

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIVERSIDAD MOTOLINIA

**Método Actual de Preparación de Antígeno
de Brucela Abortus y Pruebas más
recientes de Diagnóstico de Brucelosis en el
Hombre y en los Animales.**

T E S I S

Que para su Examen Profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

MA. DEL CARMEN LEYZAOLA CASTILLO.

MEXICO
1955.



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.

90

3-76 (04)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIVERSIDAD MOTOLINIA

**Método Actual de Preparación de Antígeno
de Brucela Abortus y Pruebas más
recientes de Diagnóstico de Brucelosis en el
Hombre y en los Animales.**

TESIS

Que para su Examen Profesional de
QUIMICO FARMACRUTICO BIOLÓGICO
PRESENTA
MA. DEL CARMEN LEYZAOLA CASTILLO.

MEXICO
1955.

A mis padres con todo cariño.

A mis hermanos.

S U M A R I O

- I.— INTRODUCCION.
- II.— GENERALIDADES.
- III.— TIPIFICACION.
- IV.— DISOCIACION.
- V.— PREPARACION DEL ANTIGENO.
- VI.— PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS HUMANA.
- VII.— PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN LOS ANI-
MALES.
- VIII.— TRABAJOS EFECTUADOS Y CONCLUSIONES.
- IX.— BIBLIOGRAFIA.

I.— INTRODUCCION.

Actualmente se ha registrado un progreso considerable en varios países con relación al control de la brucelosis; sin embargo, desde el punto de vista de su trascendencia económica y sanitaria continúa siendo muy importante.

Como problema mundial la brucelosis comprende dos fases principales:

- 1.— Su repercusión en la salud pública.
- 2.— La pérdida económica de la Industria Ganadera.

Dada la importancia que representa el control de esta enfermedad he llevado a cabo el siguiente trabajo en el cual presento "El Método actual de preparación del antígeno y las pruebas más recientes de diagnóstico en los animales y en el hombre", ya que la erradicación de la brucelosis animal es la base para prevenir la brucelosis humana, demostrándose la necesidad de realizar estas pruebas debido a que en áreas donde faltaba información o era deficiente, la enfermedad alcanzaba una amplia difusión.

II. GENERALIDADES.

CLASIFICACION:

ORDEN:	Eubacteriales.
FAMILIA:	Parvobacteriaceas.
TRIBU:	Brucelleae.
GENERO:	Brucella.

Son tres las especies estrechamente relacionadas que constituyen el género *Brucella*: *Br. melitensis*, *Br. abortus* y *Br. suis*, además se ha colocado en este grupo el *Alcaligenes Bronchisepticus* bajo el nombre de *Br. bronchiseptica*.

CARACTERISTICAS.

Bacilos diminutos con muchas formas cocoides de 0.5 por .5 a 2.0 Micrones, solos o en parejas unidos por sus extremos o en pequeños grupos y a veces cadenas cortas, inmóviles. Gram negativos, algunas veces presentan tención bipolar. Sus colonias son pequeñas, redondas convexas, lisas y relucientes. Para su desarrollo prefieren una presión de oxígeno parcial o ligeramente reducida. dependiendo de la especie de que se trate. No licúan la gelatina. Patógeno al hombre y a los animales.

IDENTIFICACION.

Los tres microorganismos son muy afines diferenciándose en el laboratorio por reacciones bioquímicas y serológicas.

Cuando se aísla un germen que se sospecha pertenece al género *brucela*, el cultivo debe someterse a las siguientes pruebas de confirmación:

- a.— Apariencia típica de las colonias.
- b.— Prueba de Movilidad.
- d.— Aglutinación con un suero específico de *brucela*.
- c.— Coloración de Gram.

Todas las pruebas de identificación de las especies brucela son cualitativas y ninguna por sí sola es suficiente para establecer la diferenciación.

Si el germen que se trata de identificar es inmóvil, Gram negativo, colonias con apariencia típica de brucela y que llega a aglutinar el suero específico a un título presumible es brucela.

Todas las pruebas de identificación de las especies brucela son cualitativas y ninguna por sí sola es suficiente para establecer la diferenciación.

Si el germen que se trata de identificar es inmóvil, Gram negativo, colonias con apariencia típica de brucela y que llega a aglutinar el suero específico a un título presumible es brucela.

neutra de acetato de plomo al 10%, durante una hora. Las tiras de papel filtro se dejan secar. Una tira de este papel se coloca en la boca de cada tubo, manteniéndola en ese lugar con el tapón de algodón. Se debe evitar que el papel se moje. Los cultivos se incuban a 37°C y diariamente se examinan las tiras de papel durante 5 días para observar si hay ennegrecimiento. Si es que lo hay, se reemplaza la tira por una nueva. En general, la brucela melitensis no produce ennegrecimiento o si acaso una traza. Los cultivos de brucela abortus producen un ennegrecimiento moderado durante 2 días o poco más. La brucela suis produce un ennegrecimiento intenso durante 3 o 5 días, exceptuando la variedad Danesa que no produce H₂S. En las formas lisas la producción de H₂S es mayor.

La rapidez con que se efectúa la reacción en el caso de las brucelas abortus y Br. suis, se debe a la acción enzimática de la dihidro sulfidasa, sobre los sulfuroaminoácidos.

Inhibición por colorantes.— Esta prueba es muy útil ya que determina la capacidad de las brucelas para desarrollarse en presencia de ciertos colorantes. Los colorantes que dan los mejores resultados en esta prueba son la fucsina básica y la tionina así como la prorrina. Es necesario determinar la concentración adecuada del colorante según el medio que se emplee, cuando se usa fucsina básica Certificado No. NF58 y tionina Certificado No. NT16, es recomendable una dilución final 1:80,000, ya sea de uno o del otro colorante cuando se trate de medios como tripticasa-soya o Albini. Si el medio empleado es agar hígado la dilución debe ser 1:80,000. En agar papa, la dilución será 1:25,000. La prorrina se emplea a una dilución 1:100,000. En el caso de que una cepa no se tipifique satisfactoriamente usando las concentraciones que se indicaron se hacen nuevas pruebas usando un cultivo fresco empleando dos o tres diluciones del colorante a fin de determinar cual es la más apropiada. Simultáneamente a la muestra en estudio se hacen pruebas de control empleando cultivos conocidos. Los medios de cultivo deben ser recientes y los colorantes se añaden a los medios inmediatamente después de la esterilización. Si los colorantes usados no son del Certificado, debe determinarse la concentración basándose en la cantidad de colorante que poseen.

Técnica.— Se preparan placas de agar infusión hígado ajustando el pH 6.6 o bien se usa agar bacto-triptosa. Meyer y Zobell recomiendan un medio semi-sólido que se prepara como sigue:

Caldo simple.....	500 ml.
Cloruro de sodio.....	5 gr.
Bacto-peptona.....	2 gr.
Bacto-Agar.....	2 gr.
Agua destilada.....	500 ml.

Se disuelven en el caldo, la peptona, el agar y el cloruro de sodio y se ajusta el pH a 6.8, se filtra y se esteriliza a 15 libras durante 20 minutos. Ajustar el pH a 6.8 nuevamente, enfriar a 45° C. y añadir la cantidad de sol. madre de colorante fijada. La solución madre del colorante se prepara por trituración de un gramo de colorante en 1 cc. de alcohol absoluto. añadir 2 cc. de alcohol de 96 y acompletar 100 cc. con agua destilada quedando así una solución al 1%. Se lleva a la incubadora durante 48 hrs. a fin de comprobar su esterilidad.

El medio así obtenido se reparte en cajas de Petri, divididas en varios segmentos. Se siembra con un asa de platino de 2mm. cargada con un cultivo en medio sólido de 48 hrs. y es emulsionado en C.1cc. de solución salina, la superficie del agar. Las placas se incuban a 37°C. durante 72 hrs. o más.

Los cultivos de cepas de brucela abortus las que no desarrollarian en atmósfera normal, por lo que unas placas se incuban en atmósfera con 10% de CO₂, y otras en atmósfera normal.

La brucela abortus desarrolla abundantemente en medios con fucsina y pironina.

La brucela melitensis crece bien en fucsina y tionina, y puede o no crecer en pironina.

La brucela suis no desarrolla en fucsina ni en pironina únicamente en tionina.

Producción de Ureasa — Esta determinación es de algún valor aunque limitado en la tipificación de las especies. Es una determinación semi-cuantitativa de la actividad de ureasa de cultivos de brucela. El método recomendado es el de Bauer. Se prepara una solución al 5% de urea en M/8 NaH₂PO₄, con una solución de HCl al 10 % se ajusta al pH a 4 y se agrega rojo fenol como indicador al 0.0015%. Se carga un asa con cultivo de 48 hrs. sobre un medio sólido y se emulsiona en un cc. de la solución de urea. La mezcla se incubaba a baño maría a 37°C. y se hacen lecturas a los 15, 30 y 60 minutos y luego cada hora hasta observar un color rojo o rosado que indicará una reacción positiva.

La brucela suis da una reacción positiva inmediatamente o en el transcurso de 15 a 30 min., mientras que las cepas de brucela abortus necesitan 2 o más horas. El comportamiento de la brucela melitensis varía con la cepa de que se trate, algunas se comportan como Br. suis y otras como Br. abortus. En la actualidad la mayor utilidad de esta prueba consiste en distinguir la Br. abortus de la Br. suis.

Sin embargo, muchas veces da resultados equívocos por lo que se debe de correlacionar con los resultados de otras pruebas.

Utilización de la Dextrosa. — Esta prueba como la anterior no es digna de mucha confianza, por lo que se debe relacionar con otras pruebas.

Para ejecutar esta prueba, el cultivo debe hacerse en un medio que contenga peptona al 1% con dextrosa al 1% unos y otros sin dextrosa durante 14 días. Durante este tiempo se determina periódicamente el pH. En el medio, que contiene dextrosa la Br. suis y la melitensis disminuyen el pH debido a que utilizan la dextrosa, en cambio si se trata de Br. abortus aumenta la concentración de los iones OH aumentando el pH del medio puesto que el azúcar no es utilizado, o bien lo es en muy pequeña cantidad (no más del 2%). Las brucelas Suis y Melitensis utilizan el 20%. El resultado final se obtiene determinando la glucosa final del medio por la prueba cuantitativa de Benedict. La glucosa utilizada se obtiene fácilmente restando de la cantidad inicial la final.

Preparación de sueros monoespecíficos. — Estos sueros son de gran valor en la tipificación si se dispone de sueros satisfactorios. Su preparación no es fácil ya que no se puede establecer ninguna regla empírica que garantice su obtención satisfactoria. Los cultivos utilizados deben encontrarse en fase lisa (S).

Una vez comprobado que los conejos están libres de infección brucélica sometiénolos a una prueba de suero-aglutinación, se procede a modularlos provocándoles una infección activa por inyección de aproximadamente 100 millones de gérmenes vivos de un cultivo de 48 hrs. en la vena auricular. A intervalos se hacen sangrías de prueba. Cuando se observa un título de 1:640 o más se sangran en blanco por la carótida. Generalmente se obtiene el título deseado a la semana de haber aplicado una sola inyección, pero si es necesario se hace una segunda inyección. Se separa el suero y se agrega .5% de fenol. Se suspende el cultivo de la cepa aislada en solución salina y se centrifuga para separar los microorganismos. Los gérmenes centrifugados medidos se agregan a los sueros, se mezclan y la suspensión se incuba a 37°C durante 2 hrs. Al cabo de este tiempo se centrifuga para eliminar las células microbianas, y los

sueros son sometidos a la prueba de aglutinación con *Br. abortus* y *Br. melitensis*. Si no se obtiene una diferenciación satisfactoria, se repite el proceso de absorción una o más veces. Por los resultados de estos ensayos, se puede determinar la cantidad necesaria de gérmenes para la absorción y el número de absorciones necesarias, para luego llevar a cabo este proceso en los lotes completos de sueros. La necesidad de emplear cultivos en fase S, se debe a que si se emplean parcialmente disociados, se puede encontrar cualquier número de grupos antigénicos de brucela, dependiente su mayor o menor cantidad del número de cepas disociadas utilizadas en la preparación y absorción de los sueros. El uso de sueros mal preparados, puede dar lugar a confusiones. Una vez preparados los sueros se les somete a una prueba con un número de cepas en fase S de las tres especies de brucela.

IV.— DISOCIACION.

El término disociación se usa para indicar la transformación de las brucelas en nuevos tipos de colonias durante su ciclo sexual normal de reproducción.

Cada cultivo usado en el estudio de disociación fué identificado como miembro del género brucela y su especie fué determinada por los métodos antes indicados, la forma de crecimiento y el tipo de colonia se determina por:

I.— Examen de las colonias sobre medio de agar, observando su forma, diámetro, opacidad, color, consistencia y textura.

II.— Reacción y comportamiento de una suspensión de células: estabilidad en acriflavina y en solución salina; aglutinabilidad por sueros normales y específicos; antigenicidad, producción de aglutininas en cuyes por antígenos S; virulencia para los cuyes; disociabilidad: 1) durante su crecimiento en medio líquido, 2) formación de colonias de 25° a 37° C.; diferencias en la actividad metabólica.

MÉTODOS USADOS EN EL ESTUDIO Y PRODUCCION DE LAS DIFERENTES FORMAS DE CRECIMIENTO Y TIPOS DE COLONIAS DE BRUCELA.

Para efectuar el estudio de la disociación de la brucela es necesario efectuar previamente cultivos patrón con objeto de determinar la pureza de la colonia, especialmente cuando el germen ha sido aislado de la sangre o de un tejido infectado en donde es común encontrar más de un tipo de colonias. El medio líquido satisfactorio para obtener una rápida disociación del tipo "S" en otros tipos de colonias es el caldo triptosa que contiene: 1.5% de peptona triptosa, 0.5% de glucosa, 0.5% de cloruro de sodio y 0.5mg.% de cloruro de tiamina. El pH se ajusta a 6.7 con H₃PO₄, se filtra por papel y se reparte en tubos que se esterilizan a 115° por 20 min. Los tubos sembrados se incuban a 37° C. sin agitación. Pasados 30 días se toma una asada y se siembra en tript-

tosa agar por estrias, en tal forma que la población de las colonias en ciertas áreas sobre la superficie sea densa y en otras estén separadas. En la zona densamente poblada se observa a menudo diferencias en la apariencia de las colonias, que no pueden verse en las áreas en que las colonias están separadas unas de otras. Las colonias se examinan por primera vez a los cuatro días de incubación a 37° C. Las cajas Petri se colocan después a 20-25° C. en una atmósfera con humedad relativa no menor del 30% y examinadas a intervalos.

El crecimiento es translúcido y húmedo o grasoso en apariencia, cuando se observa desde la tapa o a un ángulo de luz directa.

Algunos de los cambios más sorprendentes en la morfología de las colonias ocurren lentamente durante una larga incubación a temperatura ambiente apareciendo las colonias hijas entre los 4 y 40 días que generalmente son de un tipo diferente al de la colonia madre. Ciertos tipos de colonias madres desarrollan más de un tipo de colonias hijas.

Se puede lograr una disociación del tipo de colonia hija por siembra en tubos de caldo triptosa, examinando los cultivos a intervalos antes descritos. El origen de la colonia tipo se puede determinar en muchos casos por las colonias hijas que dan origen a colonias idénticas a las primeras cuando se siembran en caldo triptosa.

La observación de la morfología de las colonias se hace por el método de Henry de luz oblicua reflejada. El dispositivo consta de un microscopio binocular con aumento de 15 diámetros, un espejo cóncavo que se coloca aproximadamente a una distancia de 10 cm., del microscopio, una lámpara con haz de luz concentrada que se coloca a unos 15 cm. del espejo y a una altura de 10 cm., en esta forma los rayos de la luz se reflejan en el espejo llegando a la placa de cultivo en un ángulo aproximado de 45°. Las especificaciones dadas varían según el tipo de lámparas usadas.

Es difícil por simple observación llegar a conocer las verdaderas características morfológicas de cada tipo de colonia, las que pueden variar de tamaño de acuerdo con la densidad de la población, es más, cuando cierto tipo de colonias crecen sobre placas de agar en presencia de otras de diferente especie son más pequeñas de diámetro y reflejan un color diferente al que tienen cuando son de la misma especie (tipo simple). Los colores que tienen las colonias de brucela son matices pastel y por esto es difícil compararlos con cualquier sistema standard de colores. La consistencia y textura de las colonias se determina por levantamiento con una pequeña espátula. Esta observación puede hacerse debajo de un microscopio de baja potencia (x12).

De acuerdo con esta observación las colonias se clasifican en: grasosas, granulares, pulposas, blandas, mucoide, duramucoides o cerosa-mucoide. La determinación de las diferentes consistencias se relacionan al color en los diferentes tipos de colonias.

Una prueba simple y rápida para determinación del tipo de colonia es la de Braun y Benasteil que se efectúa colocando en una platina una pequeña cantidad de células que se emulsifican con una gota de solución salina, añadiendo una gota de solución acuosa de acriflavina neutra al 1x1000 y se mezcla. Si hay una rápida floculación o formación de gránulos, se trata de la forma "R". La ausencia de esta floculación indica que las colonias pertenecen a la forma "S". En el caso de que se forme un hilillo viscoso las colonias corresponden a la forma "M". Se observa que las células muertas de colonias de más de 5 días de edad modifican los resultados de la prueba. Se puede hacer una modificación de esta prueba tomando con un alambre una pequeña porción de la colonia y mezclándola con una gota de solución acuosa al 1x1000 de acriflavina (pH 8.8) o solución hidrociorídrica (pH 3.8) y se examina inmediatamente sobre la platina del microscopio.

Otra forma rápida de descubrir los diferentes tipos de colonias es el siguiente: Se usa como medio de cultivo agar ALBIMI con la fórmula modificada, de tal manera que contenga 2.5% de agar, 1% de glucosa, y 5% de glicerina. Se preparan placas dejándolas secar por 24 hrs o más para reducir la humedad. Las placas se siembran de tal modo que se obtengan colonias aisladas, y se dejan incubar 96 hrs. a 37° C. Después de la incubación se impregnan con una solución acuosa de cristal violeta al 1/2000 por 15 segundos, se vierte el exceso de colorante en un recipiente con desinfectante, y se observa las placas con un microscopio con poco aumento y con luz oblicua. Las colonias lisas aparecen de un color azul verdoso pálido que contrasta con el fondo violeta pálido. Las colonias variantes tienen un color que varía del rojo al azul rojizo. Si la observación no se hace rápidamente las colonias lisas toman un color violeta cada vez más intenso en la periferia, sin embargo la observación puede hacerse hasta las 96 hrs. Entre las colonias variantes se pueden observar 3 diferentes colores. El color típico de las "R" es un violeta intenso; la mayor parte de los cultivos "M" dan un color rojo azulado más pálido.

Otros colorantes que han sido estudiados con la safranina O: las colonias lisas quedan incoloras o de un color ligeramente rosado, mientras que las colonias "R" aparecen de un color rojo naranja brillante. La safranina "O" sin

embargo no permite diferenciar las variantes "R" de las "M". La eosina y el verde brillante, permiten una ligera diferenciación entre "S" y variantes, mientras que la fucsina ácida, el verde metilo, el rojo congo, el pardo Bismark, el verde malaquita y el negro Sudán no dan una diferenciación.

La estabilidad de las células de los diferentes tipos de colonias se determina preparando una suspensión de 10^7 cel./cc en solución salina en unos tubos pequeños de aglutinación, se incuban a 37°C por 24 hrs. Algunas células de tipo "R" y "M" se sedimentan a las 24 hrs. Esta prueba se hace para determinar la estabilidad de una suspensión de células de un tipo de colonia para usarse como antígeno para estudios de aglutinación. La propiedad aglutinativa de un tipo de colonia no puede ser determinada o comparada con otro tipo en presencia de sueros si la suspensión no permanece estable en un período de 72 hrs. La aglutinabilidad de diferentes suspensiones de células en solución salina se determina en presencia de sueros específicos normales.

La virulencia se determina inyectando por vía subcutánea cuyes de 400 grs. de peso con suspensiones de 10^7 a 10^9 de células vivas. Los cuyes se sacrifican 30 días después de la inyección y se examinan los órganos internos buscando las lesiones y sembrado en agar sólido. Si 10^7 células vivas de un tipo dado producen lesiones en el tejido y los cultivos de éste son positivos, el tipo es altamente virulento. Si 10^9 células vivas de un tipo dado producen lesiones visibles pero al sembrar este tejido no se obtienen o se obtienen muy pocas colonias, el tipo se clasifica como de una virulencia muy baja.

La capacidad de las células de los diferentes tipos de colonias para producir suero-aglutininas para el antígeno tipo S se determina en cuyes simultáneamente a las determinaciones de virulencia. Después de muertos los cuyes, se colectan muestras de sangre y se titulan los sueros con antígeno tipo "S" por la prueba en tubo, incubando a 37° por 48 hrs.

Muchos tipos de colonias de brucela son semejantes cuando se examina su color natural, pero son fácilmente distinguibles cuando crecen sobre agar triptosa conteniendo cloruro de 235 trifetil-tetrazolium al 0.01%. El área central circular de las colonias de la fase "S" de Br. suis toman un color obscuro casi negro, las de Br. abortus presentan una sombra roja y la de Br. melitensis presentan un color rojo más claro que el del abortus. Los bordes de las colonias de Br. suis se colorean de amarillo pálido opaco, las de Br. abortus de un azul verdoso transparente y las de Br. melitensis de un rosado pálido opaco.

Colonias en agar.—Circulares, de bordes irregulares cuando desarrollan a 25°C, convexas, opacas, de consistencia grasosa de diámetro de 1.5 a 2 mm. Las colonias jóvenes presentan el mismo color que las "S" y "R" y las viejas presentan sectores triangulares verdes azulosos alternando con amarillo rojizos.

Estabilidad en acriflavina.—Algunas células son estables y otras son aglutinadas en gránulos o hileras cortas.

Virulencia y Antigenicidad.—Igual a las células de tipo "S".

Disociación.—No se ha logrado obtener libre del tipo "S".

COLONIAS TIPO SI₁, SI₂, SI₃, Sec. SI₁.

Origen.—El tipo SI₁ se origina del tipo S, el SI₂ del tipo SI₁, el Sec. SI₁ y el SI₃ del SI₂, apareciendo a intervalos irregulares en cultivos viejos.

Colonias en agar.—Circulares convexas, ligeramente opacas, de consistencia grasosa, de diámetro de 1.5 a 2.5 mm.

Color.—El tipo SI es igual al S, excepto que el borde es más grisáceo, el tipo SI₂ presenta color amarillo rojizo obscuro en el área central, el tipo SI₃ es más rojizo que el SI₂, los tipos Sec. SI₁ presentan sectores triangulares azul verdoso y verde grisáceo.

Estabilidad en acriflavina.—Todos los tipos de células son estables excepto el SI₃ que se aglutina en forma de finos gránulos o hilillos cortos.

Virulencia.—El número de células vivas que producen infección en el cuy, varían de 10⁴ a 10⁶, dependiendo del tipo S-M usado.

Antigenicidad.—Todos los tipos producen aglutininas para el antígeno tipo S y SI.

Disociación.—El tipo SI₁ en caldo triptosa en el transcurso de 3 a 10 días, origina 2 tipos R diferentes, Sec. SI₁ y SI₂. Las colonias tipo SI en tubos de caldo triptosa en el lapso de 3 a 10 días dan colonias de 3 tipos mucoides diferentes.

FORMA RUGOSA

COLONIAS TIPO R₁, R₂, R₃, R₄.

Origen.—Las colonias tipo rugosa aparecen en cultivos de células tipo SI₁ en caldo triptosa dentro de un período de 5 a 20 días. Las células tipo R₃, hau

Colonias en agar.—Circulares, de bordes irregulares cuando desarrollan a 25°C, convexas, opacas, de consistencia grasosa de diámetro de 1.5 a 2 mm. Las colonias jóvenes presentan el mismo color que las "S" y "R" y las viejas presentan sectores triangulares verdes azulosos alternando con amarillo rojizos.

Estabilidad en acriflavina.—Algunas células son estables y otras son aglutinadas en gránulos o hileras cortas.

Virulencia y Antigenicidad.—Igual a las células de tipo "S".

Disociación.—No se ha logrado obtener libre del tipo "S".

COLONIAS TIPO SI₁, SI₂, SI₃, Sec. SI₁.

Origen.—El tipo SI₁ se origina del tipo S, el SI₂ del tipo SI₁, el Sec. SI₁ y el SI₃ del SI₂, apareciendo a intervalos irregulares en cultivos viejos.

Colonias en agar.—Circulares convexas, ligeramente opacas, de consistencia grasosa, de diámetro de 1.5 a 2.5 mm.

Color.—El tipo SI es igual al S, excepto que el borde es más grisáceo, el tipo SI₂ presenta color amarillo rojizo obscuro en el área central, el tipo SI₃ es más rojizo que el SI₂, los tipos Sec. SI₁ presentan sectores triangulares azul verdoso y verde grisáceo.

Estabilidad en acriflavina.—Todos los tipos de células son estables excepto el SI₃ que se aglutina en forma de finos gránulos o hilillos cortos.

Virulencia.—El número de células vivas que producen infección en el cuy, varían de 10⁴ a 10⁶, dependiendo del tipo S-M usado.

Antigenicidad.—Todos los tipos producen aglutininas para el antígeno tipo S y SI.

Disociación.—El tipo SI₁ en caldo triptosa en el transcurso de 3 a 10 días, origina 2 tipos R diferentes, Sec. SI₁ y SI₂. Las colonias tipo SI en tubos de caldo triptosa en el lapso de 3 a 10 días dan colonias de 3 tipos mucoides diferentes.

FORMA RUGOSA

COLONIAS TIPO R₁, R₂, R₃, R₄.

Origen.—Las colonias tipo rugosa aparecen en cultivos de células tipo SI, en caldo triptosa dentro de un período de 5 a 20 días. Las células tipo R₃, han

M₁ difícilmente se suspenden en acriflavina, aglutinándose en largos hilos.

Virulencia.—Ningunas células del tipo mucóide producen infección progresiva en el cuy aunque se han encontrado tipos de colonias de células M₁ y M₂ en el bazo 30 días después de la inyección subcutánea.

Antigenicidad.—No se producen aglutininas en los cuyes para el antígeno "S" por inyección de suspensión de células vivas (10°).

Disociación.—El tipo M₁ no se disocia en otro tipo de colonias. Cultivos del tipo M₁ en el transcurso de 30 a 50 días, muestran la presencia de tipos Sec M₂ que no puede ser obtenido como tipo puro. El tipo M₁ cuando crece en el caldo triptosa pasados 3 a 5 días, da origen a los tipos M₁, M₂ y PS (pseud-smooth). Los tipos M₁ y M₂ no desarrollan colonias hijas.

El tipo M₁ origina una pequeña cantidad de tipo mucóide semejante a él en color y consistencia.

El tipo M₂ parece ser estable.

El tipo mucóide no es reversible al tipo S o SL.

OTRAS FORMAS.

COLONIAS TIPO PSEUDO LISA.

Origen.—Se originan de células tipo M₁ en caldo triptosa.

Colonias en agar.—Circulares, convexas, opacas, de consistencia aceitosa de color semejante al tipo S pero más opacas, siendo esto una dificultad para distinguirlas de ellas. Su diámetro es de 1.5 a 2 mm.

Estabilidad en acriflavina.—Las células son aglutinadas en gránulos pequeños y grandes.

Virulencia y antigenicidad.—Similar a los tipos mucóide.

Disociación.—No se ha observado disociación en otros tipos ni reversión al tipo "S". No forma colonias hijas sobre agar.

M₁ difícilmente se suspenden en acriflavina, aglutinándose en largos hilos.

Virulencia.—Ningunas células del tipo mucóide producen infección progresiva en el cuy aunque se han encontrado tipos de colonias de células M₁ y M₂ en el bazo 30 días después de la inyección subcutánea.

Antigenicidad.—No se producen aglutininas en los cuyes para el antígeno "S" por inyección de suspensión de células vivas (10⁹).

Disociación.—El tipo M₁ no se disocia en otro tipo de colonias. Cultivos del tipo M₁ en el transcurso de 30 a 50 días, muestran la presencia de tipos Sec M₂ que no puede ser obtenido como tipo puro. El tipo M₁ cuando crece en el caldo triptosa pasados 3 a 5 días, da origen a los tipos M₁, M₂ y PS (pseud-smooth). Los tipos M₁ y M₂ no desarrollan colonias hijas.

El tipo M₁ origina una pequeña cantidad de tipo mucóide semejante a él en color y consistencia.

El tipo M₂ parece ser estable.

El tipo mucóide no es reversible al tipo S o Sl.

OTRAS FORMAS.

COLONIAS TIPO PSEUDO LISA.

Origen.—Se originan de células tipo M₁ en caldo triptosa.

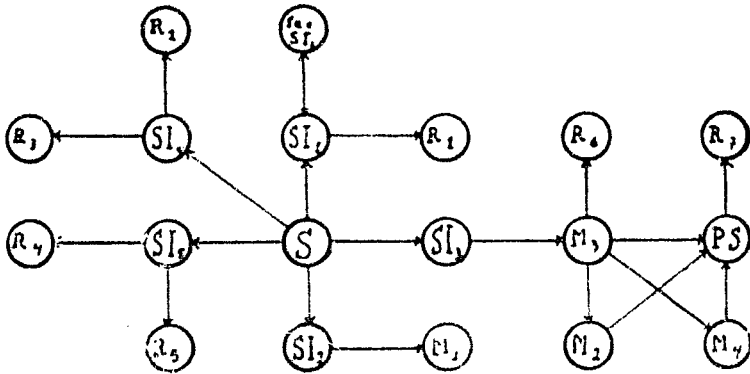
Colonias en agar.—Circulares, convexas, opacas, de consistencia aceitosa de color semejante al tipo S pero más opacas, siendo esto una dificultad para distinguirlas de ellas. Su diámetro es de 1.5 a 2 mm.

Estabilidad en acriflavina.—Las células son aglutinadas en gránulos pequeños y grandes.

Virulencia y antigenicidad.—Similar a los tipos mucóide.

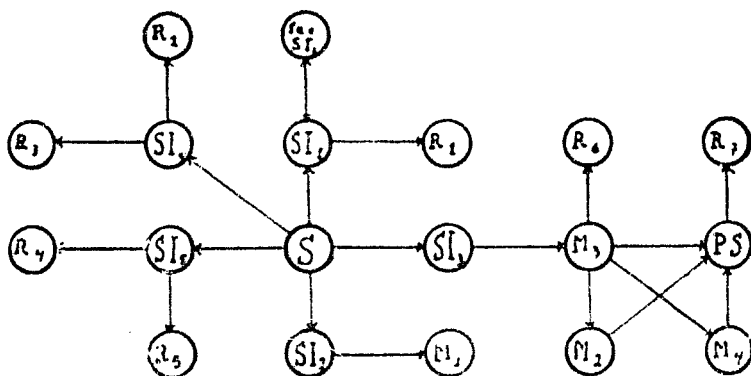
Disociación.—No se ha observado disociación en otros tipos ni reversión al tipo "S". No forma colonias hijas sobre agar.

DISOCIACION DE LA BRUCELLA MELITENSIS.



La disociación de la brucela melitensis se efectúa más lentamente que en la *Br. abortus* y *Br. suis*. Un estudio de dos cepas de tipo S y S SI de *Br. melitensis*, revelan la disociación tipo. Se han estudiado parcialmente 19 tipos de colonias que difieren unas de otras en el número y morfología de las colonias tipo mucóide y en el número, origen y carácter de los tipos R.

DISOCIACION DE LA BRUCELLA MELITENSIS.



La disociación de la brucela melitensis se efectúa más lentamente que en la Br. abortus y Br. suis. Un estudio de dos cepas de tipo S y 5 SI de Br. melitensis, revelan la disociación tipo. Se han estudiado parcialmente 19 tipos de colonias que difieren unas de otras en el número y morfología de las colonias tipo mucoides y en el número, origen y carácter de los tipos R.

embargo no permite diferenciar las variantes "R" de las "M". La rosina y el verde brillante, permiten una ligera diferenciación entre "S" y variantes, mientras que la fucsina ácida, el verde metilo, el rojo congo, el pardo Bismark, el verde malaquita y el negro Sudán no dan una diferenciación.

La estabilidad de las células de los diferentes tipos de colonias se determina preparando una suspensión de 10^7 células en solución salina en unos tubos pequeños de aglutinación, se incuban a 37°C por 24 hrs. Algunas células de tipo "R" y "M" se sedimentan a las 24 hrs. Esta prueba se hace para determinar la estabilidad de una suspensión de células de un tipo de colonia para usarse como antígeno para estudios de aglutinación. La propiedad aglutinativa de un tipo de colonia no puede ser determinada o comparada con otro tipo en presencia de sueros si la suspensión no permanece estable en un período de 72 hrs. La aglutinabilidad de diferentes suspensiones de células en solución salina se determina en presencia de sueros específicos normales.

La virulencia se determina inyectando por vía subcutánea cuyes de 40.1 grs. de peso con suspensiones de 10^7 a 10^9 de células vivas. Los cuyes se sacrifican 30 días después de la inyección y se examinan los órganos internos buscando las lesiones y sembrado en agar sólido. Si 10^7 células vivas de un tipo dado producen lesiones en el tejido y los cultivos de éste son positivos, el tipo es altamente virulento. Si 10^9 células vivas de un tipo dado producen lesiones visibles pero al sembrar este tejido no se obtienen o se obtienen muy pocas colonias, el tipo se clasifica como de una virulencia muy baja.

La capacidad de las células de los diferentes tipos de colonias para producir suero-aglutininas para el antígeno tipo S se determina en cuyes simultáneamente a las determinaciones de virulencia. Después de muertos los cuyes, se colectan muestras de sangre y se titulan los sueros con antígeno tipo "S" por la prueba en tubo, incubando a 37° por 48 hrs.

Muchos tipos de colonias de brucela son semejantes cuando se examina su color natural, pero son fácilmente distinguibles cuando crecen sobre agar triptosa conteniendo cloruro de 2,3,5 trifenil-tetrazolium al 0.01%. El área central circular de las colonias de la fase "S" de Br. suis toman un color oscuro casi negro, las de Br. abortus presentan una sombra roja y la de Br. melitensis presentan un color rojo más claro que el del abortus. Los bordes de las colonias de Br. suis se colorean de amarillo pálido opaco, las de Br. abortus de un azul verdoso transparente y las de Br. melitensis de un rosado pálido opaco.

Cultivos para siembra.

Una vez que se ha comprobado que los cultivos son de colonias lisas puras, se siembra una cantidad adecuada para obtener suficiente cosecha en tubos, los que se ponen a incubar a 37° C. durante 48 hrs.

En seguida se prepara una solución de NaCl al 0.85% estéril y asépticamente se cubre el cultivo de los tubos, se agita suavemente hasta que todo el crecimiento se desprenda y quede suspendido en la solución.

La suspensión de uno de los tubos se vierte a una botella aspiradora provista de una campana protectora, que contiene 900 cc. de una solución estéril de NaCl al 0.85%. De esta manera queda preparada la suspensión madre para la siembra, que tiene aproximadamente 5×10^7 gérmenes por cc. 5cc. de esta suspensión son agregados a cada botella Roux de medio de cultivo y para obtener una suspensión uniforme se hace girar suavemente la botella. Una vez hecha la siembra, la botella se invierte y se coloca en la incubadora en posición horizontal durante 72 hrs. a 37.5° C. Pasado este tiempo las botellas se examinan al microscopio, desechando las que estén contaminadas, así como en las que el medio se haya despegado. El agua de condensación y el exceso de líquido de siembra se eliminan flameando la boca de la botella. La eliminación de estos líquidos es importante por que contienen elementos que pueden afectar la sensibilidad del antígeno. A cada botella se agrega de 50 a 60 cc. de la solución estéril de NaCl conteniendo 0.5% de fenol. La botella se agita suavemente hasta que el crecimiento queda suspendido. La suspensión microbiana de cada botella se recoge en un recipiente estéril de vidrio. Enseguida se hace un control de pureza haciendo un frotis de la suspensión y coloreándola con Gram.

Si por el examen microscópico del frotis se ve que la suspensión es satisfactoria, se filtra a través de algodón estéril no absorbente. La suspensión se pone a centrifugar en una super centrifuga Sharples a 25,000 R.P.M., separándose la porción líquida, eliminando así cualquier substancia soluble del medio.

Los organismos de brucela en forma de pasta se colocan en botellas taradas, de boca ancha y con tapón estéril, anotándose el peso de la pasta. Se agregan aproximadamente 2 partes de la solución estéril NaCl al 0.85% con 0.5% de fenol. Se amarra el tapón y se agita durante 4 hrs., con el fin de obtener una suspensión homogénea. La suspensión concentrada se pone en la autoclave durante 30 min. a 100°C. De esta manera queda preparada la suspensión madre con la cual se preparan tanto el antígeno para la prueba lenta en tubo como el antígeno para la prueba rápida en placa.

Cultivos para siembra.

Una vez que se ha comprobado que los cultivos son de colonias lisas puras, se siembra una cantidad adecuada para obtener suficiente cosecha en tubos, los que se ponen a incubar a 37° C. durante 48 hrs.

En seguida se prepara una solución de NaCl al 0.85% estéril y asépticamente se cubre el cultivo de los tubos, se agita suavemente hasta que todo el crecimiento se desprenda y quede suspendido en la solución.

La suspensión de uno de los tubos se vierte a una botella aspiradora provista de una campana protectora, que contiene 900 cc. de una solución estéril de NaCl al 0.85%. De esta manera queda preparada la suspensión madre para la siembra, que tiene aproximadamente 5×10^8 gérmenes por cc. 5cc. de esta suspensión son agregados a cada botella Roux de medio de cultivo y para obtener una suspensión uniforme se hace girar suavemente la botella. Una vez hecha la siembra, la botella se invierte y se coloca en la incubadora en posición horizontal durante 72 hrs. a 37.5° C. Pasado este tiempo las botellas se examinan al microscopio, desechando las que estén contaminadas, así como en las que el medio se haya despegado. El agua de condensación y el exceso de líquido de siembra se eliminan flameando la boca de la botella. La eliminación de estos líquidos es importante por que contienen elementos que pueden afectar la sensibilidad del antígeno. A cada botella se agrega de 50 a 60 cc. de la solución estéril de NaCl conteniendo 0.5% de fenol. La botella se agita suavemente hasta que el crecimiento queda suspendido. La suspensión microbiana de cada botella se recoge en un recipiente estéril de vidrio. En seguida se hace un control de pureza haciendo un frotis de la suspensión y coloreándola con Gram.

Si por el examen microscópico del frotis se ve que la suspensión es satisfactoria, se filtra a través de algodón estéril no absorbente. La suspensión se pone a centrifugar en una super centrifuga Sharples a 25,000 R.P.M., separándose la porción líquida, eliminando así cualquier sustancia soluble del medio.

Los organismos de brucela en forma de pasta se colocan en botellas tarradas, de boca ancha y con tapón estéril, anotándose el peso de la pasta. Se agregan aproximadamente 2 partes de la solución estéril NaCl al 0.85% con 0.5% de fenol. Se amarra el tapón y se agita durante 4 hrs., con el fin de obtener una suspensión homogénea. La suspensión concentrada se pone en la autoclave durante 30 min. a 100°C. De esta manera queda preparada la suspensión madre con la cual se preparan tanto el antígeno para la prueba lenta en tubo como el antígeno para la prueba rápida en placa.

El volumen de gérmenes se determina poniendo exactamente con una pipeta, 0.2 cc. de la suspensión en cada uno de los cuatro tubos, a los que previamente se les ha puesto 4.8 cc. de agua destilada, quedando 5 cc. de volumen en cada tubo. Se ponen a centrifugar 75 min. a 2750 R. P. M. tomando el promedio de la lectura de los 4 tubos para calcular el volumen de los gérmenes en la forma siguiente: Si el promedio de la lectura es 0.02, se multiplica por 5 para obtener el equivalente para 1 cc. y éste por 100 da el 10% de la concentración de gérmenes. Si es necesario se corrige la densidad agregando más suspensión original o más diluyente. Para cada litro de suspensión se agregan 6 cc. de una solución que contenga 1 parte de solución acuosa de verde brillante al 1%. El antígeno se filtra por algodón no absorbente estéril para eliminar cualquier substancia coagulada por el color. La sensibilidad del antígeno se compara con antígenos de tipo standard.

PREPARACION DEL ANTIGENO PARA LA PRUEBA DEL ANILLO EN LECHE.

Este antígeno se prepara a partir de la cepa 1119-3 de brucela abortus.

Para la producción masiva de estos microorganismos se hace en igual forma que se hizo en la preparación del antígeno de placa y tubo. Se emplean cultivos de 305 días en agar los cuales se lavan con una solución salina. Se filtra para separar los restos de agar y se agrega aproximadamente el doble del volumen de agua destilada. La solución colorante se prepara como sigue:

REACTIVO I.

Se disuelven 9 grs. de sulfato de aluminio y amonio en 100 cc. de agua destilada. Se agregan 30 cc. de glicerina.

REACTIVO II.

Se disuelven 1.2 grs. de hematoxilina en 2 cc. de alcohol (95%); se calienta a 50°C. Se afora a 100 cc. con agua destilada.

Se mezclan el reactivo I y II y se agregan 0.17 grs. de yodato de sodio disueltos en 2 cc. de agua destilada. Se deja reposar el reactivo durante 15 min. para lograr su oxidación, esta se diluye al 1:4 y 1:6 con sulfato de aluminio y amonio concentrado (10%). Se deja reposar el colorante diluido de 12 a 20

hrs. a temperatura ambiente y se filtra para separar las sustancias insolubles. Una vez listo el colorante, se agregan una suspensión de bacterias estabilizadas a un pH de 4 en la proporción de 10 grs. de pasta para 1200 a 1400 cc. del colorante diluido. La suspensión se deja reposar 48 horas a la temperatura del cuarto o bien se calienta en un baño de agua hasta que la temperatura de la mezcla llegue a 65°C. Se mantiene la temperatura por 3 o 5 min. y se enfría. De cualquier forma las células bacterianas tomarán una coloración púrpura azulada oscura. La suspensión se centrifuga a 2600 a 2800 R. P. M. Se decanta el líquido sobrenadante, y se lava 3 veces centrifugando y resuspendiendo la pasta bacteriana con una solución al 0.4% de cloruro de sodio con 0.1 de una solución molar de ácido láctico, lo que equivale a 0.9 cc. de ácido en 1 Lt. de lavado. Enseguida se ajusta el pH a 4 con NaOH al 10%. La suspensión final de las células se hace en solución salina de una densidad de 4% del volumen que se determinó en los tubos de Hopkins. El pH final deberá ser de 4.0 a 4.3.

VI.— PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS HUMANA

Se entiende por brucelosis la infección del hombre o los animales con cualquiera de las 3 especies de brucela: abortus, melitensis y suis.

En general los síntomas clínicos varían en el hombre de acuerdo con la especie que origina la infección, pero en algunas ocasiones la infección puede persistir en el organismo sin que se presenten síntomas clínicos. La prueba del cultivo del germen es la que determina con mayor certeza la existencia de la brucela.

Cultivo bacteriológico.— Un requisito para obtener éxito en el aislamiento de brucela es que todas las operaciones se efectúen asépticamente tales como recolección y preparación de especímenes, inoculación del medio, inyección de los animales del laboratorio.

El aislamiento inicial del germen de la sangre y otros líquidos orgánicos se hace en medios líquidos, debido al escaso número de brucelas que se encuentran. Generalmente se usan las infusiones de hígado, ternera, carne de res o papa, aunque se prefieren los medios de Albini y tripticasa soya. La forma en que se hace el hemocultivo es la siguiente: Se colocan 75 cc. del medio de cultivo en frascos de cultivo y se agregan de 1 a 2% de citrato de sodio y se esterilizan. Se introducen de 5 a 10 cc. de sangre o del líquido orgánico y se incuban a 37°C. en un recipiente que contiene 10% de CO₂, después de 4 días y a intervalos regulares se hacen siembras en la superficie del medio sólido de agar, y se siembran con pipeta 0.2 cc. Esta prueba se hace también en condiciones aeróbicas.

En la actualidad se usa el método de Ruiz Castañeda que presenta la ventaja de reducir las manipulaciones, y por lo tanto las contaminaciones, y los accidentes personales en los trasposos bacteriológicos secundarios, por ser un medio que consta de una fase sólida y una fase líquida. El medio sólido se prepara de la siguiente manera:

Bacto-triptosa.....	2 grs.
Cloruro de sodio.....	5 grs.
Agar.....	3.0 grs.
Agua destilada.....	100 cc.

En un frasco de siembra se colocan 15 cc. del medio, la boca de la botella (1.25 cm.) se tapa con papel estaño y se esterilizan a 15 lbs. por 15 mín. Las botellas se inclinan y se deja que el medio solidifique, se quita el papel y se añaden 10 cc. de caldo triptosa que contiene 2% de Bactotriptosa y 2% de citrato de sodio, que se esteriliza por separado, se tapa con tapón de hule estéril. En algunas botellas se inyecta CO₂ por medio de una jeringa. Antes de usar este medio doble se hace control de esterilidad. Se hace la inoculación con 10 cc. de sangre tomada en condiciones asépticas. La mezcla de sangre y caldo se extiende por un momento sobre la superficie del agar y se incuba a 36°C. Cada tercer día el caldo se extiende por la capa de agar y se incuba otra vez en posición vertical.

Resultados.— Cuando la capa de agar presenta colonias a las 24-48 hrs. es probable que el cultivo se haya contaminado. Cuando las colonias aparecen a las segundas 24 a 48 hrs. después de la segunda inoculación el organismo que desarrolla es *Salmonella* menos frecuentemente *Estafilococo* o *Estreptococo* pero puede ser *Brucella*.

Cultivos positivos de brucela se determinan después de la tercera inoculación del agar o sea al tercer día de sembrado. A los 20 días los cultivos negativos se pueden desechar.

El citrato de sodio que se agrega no sólo evita la coagulación sino que reduce la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfo-nucleares a un mínimo.

Prueba de aglutinación en sueros.— Esta prueba siempre da resultados significativos cuando existe una infección activa. Cuando los resultados son sospechosos o negativos se repiten las pruebas antes de decidir que no se trata de brucelosis. En los casos sospechosos un título alto (1:80) o en aumento, constituyen una prueba presuntiva de infección. Los títulos bajos (1:20) indican baja probabilidad de infección. Esta prueba se puede efectuar según el método lento o bien el rápido en placa siendo éste último el más usado. Es importante que el padecimiento tenga por lo menos una semana de evolución para que se hayan formado suficientes aglutininas en el organismo. El título 1:100 se considera como positivo indicando brucelosis.

Existen otras pruebas que se emplean con fines de diagnóstico que no son muy empleadas, sin embargo en muchos casos han confirmado o rechazado un diagnóstico.

Prueba Opsonocitofágica.— Se toma sangre del paciente, unos 5 cc. aproximadamente y se le añaden .2 cc. de citrato de sodio al 20% en suero fisio-

lógico. Se agita y se centrifuga. Se separa la parte superior y 1 cc. del plasma se le añade 1 cc. de una suspensión de brucelas vivas en solución salina recientemente preparada. La cepa que se emplea debe ser susceptible a la fagocitosis. Se incuba a 37°C. 30 min. Enseguida se hace un frotis que se tiñe con Wright, Giemsa o azul de metileno. El índice opsonico se puede expresar por el número de brucelas fagocitadas por cada 100 leucocitos o bien el % de leucocitos que han fagocitado no importa el número de bacterias.

Un índice superior a 50 indica una posible infección por brucela.

Prueba Intradérmica o de la Melitina.—Esta es una prueba de tipo alérgico. Se requiere un extracto proveniente de un filtrado de cultivos viejos de brucela. Con este extracto se hace una inyección subcutánea de .1 cc. y se observa el resultado antes de 24 horas. Una reacción positiva se manifiesta por un enrojecimiento al rededor del piquete que es intensamente positiva entre las 6 y 12 hrs. que siguen a la inyección.

La fórmula leucocitaria nos puede sugerir la posible infección de brucela.

Inoculación a animales.—Tiene especial valor cuando las muestras provienen de un medio fuertemente contaminado. El inóculo se mezcla en una solución de penicilina (500 unidades por cc.) para evitar el efecto de algunos gérmenes de contaminación. La inoculación se hace por vía subcutánea. El animal se sacrifica a 4 a 6 semanas después de la inoculación, se toma sangre, se hace la prueba de sero-aglutinación, se buscan las lesiones macroscópicas y se hacen cultivos del bazo.

Inoculación en huevo.—Las brucelas se desarrollan rápidamente en el embrión del pollo. Los huevos embrionados de 4 a 7 días se inoculan en el saco vitelino. Tres días después se cultiva el hígado del embrión del pollo. Las brucelas se multiplican abundantemente aunque sólo se inoculen muy pocos organismos. Las brucelas así aisladas se encuentran generalmente disociadas. Este método tiene éxito cuando se trata de sangre, coágulo o líquido cerebro espinal.

Una prueba valiosa es la de Ruiz Castañeda o de Fijación de superficie.

Preparación del Antígeno y Prueba.—Se hacen cultivos de brucela abortus y brucela melitensis en una infusión de agar hígado durante 48 hrs. Se lava el crecimiento con solución salina y se filtra a través de algodón estéril, se agrega una solución de formol al 10%. Se deja a temperatura ambiente 24 hrs. y se centrifuga, el sedimento se suspende en un pequeño volumen de

agua destilada. Esta suspensión se trata con sulfato ferroso. La suspensión se tinte con una solución acuosa recién preparada de hematoxilina casi negra, se deja reposar toda la noche. Se centrifuga y el sedimento resuspendido en 4 volúmenes de solución isotónica de cloruro de sodio. El papel filtro que se usa es el E. D. No. 609. Esta prueba puede ser realizada por dos métodos que son los siguientes:

A).—El suero y el antígeno son llevados con una asa de platino a una placa en donde se mezclan. Una asada de la mezcla se lleva a la parte inferior de un papel filtro en tira a 1 cm. aproximadamente de la orilla. Inmediatamente para evitar la evaporación se coloca la tira en posición vertical en una solución isotónica de cloruro de sodio a 0.5 cm. de profundidad. El ascenso del líquido sobre la mezcla la cual puede o no ser lavada hacia arriba con la solución salina que asciende.

B).—El fenómeno se observa poniendo una asada de 4 mm. de suero en un pedazo de papel filtro. Una vez que el suero se ha extendido al máximo, se deposita en el centro de la mancha una gota de antígeno tomada con una asa de 2 mm. Con la misma asa se colocan gotas de solución salina isotónica sobre el antígeno que puede o no ser empujada del lugar donde fué depositado.

Resultados.—En el procedimiento A) Si se usa un suero normal, gran parte del antígeno es lavado hacia arriba en el ascenso del líquido, dejando pequeñas trazas de él en la parte inferior del papel. Esto ocurre también si se usa tinta negra Parker 51 en vez del antígeno. Cuando el suero es de personas que padecen de brucelosis en evolución, la mezcla de suero inmune y el antígeno deja una mancha negra prácticamente inalterable en el lugar donde fué puesta. Siempre se hace un control con suero normal. Esto se realiza en menos de 1 min. La diferencia entre la conducta de un suero normal y un suero inmune está en que el suero normal actúa como un coloide protector sobre el antígeno (también sobre la tinta), impidiendo su fijación al papel de ahí que pueda ser fácilmente lavado en el ascenso del líquido. Cuando se trata de un suero inmune, el efecto del coloide protector falta, debido a que ha sido modificado en su condición eléctrica causando su unión con el anticuerpo. En el procedimiento B) Si el antígeno se coloca en una mancha de suero normal, la adición de solución salina empuja el antígeno a la periferia. Si es un suero inmune, la adición de solución salina no tiene efecto y la mancha permanece en el lugar donde fué puesta. La intensidad

del fenómeno de fijación depende del contenido de anticuerpos en el suero, esto demuestra con suero de paciente que sufre brucelosis en evolución y permanece activo aunque las aglutininas son de muy bajo título.

En resumen. esta prueba demuestra la unión del antígeno anticuerpo realizada en la superficie del papel filtro y sometida al efecto del lavado de una corriente de solución salina isotónica.

Mientras el suero normal es lavado junto con el antígeno, el suero inmune produce fijación del antígeno en el papel, en el lugar donde fué depositado.

VII.—PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS EN LOS ANIMALES.

Prueba de seroaglutinación.—Está considerada como el método más digno de crédito para descubrir infecciones en animales individuales. Esta prueba puede realizarse en tubo o en placa. En la primera prueba la lectura se hace después de 40 a 48 hrs. de incubación a 37.5°. La aglutinación de los gérmenes del antígeno bajo la forma de grumos y su depósito en el fondo del tubo, determina la clarificación del líquido del tubo, manteniéndose los copos firmes aún después de una leve agitación. La aglutinación es el resultado directo de la acción específica de las aglutininas del suero que se forman en el organismo animal a raíz de la infección con brucela. En la prueba en placa, la lectura se hace a los 8 min. Si esta prueba se realiza correctamente, proporciona resultados comparables a la de tubo. Esta prueba se puede efectuar en suero sanguíneo o en suero de leche. Para obtener el suero de la leche, se agrega a la muestra 2 a 3 gotas de extracto de cuajo o Renina y se pone a la estufa a 37.5° hasta que la leche esté cuajada. El suero se centrifuga, empleando la misma técnica que se sigue con suero de sangre. El fenómeno de zona o sea que hay aglutinación en las diluciones más altas pero no en las más bajas, es más común en la leche que en la sangre, por eso se emplea el sistema de diluciones múltiples.

Respecto a las reacciones cruzadas, algunos títulos sospechosos en los animales se puede deber a infecciones temporales con microorganismos que tengan caracteres antigénicos en común con la brucelas, por ejemplo con el *Vibrio Comma*, *Vibrio Fetus*, *Pasteurella Tularensis* y *Salmonella Pullorum*.

Prueba del Anillo.—(ABR). Esta prueba se realiza en hatos no en individuos, esto es, cuando se junta la leche de 5 a 12 vacas.

Naturaleza de la Prueba.—Es necesaria la presencia de crema. Al agregar el antígeno coloreado especial para esta prueba, las aglutininas de la leche, específicas para brucela, aglutinan las células de brucela, de tal manera

que cuando al subir la crema como está compuesta de gran número de glóbulos de grasa, arrastra hacia arriba las células coloreadas, apareciendo encima de la muestra de leche como un anillo color púrpura azulado. Si la muestra de la leche no contiene aglutininas para brucela, el antígeno se aglutina permaneciendo en la porción descremada de la leche.

Aislamiento de brucela de los órganos.— Se logra haciendo un frotis directamente sobre la superficie medio de agar sólido. El espécimen debe flamearse, seccionarse y la superficie recién cortada triturarse antes de hacer el frotis en la superficie del medio. Algunas placas se incuban en CO_2 y se examinan durante 5 o 7 días, ya que la brucela crece lentamente.

Entre otras pruebas de diagnóstico tenemos cultivos de sangre, fijación de complemento con material de placenta, examen bacteriológico de materiales sospechosos, examen microscópico empleando colorante Koster o sus modificaciones. Con este método las brucelas se tiñen de rojo en contraste con el fondo que es azul violeta. Los bacilos que se pueden encontrar en un frotis de placenta, son únicamente brucela y *mycobacterium tuberculosis* que se tiñen de rojo. La coloración se hace de la siguiente forma:

El frotis se seca y se fija sobre una flama, enseguida se cubre la preparación con una mezcla de 5 partes de solución normal de KOH y 2 partes de una solución saturada de safranina durante 1 min. se lava; se cubre durante 10—20 seg. con una solución de H_2SO_4 al 1%. lavar bien. Se usa como colorante de contraste una solución de azul de metileno fenicado durante 2 o 3 seg.

VIII.—TRABAJOS EFECTUADOS Y CONCLUSIONES.

Los trabajos llevados a cabo en los tres primeros capítulos fueron con el objeto de prepararme para la obtención del antígeno; en primer lugar, identifiqué el microorganismo efectuando pruebas con cultivos conocidos de brucela abortus, observé sus características, propiedades, virulencia, etc. Una vez hecho esto, procedí a diferenciar las tres especies de brucela efectuando pruebas bioquímicas y serológicas; de ellas la mejor para establecer esa diferenciación no solo entre las tres especies de brucela sino también entre otros organismos que poseen fracciones antigénicas homólogas, es la prueba de aglutinación con sueros monoespecíficos. La preparación de estos sueros la efectué después de haber hecho el estudio de las diferentes fases de la disociación ya que fué necesario seleccionar colonias en fase lisa. Inoculé tres conejos por la vena auricular; dos de ellos dieron el título requerido a la semana de haber sido inyectados, el tercero fué necesario aplicarle una segunda inyección. Preparé emulsiones de cepas aisladas, procurando que siempre tuvieran la misma concentración, determinada en un nefelómetro. Utilicé sueros estandar abortus y melitenses, diluidos al 50% con suero fisiológico. En un tubo coloqué 1.4 cc. de suero y .5 cc. de la emulsión de la cepa por identificar. La prueba la hice por duplicado para poner en contacto los gérmenes con cada suero. Con la cepa de brucela melitensis desaparecieron las aglutininas del suero homólogo dejando casi íntegras las de abortus, esto significa que fijó las aglutininas homólogas y parcialmente las heterólogas. Las especies abortus y suis absorben totalmente las homólogas dejando casi íntegras las heterólogas.

Al efectuar la prueba de requerimiento de CO_2 , observé que la brucela abortus puede llegar a desarrollarse en atmósfera normal, es decir, que con el tiempo pierde ésta propiedad.

El estudio de la disociación de las tres especies de brucela lo hice primero con cepas puras ya identificadas con el objeto de ir conociendo y esta-

diando las diferentes fases de cada especie. Del conocimiento e identificación de estas variedades, depende una correcta preparación del antígeno, ya que es necesario efectuar previamente una selección de colonias lisas que son las empleadas en esta preparación. La selección se hace siempre en las mismas condiciones de iluminación, aumento del microscopio, con el ángulo de luz reflejada de 45°, etc., todo esto con objeto de evitar errores al variar alguna de estas condiciones.

Las cepas utilizadas en la preparación del antígeno son las siguientes: 1119-3-24, 1119-3-25, 1119-3-32, que me fueron proporcionadas en el Instituto de Investigaciones Pecuarias de Palo Alto, obteniendo con todas ellas resultados satisfactorios. La selección de colonias y su resiembra se efectúa periódicamente con objeto de evitar su disociación. La siembra se hace en un medio sólido. Los medios de agar-papa y tripticasa-soya o Albimi son excelentes para este objeto. Observé que los cultivos que dejaba en la incubadora más de 4 días o también a la temperatura del cuarto, se disociaban con facilidad. Después de observar los cultivos en diferentes condiciones la mejor forma de evitar la disociación es conservarlos 4 días en la incubadora y después en el refrigerador. El medio de cultivo lo preparaba 4 o 5 días antes pues si se utiliza demasiado fresco se desprende y el agua de condensación ocasiona la disociación del cultivo. Para lograr una rápida disociación empleé medios líquidos de preferencia el caldo triptosa. De ahí pasé a placas de agar-triptosa o de agar-papa sembrando en estrias y procurando que en un lado de la placa estuvieran juntas y en otro separadas con el fin de observar el crecimiento en una zona densamente poblada y las colonias aisladas, y las variaciones que ocurren en color y tamaño cuando crecen puras o junto con otras especies diferentes. Una prueba rápida para observar las colonias variantes es la de la acriflavina, y tanto ésta como la de la solución acuosa de cristal violeta fueron las que más utilicé en mi estudio.

Con objeto de observar las lesiones producidas en los cuyes, hice inoculaciones con cepas altamente virulentas y de baja virulencia. Hice cultivos con los órganos lesionados, recuperando brucelas de las cepas altamente virulentas. Las cepas de baja virulencia producen lesiones en los cuyes, pero no es posible recuperar las brucelas por cultivo. Las cepas de brucela suis son más virulentas que las de abortus, pues los gérmenes necesarios para producir infección son en menor número si se trata de la primera, y además observé que el paso de la forma lisa a lisa intermedia se verifica rápidamente

a pesar que se trate de evitar. La disociación en la brucela melitensis es más lenta que en la suis y abortus.

Una vez efectuado el estudio de las diferentes variedades, seleccioné colonias lisas. La siembra la hice en varios medios de cultivo tales como agar hígado, agar soya tripticasa, agar glicerinado glucosado, agar papa, y otro substituyendo la papa por camote, éste último sin resultados satisfactorios. Con el que obtuve mejores resultados es el de agar papa. La concentración de la suspensión de gérmenes para hacer la siembra la determiné con un nefelómetro. A pesar que el método recomienda que el líquido sobrante al hacer la siembra se elimine hasta que se haga la recolección, la hice inmediatamente después de haber bañado la superficie del medio, logrando de esta manera un mejor rendimiento, ya que el mismo líquido al evaporarse hacía que el crecimiento se escurriera, perdiéndose parte de él al eliminarse más tarde el líquido.

Las contaminaciones más frecuentes fueron cocos gram positivos y en otras ocasiones hongos.

Los lotes preparados fueron 8; en el 10. obtuve un rendimiento bajo pues de 100 botellas sembradas eliminé 25. De las 75 restantes obtuve 15 g. de pasta o sea un promedio de .2 g. por botella. Con el siguiente lote obtuve un rendimiento ligeramente más alto, deseché 20 botellas de 100 sembradas obteniendo 16 g. de pasta y 228 cc. de antígeno. El bajo rendimiento lo atribuí al empleo del medio de cultivo demasiado fresco, ya que el agua de condensación hacía que el crecimiento resbalara y que el medio se desprendiera. De los tres siguientes lotes, sólo eliminé 3 botellas por contaminación; obtuve 495 cc. de antígeno con un rendimiento de .7 g. por botella. En los tres últimos lotes sólo sembré 60 botellas obteniendo 62.5 g. de pasta y 500 cc. de antígeno.

En cada lote efectué un control de pureza, esterilidad y sensibilidad. Este último control lo hice empleando antígeno estandar y 15 sueros de título conocido con objeto de estandarizar el antígeno de cada lote.

Los sueros estandar utilizados son los siguientes:

	1/25	1/50	1/100	1/200	
1	+	+	—	—	sospechosa
2	+	+	—	—	sosp.
3	+	+	—	—	sosp.
4	+	+	—	—	sosp.
5	+	+	—	—	sosp.
6	+	+	—	—	sosp.
7	+	+	+	+	positiva
8	+	I	—	—	sosp.
9	+	—	—	—	negativa
10	+	+	—	—	sosp.
11	—	—	—	—	negativa
12	+	+	I	—	sosp.
13	+	I	—	—	sosp.
14	+	+	I	—	sosp.
15	+	—	—	—	negativa

Todos los lotes dieron la sensibilidad deseada, excepto uno que se congeló. La estandarización del antígeno para la prueba del anillo en leche la efectué con muestras de leche de diferentes títulos positivos y antígeno estandar. El antígeno coloreado con hematoxilina facilita la lectura de la prueba pero su preparación es difícil y su estabilidad es menor que la de los colorantes vitales. Los antígenos coloreados con difenil y trifenil tetrazolio son de fácil preparación y por dar el anillo más obscuro se prefiere el primero. Confirmaré el valor práctico de esta prueba y su sensibilidad, observando que no existe relación alguna entre esta prueba y la aglutinación del suero lácteo, pero sí en la mayor parte de los casos hay relación entre esta prueba y la aglutinación del suero hemático.

Las pruebas en placa se hacen directamente en leches ácidas, homogenizadas y descremadas o directamente en la crema utilizando el antígeno coloreado con hematoxilina. Observé que hay variación en la prueba de seroaglutinación cuando el animal inicia o termina su período de lactancia.

La prueba del anillo en leche de cabra se efectúa de la misma manera variando únicamente el período de incubación que en la leche de vaca es de hora y media a 6 a 12 hrs. en la de cabra.

Para el diagnóstico de la brucelosis en humanos la prueba más segura la constituye el hemocultivo combinado con la inoculación al cuy, sin embargo la

prueba de Fijación de Superficie del Dr. Ruiz Castañeda tiene la ventaja de dar un resultado en menos de 1 minuto, sirviendo como una base para pruebas posteriores. Comprobé la ventaja de practicar el hemocultivo en el medio mixto de Ruiz Castañeda, efectuándolo al mismo tiempo con los medios por separado ahorrando con el primero tiempo y manipulaciones.

Respecto al diagnóstico de la brucelosis en los animales la prueba rápida de aglutinación en placa sigue siendo la más usada, aunque en casos de duda se efectúa la prueba lenta en tubo.

Efectué 1000 pruebas en sueros de bovinos y suínos provenientes de establos situados en diferentes partes de México; Comprobé en esta forma que la infección se encuentra muy extendida, sin embargo poco se puede hacer para la erradicación de esta enfermedad ya que las medidas que debieran tomarse tales como el sacrificio de los animales infectados y el saneamiento del lugar, no están al alcance de los ganaderos de nuestro país, pues la mayoría cuenta con un número reducido de animales, debido a esto se han tomado otras medidas como son el tratamiento adecuado por el calor de la leche y de los productos lácteos, con el propósito de evitar la trasmisión de esta enfermedad al hombre.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.—Buchanan P.H.D. General Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins Co. Baltimore. 1925.
- 2.—Birch R.R. and Gilman H.L. La enfermedad de Bang en los Bovinos. Serie Agricultura No. 120. Washington. D.C. 1937.
- 3.—Campbell M.H. Bangs Disease Infectious Abortion Bull. No. 182.
- 4.—Eichorn A. and Crawford A.B. Brucellosis Vacuna. Ofic. de Coop. Agric. Washington D.C. Traduc. por el Dr. Martínez y Cáceres de la Secc. de Ind. Animal del Minist. de Agric. de Cuba.
- 5.—Graham R. and Tunnelcliff E.A. Infectious Abortion in Swine. Circ. No. 271. Urbana, Ill. 1927.
- 6.—Graham R. and Thorp F. Answers to Questions Regarding Bovine Infectious Abortion. Circ. No. 360. University of Ill. 1930.
- 7.—Graham R. Brucellosis in Swine. Circ. No. 435. Urbana, Ill. 1943.
- 8.—Graham R. and Sampson J. Brucellosis of Cattle Circ. No. 544. University of Ill. 1943.
- 9.—Hayes F.M. Trad. por el Méd. Vet. Fernández E. El Aborto infeccioso en las Vacas. Sria. de Agric. y Fom. Dir. de Ganad. 1918.
- 10.—Hayes M.F. Bang's Disease (Infectious Abortion). Circ. No. 44. Univ. of California. 1930.
- 11.—Huddleson F. The Diagnostic of Brucella Infection in Animals and Man by Rapid Macroscopic Agglutination. Tech. Bull. No. 123. 1932.
- 12.—Huddleson, Scales, Surensen. Studies in Brucella Infections Tech. Bull. No. 149. Mich. State Coll. 1936.
- 13.—Hall Wendell. La Brucellosis Humana. Esc. de Med., Univ. of Minn. 1952.
- 14.—Joint Fao/Who. Expert Panel on Brucellosis. Report on the First Session. Rome, Italy. 1951.

- 15.—Joint Fao/Who. Expert Committee on Brucellosis. Second Report. Rome, Italy, 1953.
- 17.—Murray E.G.D., Hitches P.A., Parker H.A. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams, Wilkins Co. Baltimore. 1948.
- 18.—Knight Vernon. Chemotherapy of Brucellosis. New York Acad. 1950.
- 19.—Merchat. I.A. Bacteriology and Virology. Iowa State Coll. Press. 1950.
- 20.—Rich F.A. Concerning Infectious Abortion. Univ. of Vermont and State Agric. Coll. Bull. No. 231. 1923.
- 21.—Rodríguez Allente F. Tesis. Med. Vet. y Zootec. Reacción Oponocitográfica en el Diagnóstico de la Brucelosis Bovina, su interpretación con la Reacción de Aglutinación Rápida de Huddleson. 1950.
- 22.—Welch H. Bang's Disease (Infectious Abortion of Cattle) Circ. No. 158. 1940.
- 23.—Zozaya J. Brucella Infections in México. Inst. de Higiene. Popotla, Méx.
- 24.—Primera Reunión Interamericana de la Brucelosis. Hosp. Gen. 1948.
- 25.—Brucellosis in Cattle, in Hogs, in people. Agric. Ext. Iowa State Coll. 1950.