueden infectarse las vacas, excretando los organismos en la leche. La brucela *Abortus* se considera responsable de casi todos los abortos en el ganado vacuno. Infecta a otros animales, especialmente caballos y perros; se le ha encontrado en las cabras y los cuyes se han infectado en condiciones naturales.

Las dos variedades de brucela *Suis* son patógenas para los cerdos, provocando a veces el aborto. Este tipo puede infectar también, ocasionalmente, a las vacas, caballos y perros. Las tres especies son infectantes para los animales de laboratorio. El cuy es el más susceptible, pero los conejos, ratas y ratones pueden también infectarse. En el cuy la enfermedad producida por inoculación parenteral es crónica. La infección comienza por el sistema retículo-endotelial, las lesiones son ligeras y consisten principalmente en un aumento no hiperhémico de los ganglios linfáticos, cierto crecimiento del bazo y la presencia de focos necróticos en el hígado. No es rara la formación de abscesos en el testículo y en el epidídimo. En infecciones por brucela *Suis*, (variedad Americana) las lesiones necróticas son pocas, de gran tamaño y de consistencia purulenta. En cambio en las infecciones por brucelas *Melitensis* y *Abortus* son más numerosas, pequeñas y no purulentas, excepto en el testículo.

Los investigadores que han estudiado esto, opinan que no se

puede distinguir el tipo de brucela por su papel patógeno para los animales de laboratorio.

IMPORTANCIA DE LA BRUCELOSIS EN MEXICO DESDE EL PUNTO DE VISTA SANITARIO

La brucelosis humana se sospechó, en México, un poco después que la enfermedad fué descrita en el Viejo Mundo, pero no se confirmó hasta 1923, cuando el Dr. Placeres reportó al Séptimo Congreso Médico, en Saltillo, Coah. que había aislado el organismo de la sangre de un paciente. A medida que se han usado mejores métodos de diagnóstico y se ha conocido la sintomatología, el número de casos de brucelosis reportados al Departamento de Salubridad ha aumentado considerablemente. Actualmente las cifras de mortalidad por brucelosis son altas, y la enfermedad es ya un serio problema en México. La posible fuente de infección no ha sido plenamente demostrada aun cuando se han hecho trabajos a este respecto. Los reportes hechos al Departamento de Salubridad Pública y Estadística por Tellez Girón y Zozaya, muestran que el 24% del ganado de ordeña, y del 30 al 35% de cerdos han dado cutireacciones positivas. En las cabras el porcentaje de reacciones positivas varía del 15 al 20%. El gran número de atacados de brucelosis (pacientes del Hospital General de México), dió oportunidad para aislar y clasificar varias cepas de brucelas. Se sometieron 200 casos de brucelosis a los procedimientos usuales para verificar el diagnóstico. 83.5% de estos pacientes fueron probablemente infectados en la ciudad de México, y el resto en regiones endémicas, en distintas partes de la República. Se lograron aislar 150 cepas de brucelas que fueron sometidas a los distintos métodos de identificación de los tres tipos, resultando que la mayoría pertenecían al tipo Melitensis, sólo dos casos se encontraron ser causados por brucela Suis y cinco por brucela Abortus.

En un estudio y clasificación hecho por Gutiérrez Villegas, usando medios diferenciales, logró aislar cuarenta de sus cepas como brucela Melitensis, una como Abortus y ninguna Suis. El notable predominio del porcentaje de casos de brucelosis debidos a la brucela Melitensis, sugiere que en México la enfermedad tiene

como fuente de infección a las cabras. Sin embargo el aislamiento de cinco cepas de brucela Abortus, demuestra que las vacas pueden ser una fuente de infección si la leche se consume mal pasteurizada. En lo que se refiere a la brucela Suis, es raro que se hayan aislado sólo dos cepas, en cambio los cerdos han dado un elevado porcentaje de reacciones positivas. Hay varias localidades en la República donde la brucelosis es sumamente frecuente. En estos lugares la gente toma leche cruda de cabra y de vaca, pero, en la ciudad de México, donde la leche se toma hervida, el peligro de la infección por brucela se debe al consumo de queso fresco, mantequilla, cremas y todos los derivados de la leche, sobre todo aquellos en cuya manufactura se ha utilizado leche de cabra, ya que con los datos que se tienen puede asegurarse que el 95% de los casos de brucelosis en la ciudad de México son de origen caprino.

Es pues de gran importancia considerar la infección en las cabras, ya que la eliminación de las brucelas por la leche, la orina, y las descargas vaginales al tiempo del aborto, juegan un papel importante en la diseminación de estos micro-organismos.

La infección es más notable en las cabras durante los meses de enero, febrero y marzo, ya que durante este período del año, las cabras paren. Sin embargo, es raro que la infección humana sea más frecuente durante los meses de julio y agosto. Esto se explica por que las cabras que paren en el mes de febrero no se usan para fines comerciales sino dos semanas después. El tiempo en que el hombre está más expuesto a la infección es a principio de marzo, pero tampoco en este tiempo se observan todavía los síntomas, pues el período de incubación dura cuando menos tres semanas; se podrán observar síntomas precoces a principios de marzo o abril, pero generalmente se observan en la estación calurosa, en mayo o a principios de junio. Además, la enfermedad puede presentarse al principio en una forma insidiosa, sobre todo si se tiene cierta inmunidad, y entonces los síntomas no llamarán la atención sino hasta los meses de julio y agosto, cuando el paciente está seriamente enfermo.

Es importante considerar que las cabras que han sido infectadas conservan durante mucho tiempo una reacción serológica positiva, y si han sufrido una infección aguda generalizada, rara vez

vuelven a dar una reacción serológica negativa en el resto de su vida. Para el epidemiólogo tiene interés saber cuándo la infección ha terminado, es decir, cuando cesa la eliminación de brucelas, pero es difícil establecer una relación definida entre la disminución o desaparición de las aglutininas, y el final de la infección.

En experiencias hechas en animales infectados durante 1929, 1930 y 31, se ha demostrado que todavía en los años de 1935 y 1936 presentan títulos de I:180. Estos animales fueron sacrificados y se cultivaron sus tejidos, habiéndose aislado aún de la glándula mamaria de uno de ellos, la brucela *Melitensis*. Algunos animales infectados, pueden, sin embargo, volver a tener reacción negativa durante el tiempo que no hay preñez. Se puede pensar que una reacción serológica persistente, después de una infección generalizada, puede representar un foco infectante, a pesar de la dificultad para demostrarlo. Para aclarar este asunto, se han hecho esfuerzos tratando de conocer los períodos durante los cuales la brucela *Melitensis* es eliminada por las secreciones de las cabras. Debe recordarse que en los animales agudamente infectados, la eliminación se vuelve esporádica cuando el "climax" de la infección ha pasado; por esto no tienen valor los cultivos negativos, y aún los cultivos diarios de la leche y secreciones vaginales durante un largo período, sólo deben tomarse como informativos acerca del proceso de la enfermedad.

En experiencias verificadas en un grupo de doce cabras, en las que cada tercer día se hicieron cultivos de sus leches, en el primero, tercero y quinto mes después de la preñez durante la cual fueron infectadas, todas, menos una, resultaron positivas en la mayoría de los días del primer mes. Hubo un descenso del índice de eliminación hacia el fin de mes, pero el número de colonias obtenidas de 0.2 c.c. de leche fueron generalmente más de 100. Durante el tercer mes sólo cinco cabras dieron colonias típicas. Durante el quinto mes, tres de las cinco cabras que eliminaron en el tercer mes, dieron menos de diez colonias en dos o tres ocasiones. La eliminación debe, pues, considerarse como constante durante el primer mes o las seis semanas de lactancia, después las cabras cesan de eliminar brucelas, o continúan haciéndolo rara vez.

Otro grupo de diez cabras infectadas se examinó de la misma

manera durante la lactancia siguiente al segundo parto después de la infección. En este grupo, una cabra permaneció siendo constante eliminadora de brucela *Melitensis* después de cinco meses de lactancia. Otras dos no dieron sino menos de diez colonias durante la primera semana de lactancia, pero de las siete cabras restantes nunca se obtuvo brucela. Durante la primera lactancia siguiente a la infección, las diez cabras eran constantes eliminadoras. Las secreciones vaginales de los dos grupos fueron también cultivadas al mismo tiempo que la leche, con resultados semejantes, pero la eliminación en estas secreciones termina más pronto; al quinto mes ya no dan cultivos positivos. Las secreciones genitales y la placenta no dan ya cultivos positivos después del segundo parto.

Teniendo en cuenta todo esto, puede decirse que la infección aguda generalizada en las cabras, principia a localizarse al segundo mes después de la terminación de la preñez durante la cual fueron infectadas. Generalmente la localización excluye la ubre y el útero hacia el quinto mes de terminada la preñez, pero algunas pueden retener la infección localizada en la ubre hacia el fin de la lactancia. Después de la segunda preñez, en general no aumenta la eliminación de brucelas, sólo rara vez sucederá que haya un aumento.

Se cree que la infección permanece localizada en los conductos genitales por varios años, originando infecciones agudas. Se ha demostrado que las cabras son susceptibles a la infección por brucela *Abortus* y este micro-organismo se observó en los fetos abortados por cabras infectadas, pero, en contraste con la infección por brucela *Melitensis*, en muy pocas de las cabras se encontró la brucela *Abortus* en la corriente sanguínea y en la leche.

La brucela *Suis* no ha sido aislada todavía de las cabras infectadas.

METODOS USADOS PARA LA INVESTIGACION DE BRUCELAS EN EL QUESO

SIEMBRA

Se pesa un gramo de queso, procurando que todo el material usado para la pesada sea estéril, se tritura en mortero, se pone en

un frasco estéril que contiene perlas de vidrio y 10 c.c. de agua. Se emulsiona bien, agitando, y se toma de esta emulsión un centímetro cúbico que se lleva a 100 c.c. con agua estéril, en otro frasco; de esta última dilución tomamos un centímetro cúbico y lo ponemos en caja Petri estéril; agregamos 10 c.c. de gelosa hígado adicionado de violeta de genciana, mezclando bien con el medio antes de que la gelosa se solidifique. La solución de violeta de genciana se prepara al 1 por 20,000 para poner 1 c.c. por cada 10 c.c. de medio de cultivo, de tal modo que la dilución final del colorante quede al 1 por 200,000. A esta concentración el colorante no impide el desarrollo de las brucelas y sí el de otros gérmenes, especialmente los Gram positivos. (el medio de cultivo se prepara siguiendo la técnica que recomienda Huddleson, indicada en la página número 11). Las cajas ya sembradas se llevan a la incubadora a 37 grados centígrados.

EXAMEN MICROSCOPICO

Después de la incubación se hicieron frotis, escogiendo las colonias sospechosas, y de aquellas que contenían gérmenes Gram negativos con las características del género brucela, se hicieron resiembras sucesivas en gelosa-hígado con violeta de genciana, hasta eliminar todos los gérmenes extraños y obtener cultivos puros, que en los frotis se presentaron bajo la forma de pequeños diplococos o bacilos Gram negativos. Entonces se sembraron en gelosa-hígado, ya sin violeta de genciana. Al mismo tiempo se hicieron siembras y frotis comparativos de cepas puras de brucela *Melitensis* y brucela *Abortus*.

Se observó que después de varias resiembras en el medio sólido, la morfología de los gérmenes cambiaba, aumentando su tamaño, pero recobraban su forma sembrándolos en caldo-hígado.

De cien muestras tomadas de quesos frescos de cabra y de vaca, se lograron obtener diez cultivos puros, positivos al examen microscópico, que corresponden a las siguientes muestras:

- 1.—Queso fresco de cabra, de Palo Verde, Gto.
- 2.— „ „ de Jalisco.
- 3.— „ cabra de Oaxaca.
- 4.— „ „ de Puebla.
- 5.— „ añejo de Michoacán.
- 6.— „ de vaca de Fresnillo, Zac.
- 7.— „ de cabra de Zacatecas.
- 8.— „ “Cotija”.
- 9.— „ Fresco de la Piedad, Mich.
- 10.— „ Sierra de Jalisco.

El examen microscópico de las muestras precedentes dió los siguientes resultados:

- 1.—Pequeños diplococos Gram negativos.
- 2.—Pequeños diplococos Gram negativos con algunos bacilos.
- 3.— „ „ „ „
- 4.— „ „ „ „
- 5.— „ „ „ „
- 6.—Bacilos y diplococos Gram negativos.
- 7.—Diplococos Gram negativos.
- 8.—Bacilos Gram negativos.
- 9.—Bacilos Gram negativos.
- 10.—Diplococos Gram negativos.

Con los diez cultivos de estas muestras se procedió a hacer las pruebas bioquímicas y de aglutinación que caracterizan al grupo brucela.

PRUEBA DE LA PRODUCCION DE ACIDO SULFHIDRICO

Tanto la brucela Melitensis como la Abortus, tienen la propiedad de producir ácido sulfhídrico en condiciones de aerobiosis. Esto constituye un método para diferenciar entre sí los tipos de brucelas. Las cepas recientemente aisladas de la variedad Suis y Abortus dan ácido sulfhídrico al menos durante cuatro días, mientras que las Melitensis no producen nada, o sólo lo hacen durante las primeras

24 horas de incubación. La variedad Danesa del tipo Suis no dá ácido sulfhídrico. La brucela Abortus y la Suis pierden a veces, con el tiempo, la propiedad de producirlo. Para efectuar esta prueba se prepararon pequeñas tiras de papel filtro impregnadas con acetato de plomo al 10% (10 gramos de acetato de plomo disueltos en agua destilada recientemente hervida, hasta completar 100 c.c.) Se hizo una siembra en tubos con gelosa-hígado inclinada, que previamente se prepararon añadiéndoles un poco de éter y manteniéndolos en contacto con él durante tres días, estando bien tapados y a la temperatura ambiente. En seguida se quitó el éter y se efectuó la siembra, tomando una asa bien llena de un cultivo de 48 horas; luego se colocó en la parte superior de los tubos sembrados, sosteniéndola con el tapón de algodón, una tira de papel impregnada con acetato de plomo, llevándolos a incubar a 37 grados centígrados durante 24 horas; después de este tiempo se quitaron los papeles, numerándolos para conservarlos por orden de fechas; se renovó en cada tubo el papel con acetato, volviendo a incubar 24 horas, repitiendo esta operación durante varios días.

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRODUCCION DE ACIDO SULFHIDRICO

Cultivo N°	1er. día	2o. día	3er. día	4o. día	5o. día	6o. día
1.—Casi nada.	Nada	Nada	Nada	Nada	Nada	Nada
2.— Nada	"	"	"	"	"	"
3.— "	"	"	"	"	"	"
4.—Casi Nada	"	"	"	"	"	"
5.—Poco	"	Casi nada	Bast.	Bast.	Bast.	Bast.
6.—Regular	Poco	Poco	Muy poco	Nada	Nada	Nada
7.—Poco	"	"	Nada	"	"	"
8.—Regular	Regular	Poco	Muy poco	"	"	"
9.—Regular	"	Regular	Poco	M. poco	M. poco	M. poco
10.—Poco	"	"	Bast.	Bast.	Bast.	Bast.

PRUEBA DE LA REDUCCION DE NITRATOS Y NITRITOS

Para apreciar esta reducción se usó el medio que describen Zobel y Meyer, compuesto de:

Peptona	2	gramos
Extracto de carne	1	"
Cloruro de sodio	3	"
Agar	2	"
Agua destilada	1,000	c. c.

Se añade al medio 0.2% de nitrato de potasio.
Se ajusta el pH a 6.8

Se usó mayor cantidad de agar, hasta cuatro gramos, porque con la indicada quedó el medio completamente líquido, debiendo quedar semi-sólido para asegurar una producción de gas aparente. Ya preparado el medio y repartido en tubos, se sembraron en él cultivos recientes de las muestras por identificar, llevando esta siembra a incubar durante cuarenta y ocho horas. (La presencia de nitritos, la desaparición de nitratos y el gas producido, son los que ponen de manifiesto el proceso de reducción de los nitratos y nitritos).

Primero se observó si el medio contenía burbujas de gas, no encontrándoles ninguna: en seguida, y para poner de manifiesto la presencia de nitritos se hizo la reacción de Petter Griess. "Si a un nitrito se agrega ácido sulfanílico y alfa-naftil-ainma en soluciones acéticas, después de cinco minutos aparecerá una coloración roja debida a un compuesto formado por diazotación, el ácido azo-benzol-naftil-amino-sulfónico."

Para efectuar la reacción se añadió a cada cultivo diez centímetros cúbicos de agua destilada estéril, agitando enérgicamente con objeto de disolver las sustancias presentes en el medio, principalmente nitratos y nitritos; en seguida se calentaron durante quince minutos, usando para la prueba la solución resultante del medio fundido. Además de la reacción cualitativa, que resultó positiva para todos los cultivos, se hizo la determinación cuantitativa del nitrógeno de los nitritos en cada muestra, usando el procedimiento para determinar nitritos en el agua, que se indica a continuación:

I.—REACTIVOS.

a).—Solución de ácido sulfanílico. (Disuélvanse 8 gramos de ácido sulfanílico Q. P. en un litro de ácido acético 5 Normal de densidad igual a 1.041; prácticamente esta es una solución saturada).

b).—Solución de acetato de alfa-naftil-amina (disuélvase 5 gramos de alfa-naftil-amina-sódica en un litro de ácido acético 5 normal, filtrese la solución a través de algodón absorbente lavado). Si la alfa-naftil-amina de que se dispone produce una solución que no sea completamente incolora, hágase adsorber el cuerpo colorido por carbón activo.

c).—Solución madre de nitrito de sodio. (Disuélvase en agua libre de nitritos, 1.1 gramos de nitrito de plata; precipítese la plata por adición de una solución al 5% de cloruro de sodio hasta precipitación completa y dilúyase a un litro).

d).—Solución tipo de nitrito de sodio. (Dilúyanse 100 c.c. de la solución madre a un litro, tómense 50 c. c. de esta solución y llévense a un litro con agua esterilizada libre de nitritos; agréguese 1 c.c. de cloroformo para preservarla). 1 c.c. igual a 0.0005 miligramos de Nitrógeno, igual a 0.001642 miligramos de NO_2 .

e).—Hidróxido de aluminio. (Electrólícese agua libre de amoníaco usando electrodo de aluminio. Lávese el precipitado hasta que esté libre de cloruros, amoníaco o nitritos, o disuélvase 125 gramos de alumbre de potasio o de amonio en un litro de agua destilada. Precipítese el aluminio por adición de hidróxido de amonio. Lávese el precipitado en una vasija grande por adiciones de agua y decantaciones sucesivas; repítase la operación con agua destilada hasta que el hidróxido de aluminio quede exento de cloruros, nitritos o amoníaco).

2.—PROCEDIMIENTO

Póngase en un tubo de Nessler 50 c. c. de la muestra decolorada, si es necesario, con hidróxido de aluminio, o una cantidad menor si se supone que el contenido de nitritos sea elevado, y dilúyase a 50 c. c.

Al mismo tiempo prepárense una serie de tubos tipo, diluyendo a 50 c. c. con agua destilada libre de nitritos, varias cantidades de la solución tipo de nitritos.

Los volúmenes que se sugieren son: 0.1, 0.2, 0.4, 0.7, 1.0, 1.4, 1.7 2, 2.5 c.c. (conteniendo 0.0005 miligramos de nitrógeno por centímetro cúbico). Agréguese 1 c. c. de la solución de ácido sulfanílico y 1 c. c. de la solución de alfa-naftil-amina; mézclese vi-

gorosamente y déjese reposar la muestra teñida más de treinta minutos antes de hacer la comparación. Si el color de la muestra es más intenso que el más alto de los tipos, repítase la prueba con una muestra diluída.

Se preparó una escala con los valores siguientes:

<i>Tubos</i>	<i>Sol. tipo</i>	<i>Miligramos de N.</i>
1.	0. c. c.
2.	0.1 c. c.	0.00005
3.	0.2 c. c.	0.0001
4.	0.4 c. c.	0.0002
5.	0.7 c. c.	0.00035

Un centímetro cúbico de solución tipo igual a 0.0005 miligramos de nitrógeno. Las muestras resultaron mucho más coloridas que la escala, por lo que se hicieron con ellas diluciones de:

1:50, 1:100, 1:150, 1:200, y 1:500. Una vez diluídas, se procedió a compararlas con la escala, obteniéndose los siguientes resultados:

- Muestra N° 1 correspondió al tubo 5 de la escala
- Muestra N° 2 correspondió al tubo 2 de la escala
- Muestra N° 3 correspondió al tubo 3 de la escala
- Muestra N° 4 correspondió al tubo 2 de la escala
- Muestra N° 5 correspondió al tubo 4 de la escala
- Muestra N° 6 correspondió al tubo 2 de la escala
- Muestra N° 7 correspondió al tubo 4 de la escala
- Muestra N° 8 correspondió al tubo 2 de la escala
- Muestra N° 9 correspondió al tubo 2 de la escala
- Muestra N° 10 correspondió al tubo 4 de la escala

RESULTADOS EN MILIGRAMOS DE NITROGENO

Muestra N° 1	0.05	miligramos
" "	2	0.0005	"
" "	3	0.05	"
" "	4	0.0005	"
" "	5	0.002	"
" "	6	0.05	"
" "	7	0.002	"

Muestra N°	8	0.0025	miligramos
"	"	9	0.025
"	"	10	0.002

PRUEBA DE LA ACCION BACTERIOSTATICA DE LOS COLORANTES

Se ha aprovechado la acción que tienen ciertos colorantes sobre los diferentes tipos del género brucela, permitiendo o inhibiendo su desarrollo, para distinguir entre sí a los miembros de este grupo. Los colorantes que dan resultados en la diferenciación de las tres especies, son la fuchsina y la tionina. La brucela *Abortus* sólo se desarrolla en los medios que contienen fuchsina; la brucela *Suis* se desarrolla únicamente en los medios con tionina, y la *Melitensis* se cultiva bien en presencia de cualquiera de los dos colorantes. Para esta prueba se usó el medio agar-hígado, con un pH de 6.6. Se prepararon soluciones de fuchsina y tionina en agua estéril, en diluciones de 1 a 2,500 para la fuchsina y de 1 a 5,000 para la tionina. (La dilución final de los colorantes en el medio será de 1 a 25,000 y de 1 a 50,000 respectivamente). Estas soluciones previamente calentadas durante veinte minutos, se mezclaron con el medio de cultivo fundido en tubos, poniendo 1 c. c. de colorante para 10 c. c. de medio y preparando un tubo con fuchsina y otro con tionina para cada muestra por identificar; enseguida se vació el medio en cajas Petri que se llevaron a incubar a 37 grados centígrados, hasta eliminar toda el agua de condensación. Estas cajas fueron sembradas con los cultivos recientes de las diez muestras ya mencionadas, y se incubaron a 37 grados centígrados durante 72 horas, al cabo de las cuales se observó el desarrollo.

RESULTADOS

<i>Muestra N°</i>	<i>Medio con Fuchsina</i>	<i>Medio con Tionina</i>
1.	Hubo desarrollo	Hubo desarrollo
2.	" "	" "
3.	" "	" "
4.	" "	" "
5.	" "	" "
6.	" "	No hubo desarrollo
7.	" "	Hubo desarrollo

8.	" "	" "
9.	No Hubo desarrollo	" "
10.	Hubo desarrollo	" "

REACCIONES DE AGLUTINACION

Para efectuar estas reacciones cada muestra se probó frente a sueros específicos anti-Melitensis y anti-Abortus.

El material usado fué el siguiente:

Cultivos en caldo, de 24 horas.

Suero Monovalente anti-Melitensis diluido al décimo, del Instituto de Higiene.

Suero Monovalente anti-Abortus diluido al décimo, del Instituto de Higiene.

Suero fisiológico.

TECNICA DE LA REACCION CON SUERO ANTIMELITENSIS

<i>Tubos</i>	<i>Suero anti-Melitensis al 1/10</i>	<i>Suero Fis.</i>	<i>Cultivo</i>	<i>Título de dilución</i>
1.	5 gotas	5 gotas	15 gotas	1 por 50
2.	2 gotas	8 gotas	15 gotas	1 por 125
3.	1 gota	9 gotas	15 gotas	1 por 250
4.		10 gotas	15 gotas	Test.

Se lleva a 56 grados centígrados, a baño maría durante dos horas.

La técnica de la reacción con suero anti-abortus es igual a la anterior, solamente cambia el suero.

RESULTADOS

AGLUTINACION CON SUERO ANTIMELITENSIS

<i>Muestra N°</i>	<i>Tubos</i>			
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>
1.	+	+	-	-
2.	+	+	-	-
3.	-	-	-	-

4.	+	+	+	-
5.	-	-	-	-
6.	-	-	-	-
7.	-	-	-	-
8.	-	-	-	-
9.	+	-	-	-
10.	-	-	-	-

AGLUTINACION CON SUERO ANTI-ABORTUS

Muestra N°	Tubos			
	1	2	3	4
1.	-	-	-	-
2.	-	-	-	-
3.	-	-	-	-
4.	-	-	-	-
5.	-	-	-	-
6.	+	+	+	-
7.	-	-	-	-
8.	+	-	-	-
9.	+	-	-	-
10.	-	-	-	-

CONCLUSIONES

Se analizaron cien muestras, de las cuales diez fueron positivas al examen microscópico. De estas diez, sólo cinco fueron positivas para todas las pruebas a que se sometieron: (aglutinación, producción de ácido sulfhídrico, reducción de nitratos y nitritos y acción bacteriostática de los colorantes). Las demás dieron resultados negativos para unas pruebas y positivos para otras, por lo que no se puede identificarlas correctamente como pertenecientes a alguno de los tipos del grupo brucela, considerándose estas muestras como dudosas, dado el valor que tienen las pruebas citadas, sobre todo la de aglutinación.

Las cinco muestras positivas son:

- 1.—Queso fresco de cabra de Palo Verde, Gto.
- 2.—Queso de Jalisco.
- 4.—Queso de Cabra de Puebla.
- 6.—Queso de vaca de Fresnillo, Zac.
- 9.—Queso fresco de La Piedad, Mich.

Nº Examen Microscópico	Aglutinación	Prod. de H ₂ S.	Acción de colorantes	Reducc. de nitratos
1. Diplococos Gram Negativo	+para el melitensis	1 día	Desarrollo con los 2 colorantes	No Positiva
2. Diplococos y bacilos Gram negativos	+para el melitensis	no hubo	„ „	„
4. Diplococos Gram Negativos	+para el melitensis	1 día	„ „	„
6. Bacilos Gram Negativos	+para el Abortus	4 días	Desarrollo sólo con fuchsina	„
9. „ „	+para los dos Antisueros	6 días	Desarrollo sólo con Tionina	„

Como se ve en el cuadro anterior, tres muestras presentan los caracteres morfológicos y bioquímicos del tipo Melitensis, de las dos restantes, una se clasifica como brucela Abortus y la otra como Suis. Hay un predominio de tipo Melitensis en las brucelas de los quesos contaminados. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que en 100 quesos analizados, hubo 5 conteniendo brucelas.

A continuación se inserta la lista de las muestras analizadas

- 1.—Queso de Oaxaca.—Negativo.
- 2.— " " Corralejo de Gto.—Negativo.
- 3.— " " Regalías de Gto.—Negativo.
- 4.— " " Sta. Bárbara.—Negativo.
- 5.— " " Añejo de Jerez, Zac.—Negativo.
- 6.— " " Panela, San Juan del Río, Querétaro.—Negativo.
- 7.— " " Ideal, de México.—Negativo.
- 8.— " " Olorón, de Pino, Zac.—Negativo.
- 9.— " " Tipo Holanda.—Negativo.
- 10.— " " "La Mexicana".—Negativo.
- 11.— " " Palo Verde, Gto.—Negativo.
- 12.— " " Añejo de Lagos, Jal.—Negativo.
- 13.— " " Puebla.—Negativo.
- 14.— " " Crema.—Negativo.
- 15.— " " Requezón Santa Bárbara, Edo. de México.—Negativo.
- 16.— " " Cabra de Santa Bárbara, Edo. de México.—Negativo.
- 17.— " " Cabra de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
- 18.— " " Vaca de Michoacán.—Negativo.
- 19.— " " Cabra del Edo. de México.—Negativo.
- 20.— " " Ajuno, Mich.—Negativo.
- 21.— " " Añejo de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
- 22.— " " Fresco de Palo Verde de Villagrán, Gto.—Negativo.
- 23.— " " Fresco de Chihuahua.—Negativo.
- 24.— " " Vaca de Lagos, Jal.—Negativo.
- 25.— " " Cabra Ranchero de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
- 26.— " " Vaca de Lagos, Jal.—Negativo.
- 27.— " " Cabra de Salinas, Coah.—Negativo.
- 28.— " " Fresco de Salinas, Coah.—Negativo.
- 29.— " " Fresco de Palo Verde, Saravia, Gto.—POSITIVO.
- 30.— " " Sierra Frescal de Sahuayo, Jal.—POSITIVO.
- 31.— " " Añejo de San José de Gracia, Mich.—Negativo.
- 32.— " " Cabra de Villagrán, Gto.—Negativo.
- 33.— " " Fresco del Sol del Edo. de Jalisco.—Negativo.

- 34.— " " Panela de Querétaro.—Negativo.
35.— " " Vaca de Jonutla, Tabasco.—Negativo.
36.— " " "El Píal" de Palizada, Campeche.—Negativo.
37.— " " "La Moderna".—Negativo.
38.— " " Sahuayo, Mich.—Negativo.
39.— " " Cabra y Vaca de Santa Bárbara.—Negativo.
40.— " " Cabra de San Miguel Allende, Edo. de México.—Negativo.
41.— " " Cabra de Oaxaca.—Negativo.
42.— " " Michoacán.—Negativo.
43.— " " México. (Edo.)—Negativo.
44.— " " Requezón de Cabra de Santa Bárbara.—Negativo.
45.— " " Sierra.—Negativo.
46.— " " Sierra.—Negativo.
47.— " " Jalisco.—Negativo.
48.— " " Cabra de Lagos, Jal.—Negativo.
49.— " " Puebla.—Negativo.
50.— " " Jalisco.—Negativo.
51.— " " Jalisco.—Negativo.
52.— " " Vaca de La Barca, Jal.—Negativo.
53.— " " Cabra de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
54.— " " Vaca y Cabra de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
55.— " " Cabra de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
56.— " " Panela de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
57.— " " Cabra de Monterrey.—Negativo.
58.— " " Vaca de San Miguel Allende, Gto.—Negativo.
59.— " " Añejo de La Barca, Jal.—Negativo.
60.— " " Cabra de Puebla.—Negativo.
61.— " " Vaca de Toluca.—Negativo.
62.— " " Vaca de Palo Verde, Gto.—Negativo.
63.— " " Cabra de Puebla.—POSITIVO.
64.— " " Cabra de Jalisco.—Negativo.
65.— " " Sierra.—Negativo.
66.— " " Vaca de Corralejo.—Negativo.
67.— " " Vaca de Puebla.—Negativo.
68.— " " Cabra de Zacatecas.—Negativo.
69.— " " Vaca de Salamanca.—Negativo.
70.— " " Vaca de Lagos, Jal.—Negativo.
71.— " " Cabra de Degollado, Jal.—Negativo.
72.— " " Cabra de Corralejo.—Negativo.
73.— " " Vaca de Fresnillo, Zac.—POSITIVO.
74.— " " Añejo de Michoacán.—Negativo.
75.— " " Cabra de Puebla.—Negativo.
76.— " " Panela de Cabra de Irapuato, Gto.—Negativo.
77.— " " Sahuayo, Mich.—Negativo.
78.— " " Cabra de Zacatecas.—Negativo.
79.— " " Edo. de Tabasco.—Negativo.
80.— " " Vaca de Fresnillo.—Negativo.

- 81.— " " Cotija.—Negativo.
- 82.— " " Cabra de La Barca, Jal.—Negativo.
- 83.— " " Cabra Poblano.—Negativo.
- 84.— " " Cabra "Comonfort".—Negativo.
- 85.— " " Vaca de Tlaxcala.—Negativo.
- 86.— " " Vaca de Veracruz.—Negativo.
- 87.— " " Fresco Ranchero de La Piedad, Mich.—POSITIVO.
- 88.— " " Cabra de Palo Verde, Gto.—Negativo.
- 89.— " " Vaca de Lagos, Jal.—Negativo.
- 90.— " " Vaca de La Barca, Jal.—Negativo.
- 91.— " " Edo. de Jalisco.—Negativo.
- 92.— " " Vaca de Cotija.—Negativo.
- 93.— " " Cabra de Yurécuaro, Mich.—Negativo.
- 94.— " " Cotija.—Negativo.
- 95.— " " Vaca de Calvillo, Ags.—Negativo.
- 96.— " " Vaca de Tepehuanes, Dgo.—Negativo.
- 97.— " " Cabra del Edo. de S. L. P.—Negativo.
- 98.— " " Sandwich Dressing.—Negativo.
- 99.— " " Cabra de Tepehuanes, Dgo.—Negativo.
- 100.— " " Sierra de Michoacán.—Negativo.

Se analizaron también veinte mantequillas y todas dieron resultados negativos.

BIBLIOGRAFIA

- Brucellosis in man and animals by, I Forrest Huddleson.
- Principles of Bacteriology and immunity, Topley and Wilson.
- Studies on Brucellosis in Mexico, M. Ruiz Castañeda, Raúl Tovar and Rafael Vélez. (Journal of Infectious Diseases 2, 70, 1942).
- Bacteriología, de E. Mace.
- A biochemical method of differentiating brucella Abortus from brucella Melitensis—Huddleson, I. F. and E. Abell. (Journal of bacteriology.—13, p. 15, 1927.
- H. Zinsser and E. Tyzzer.