



98
24.

**ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y FAGOTIPIFICACION
DE BRUCELAS AISLADAS DE CAPRINOS
Y BOVINOS.**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Por

HECTOR

VILLEGAS

ALBARRAN

ASESORES: O.F.B. LAURA HERNANDEZ ANDRADE
M.V.Z. M. EN C. Ph. D. FRANCISCO SUAREZ GUEMES
M.V.Z. M. EN C. DR. EFREN DIAZ APARICIO

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

DEDICATORIAS

**A mis padres y hermanos por su apoyo en todo
momento, con el cual he podido realizar
una de mis grandes metas.**

A la memoria de mis Abuelos

Macario Villegas

y

Juana García.

AGRADECIMIENTOS.

A DIOS por permitirme seguir adelante.

A mis padres:

**Eva Albarrán y Héctor Villegas. Gracias..... por todo su apoyo,
amor y comprensión a lo largo de mi vida.**

Con admiración y respeto.....GRACIAS.

A mis hermanos:

**Antonio, Laura y Angélica que son compromiso que empuja hacia
adelante....Gracias por su apoyo y paciencia.**

A mis asesores:

**QFB. Laura Hernández Andrade, Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dr.
Francisco Suárez Güemes, por su amistad, confianza, apoyo,
paciencia y sabios consejos.
Por todo....Gracias.**

**A mis sinodales por el tiempo y dedicación prestados a la revisión de esta
Tesis.**

A mis amigos :

Por todos los momentos vividos en la Facultad. Gracias por su apoyo y amistad.

A mis amigos: Eduardo, Ana, Ignacio, Juan Antonio, "Lobo", por su amistad.

A todos los integrantes y compañeros del Cenid-Microbiología por su apoyo, confianza y amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el compromiso que para mí representa.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y a los profesores por todo lo que me han enseñado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, SAGAR, Cenid-Microbiología, por su apoyo para la realización de este trabajo.

A la Fundación UNAM, por el apoyo recibido.

A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

CONTENIDO

| | <u>Página</u> |
|--------------------------|---------------|
| RESUMEN. | 1 |
| INTRODUCCIÓN. | 3 |
| OBJETIVOS. | 12 |
| MATERIAL Y MÉTODOS. | 13 |
| RESULTADOS. | 24 |
| DISCUSIÓN. | 26 |
| CONCLUSIONES. | 34 |
| LITERATURA CITADA. | 35 |
| CUADROS. | 39 |
| FIGURAS. | 46 |

RESUMEN.

VILLEGAS ALBARRÁN HÉCTOR. Estudio bacteriológico y fagotipificación de brucelas aisladas de caprinos y bovinos. (Asesorado por: O. F. B. Laura Hernández Andrade, M. V. Z. M. en C. Ph. D. Francisco Suárez Güemes y M. V. Z. M. en C. Dr. Efrén Díaz Aparicio).

Entre las pruebas diagnósticas de la brucelosis, el aislamiento es la prueba indiscutible de una infección por *Brucella*. La identificación y tipificación ofrecen la posibilidad de la realización de estudios epidemiológicos, conociendo la distribución y prevalencia de las especies y biovariedades de *Brucella* en una área determinada y además poder diferenciar, las cepas vacunales de las cepas de campo. El objetivo de este estudio fue la identificación, biotipificación y fagotipificación de las brucelas aisladas, así como conocer la frecuencia de aislamiento de *B. melitensis* a partir de órganos obtenidos a la necropsia en los grupos de caprinos. Se trabajaron muestras que provenían de tres grupos de animales: el grupo 1 constaba de 32 caprinos procedentes de Torreón, Coahuila, el grupo 2 lo conformaban 35 caprinos de Ajuchitlán, Querétaro, los cuales habían sido vacunados (Rev 1 dosis reducida) y desafiados experimentalmente (la cepa de desafío era un aislamiento de campo de *Brucella melitensis* biovariedad 1), y el grupo 3 constaba de 55 bovinos productores de leche procedentes del Estado de México. En el grupo 1 no se sabían antecedentes de alguna posible vacunación, mientras que en el grupo 3 se tenía el antecedente de que el hato había sido vacunado con la cepa 19. Los grupos 1 y 3 eran positivos a brucelosis en la Prueba de Aglutinación en Tarjeta. En los grupos de caprinos el aislamiento se realizó a partir de órganos obtenidos a la necropsia (nódulos linfáticos, bazo, glándula mamaria y útero); en los bovinos se realizó el aislamiento a partir de muestras de leche. El medio de cultivo selectivo empleado en los aislamientos fue el medio de Farrell. La identificación y tipificación se llevó a cabo con las pruebas: bioquímicas convencionales, crecimiento en presencia de los colorantes Tionina, Fucsina y Safranina a diferentes concentraciones, sensibilidad a la lisis por los fagos: Tb, Wb, Fi, Iz, Fi, Bk₂ y R/C a la Dilución Corriente de Prueba, aglutinación con antisueros monoespecíficos A y M y diferenciación de cepas vacunales de cepas de campo con medios de cultivo adicionados con penicilina, estreptomycin y eritritol. En el grupo 1 se logró el aislamiento en 17 caprinos (53%); el porcentaje de aislamientos por órgano fue el siguiente: nódulos linfáticos en 13 animales (76%), bazo en 10 (58%), glándula mamaria en 8 (47%) y útero en 4 animales (23%). Después de la tipificación todas las cepas resultaron ser *Brucella melitensis* biovariedad 1, en ningún caso se aisló cepa vacunal. En el grupo 2 se logró el aislamiento en 23 animales (65%) y el porcentaje de aislamientos por órgano fue el siguiente: nódulos linfáticos en 22 animales (95%) en donde: nódulo submaxilar (56%), retrofaringeo (34%), supramamario (43%), mediastínico (30%), mesentérico (13%) y preescapular (8%); bazo en 17 (74%),

glándula mamaria en 9(39%) y útero en 7 animales(30%). En todos los casos sólo se aisló la cepa de desaffo. En el grupo 3 se logró el aislamiento en 6 animales (11%), las brucelas aisladas se identificaron como *Brucella abortus* biovariedad 1; en ningún caso se recuperó cepa vacunal. Los resultados al aislamiento en los caprinos nos indican que es en los nódulos linfáticos donde se logró el mayor número de aislamientos, seguido por el bazo, glándula mamaria y útero. El reducido número de aislamientos en los bovinos es comprensible ya que la *Brucella* se elimina en forma intermitente a través de la leche por lo que es recomendable la realización de muestreos repetitivos. El aislamiento y tipificación de las brucelas confirmó la presencia de la enfermedad en los grupos de animales positivos en la Prueba de Aglutinación en Tarjeta. El resultado de la tipificación en el grupo de animales que presentaban una infección natural por *Brucella*, coinciden con las biovariedades de mayor prevalencia tanto en México como en el Continente Americano, en donde la biovariedad 1 es la que tiene mayor prevalencia tanto para *Brucella melitensis* como para *Brucella abortus*.

INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico que afecta tanto al hombre como a diferentes especies de animales domésticos, tiene una amplia distribución mundial y se considera endémica en México. Es una zoonosis de gran importancia para la salud pública y la economía mundial. Los animales más comunmente afectados son los bovinos, cabras y cerdos; el contagio al hombre se considera accidental. En los bovinos *Brucella abortus* es la principal especie causal, mientras que en los caprinos es *Brucella melitensis*. Los signos más característicos en los hatos son la presencia de abortos en la última etapa de gestación, retenciones placentarias y esterilidad en los machos por orquitis o epididimitis, aunque también puede haber higromas y abscesos; además de que la producción láctea se afecta. Los animales pueden quedar como portadores que eliminan *Brucella* al medio ambiente, contagiando, de esta forma, al resto de los animales, esto es por el variable período de incubación y marcado carácter latente del agente causal. Las fuentes de transmisión son a través de la leche, semen, material excretado por el tracto genital de la hembra y el producto de los abortos. La importancia económica de la brucelosis está dada por la pérdida que ocasiona en los animales productores, al causar abortos, infertilidad, baja en la producción de leche, restricción de mercados para los animales y sus productos, así como interrupción de los programas genéticos, entre otros; aunado lo anterior a los grandes trastornos que ocasiona en los humanos infectados (1, 17, 30, 31).

HISTORIA.

Algunos historiadores de la medicina refieren que la brucelosis es una enfermedad que se conoce desde la época de Hipócrates (hace 2400 años), sin embargo las primeras descripciones de la enfermedad fueron realizadas por Cleghorn en 1751, posteriormente de 1854 a 1856 se observaron varios casos de fiebres prolongadas diferentes a las

enfermedades conocidas de la época. El mayor número de casos se reportó en la isla de Malta. Posteriormente Marston en 1859 realiza estudios referentes a los aspectos clínicos y patológicos de la fiebre del mediterráneo. Fue en el año de 1886 cuando Bruce aisla por primera vez el agente etiológico de la brucelosis, a partir del bazo de un soldado que muere a causa de la infección, llamándolo *Micrococcus melitensis*. Debido al gran número de humanos infectados, esta enfermedad despertó gran interés para su investigación y en 1897 Huges presenta una de las descripciones más completas de la enfermedad (14, 30, 33).

En 1897, Bang y Stribolt aislaron y describieron por primera vez, un microorganismo obtenido de fetos y anexos fetales procedentes de vacas, al que denominaron "*Bacillus abortus*", estableciendo la etiología del "*aborto infeccioso*" en el ganado bovino. En 1914, Traum aisló una nueva especie de *Brucella* a partir de fetos porcinos procedentes de hembras que habían abortado en una granja de Indiana E. U. A., al que denominó "*American melitensis*" (especie aberrante de *Brucella*). Actualmente es conocida como *Brucella suis*. En 1920 Meyer y Show propusieron a la "*Sociedad Internacional de Microbiología*", la creación de un nuevo género bacteriano, al que denominaron *Brucella*, en honor a Sir David Bruce. En 1953 *Brucella ovis* fué descrita por Buddle y Boyes en Australia, a la vez que Simmons y Hall lo hicieron en Nueva Zelanda. En 1957 Stoenner y Lackman aislaron la quinta especie de este género a partir de la rata del desierto (*Neotoma lepida*) al Oeste de E. U. A., a la que se denominó *Brucella neotomae*. Finalmente, en 1967 en E. U. A. Carmichael y Bruner, aislaron la última especie de este género hasta hoy conocida, denominada *Brucella canis* a partir de tejidos y fetos de perros de la raza Beagle (14).

La brucelosis en América.

En América Latina la aparición de la enfermedad fue debida a la introducción de animales infectados durante el tiempo de la colonia. Al ser España una nación mediterránea, la presencia de la enfermedad era alta dando pie a la presencia de ésta en los países latinoamericanos. Se considera que la brucelosis en general estuvo durante muchos años localizada en las zonas de mayor producción ganadera y que fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se extiende por todo el continente. De acuerdo a las investigaciones bibliográficas realizadas por los doctores Villela y Silva hace más de 50 años. es el Dr. Carbajal en 1906 quien sospecha de la presencia de brucelosis en México al estudiar un caso de fiebre remitente de donde intenta el aislamiento del *Micrococcus melitensis*, refiriendo al Dr. Valenzuela quien un año antes había sospechado que sus pacientes que presentaban fiebres remitentes estuvieran enfermos de fiebre de Malta. En 1912 el Dr. Reséndiz, en Querétaro, relaciona la enfermedad con la importación en 1910 de cabras murcianas. El Dr. Thomas Perrin es el primero en intentar el aislamiento del agente etiológico en México sin éxito, siendo el Dr. Manuel Vergara en 1921, quien aísla por primera vez al microorganismo, hecho que fue confirmado en 1923 por Placeres con estudios bacteriológicos y serológicos (14, 15, 21, 30, 33).

ETIOLOGÍA.

El agente etiológico de la brucelosis es la bacteria del género *Brucella*, y son seis las especies conocidas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*. Las primeras cuatro especies se aíslan normalmente en forma lisa, mientras que *B. ovis* y *B. canis* sólo se conocen en forma rugosa. Las brucelas son pequeños cocabacilos que miden de 0.5 a 0.7 μ de diámetro, dispuestos como bacterias separadas y menos frecuentemente en parejas, cadenas cortas o pequeños grupos. Son Gram negativos,

inmóviles, no poseen flagelos, ni forman esporas. Son microorganismos aerobios estrictos y poseen un metabolismo de tipo respiratorio. Algunas especies y biovariedades (*B. ovis* y *B. abortus*) requieren un suplemento de 5 a 10% de CO₂ para su crecimiento, especialmente en aislamientos primarios. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, aunque el crecimiento puede tener lugar en el intervalo comprendido entre 20 y 40 °C. El pH óptimo de crecimiento va desde 6.6 a 7.4. Son catalasa positivos y generalmente positivos a la reacción de oxidasa (excepto *B. ovis*, *B. neotomae* y algunas biovariedades de *B. abortus*), no producen indol, no licúan la gelatina ni lisan los eritrocitos. No producen ácido ni gas a partir de carbohidratos, son urea y nitrato positivos, en el medio de citrato de Simmons tienen reacción negativa y en el medio de Triple Azúcar Hierro producen alcalinización (2, 6, 9, 13, 20, 27).

DIAGNÓSTICO.

En humanos, el diagnóstico de la brucelosis depende del conjunto de datos clínicos, antecedentes epidemiológicos y resultados de estudios de laboratorio. En animales, excepto en casos de abortos o retenciones placentarias, no siempre se cuenta con antecedentes clínicos que orienten al diagnóstico, por lo que los resultados de laboratorio son determinantes. Los métodos de diagnóstico de laboratorio pueden dividirse en dos grupos: los directos, que se refieren al diagnóstico bacteriológico, el cual está orientado al aislamiento y tipificación del agente etiológico, cuyo carácter diagnóstico es definitivo, ya que el crecimiento de la bacteria es la confirmación de las demás pruebas; y los indirectos por los cuales se busca la presencia de anticuerpos específicos anti- *Brucella* en el suero sanguíneo (2, 5, 18).

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO.

Para el aislamiento de *Brucella*, en todos los casos se debe realizar con precaución, siendo importante contar con las técnicas adecuadas tanto en la obtención, como en el procesamiento de las muestras, así como para su inoculación en los medios de cultivo apropiados, evitando de esta manera una posible contaminación del técnico o profesional. El material que debe ser utilizado para el aislamiento es el procedente del aborto (el cual incluye: cotiledones placentarios, líquido amniótico, contenido gástrico, hígado y bazo fetales); material de necropsia (bazo, útero, glándula mamaria, testículos, epididimo, próstata, vesícula seminal, nódulos linfáticos: submaxilares, parotídeos, retrofaringeos, mesentéricos, mediastínicos, supramamarios, inguinales e iliacos), muestras de leche, exudado vaginal o uterino y semen. Siempre que sea posible se deben obtener muestras de sangre, con la finalidad de realizar un diagnóstico serológico simultáneo. La toma de muestras de sangre para la realización de hemocultivos no es frecuente en animales (2, 4, 5, 18).

Para el aislamiento y reproducción de las brucelas se utilizan medios sólidos, que facilitan la identificación y el aislamiento de las colonias y dificultan la disociación (colonias que pasan de fase lisa a rugosa), entre estos tenemos como medios más recomendados: Agar dextrosa con suero, Agar infusión con papa y suero, Trypticasa Soya Agar, Agar Triptosa y Agar *Brucella* (albimi); como medios líquidos tenemos: Caldo Triptosa Soya, Caldo Triptosa y Caldo *Brucella*. Cuando se trata de muestras a partir de sangre se recomienda el medio difásico de Ruiz Castañeda. Cuando se sospecha una importante contaminación con gérmenes exógenos se utilizan medios selectivos, los cuales se preparan agregando antibióticos y fungicidas a los medios anteriormente señalados con excepción de los medios que contengan sangre. El uso de colorantes como el violeta de etilo también es recomendable, sin embargo hay que tener presente que existen algunas biovariedades de

B. abortus sensibles a los colorantes (2, 5, 6, 18, 27).

FAGOTIPIFICACIÓN.

Se han descrito varios bacteriófagos activos para el género *Brucella*. Se ha observado que estos bacteriófagos no lisan a otros géneros de bacterias por lo que son de valor taxonómico para la identificación de género y especie. Los bacteriófagos se han clasificado en seis grupos: Grupo 1: tipificado por la cepa Tbilisi (TB), fago de referencia; Grupo 2: fagos tipificados por Firenze (Fi) cepa 75/13; Grupo 3: Weybridge (Wb); Grupo 4: comprende los fagos Berkeley Bk_n, Bk₁ y Bk₂, el más útil es el Bk₂; Grupo 5: incluye los fagos para brucelas no lisas, todos son derivados del fago R, el cual fue desarrollado como un mutante seleccionado de una mezcla de fagos activos en cepas lisas de *Brucella*; los existentes son R/O, R/M y R/C; Grupo 6: comprende al fago Izatnagar (Iz), aislado en la India, el cual se encuentra todavía en experimentación.

En las pruebas se emplean dos concentraciones: la Dilución Corriente de Prueba (DHP) y una más concentrada 10 000 x DHP (8, 21).

Clasificación actual del género *Brucella*.

Con respecto a la taxonomía de este agente, su clasificación ha sido siempre un tema de controversia entre los taxonomistas; como ejemplo, a través de la historia se menciona que tras los descubrimientos de Bruce y Bang en 1886 y 1897 respectivamente, en 1914 Traum aisló una nueva especie y observó su parecido morfológico y cultural con *B. abortus*, aunque difería marcadamente de ella en algunas características bacteriológicas al no exigir CO₂ para su aislamiento primario, esta fue denominada "*American melitensis*" (especie aberrante), conociéndose actualmente como *B. suis*. Evans estableció las similitudes bacteriológicas entre *B. melitensis* y *B. abortus*, y en 1920, Huddleson observó que.

B. abortus necesitaba una atmósfera enriquecida con CO_2 para su crecimiento, y en 1927, este mismo autor, conjuntamente con Abell señaló que la capacidad de producir ácido sulfhídrico diferenciaba claramente a *B. abortus* de *B. melitensis*. En los últimos 30 años, cuando se incluyeron las especies *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis*, *B. neotomae* no tuvo ninguna dificultad en ser incluida en el género, ya que comparte con las especies clásicas su característica de ser lisa y las de metabolismo particular de este género, sin embargo, la inclusión de *B. ovis* y *B. canis* dentro del género fue más difícil, ya que estas especies son naturalmente rugosas y difieren en su patogenicidad para producir enfermedad (14, 33).

Con ayuda de la tecnología de vanguardia, como es el análisis de ácidos nucleicos, permitieron a Hoyer y Mc. Cullough en 1968 analizar el genoma de las diferentes especies del género *Brucella*. Utilizando hibridación de ADN, establecieron que las cuatro especies lisas (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. neotomae*) tenían un 100 % de homología en su secuencia de polinucleótidos y que *B. ovis* tenía un 94 % de homología. Posteriormente al analizar a *B. canis* establecieron la homología de esta con las demás especies. Estos estudios genéticos permitieron establecer que las seis especies de *Brucella* están fuertemente relacionadas, existiendo poca variación a nivel genético entre ellas, sugiriendo que se considere a una sola especie de *Brucella*, siendo esta *B. melitensis*, y convirtiendo las ahora conocidas especies en biovariedades (25).

En 1982 el Subcomité de taxonomía de *Brucella*, decidió la supresión de la biovariedad 8 de *B. abortus*, al no haber sido aislada en muchos años y no existir una cepa de referencia válida para esta biovariedad. En la 9a. edición del Manual Bergey se sustituyó el término biotipo por el de biovariedad, aunque ambos tiene el mismo significado. En 1988, el

Subcomité de taxonomía de *Brucella* admitió y corrigió algunos errores que han hecho aumentar o disminuir el número de biovariedades reconocidas. En la última reunión celebrada en 1986 en Manchester durante el XIV Congreso Internacional de Microbiología, el citado Subcomité expuso que se había detectado que la cepa de referencia de *B. abortus* biovariedad 7 (63/75) era un cultivo mezclado de las biovariedades 3 y 5 de esta misma especie, por lo que, si no se demostraba su autenticidad debía ser suprimida y su posición debía ser ocupada por *B. abortus* biovariedad 9. Por otra parte, propusieron nuevas propiedades fenotípicas para la biovariedad 6 de esta misma especie, reduciéndose las diferencias entre ésta y la biovariedad 3. También se estableció una nueva cepa de referencia para la biovariedad 5 de *B. suis* (cepa 513). En resumen el género *Brucella* se encuentra integrado actualmente por: *B. melitensis* (3 biovariedades), *B. abortus* (7 biovariedades), *B. suis* (5 biovariedades), *B. neotomae*, *B. ovis* y *B. canis* (2, 7, 14).

JUSTIFICACIÓN.

La brucelosis es una de las enfermedades que cuentan con mayor número de pruebas diagnósticas, siendo el aislamiento bacteriológico la prueba confirmatoria y definitiva. La identificación y tipificación ofrecen la posibilidad de realizar estudios epidemiológicos para conocer la distribución y prevalencia de las especies y biovariedades de *Brucella* en un área determinada y además poder diferenciar, las cepas vacunales de las cepas de campo. La identificación de *Brucella* se basa en dos pruebas principales: el estudio de la lisis por fagos y la utilización de las pruebas metabólico-oxidativas. Generalmente la fagotipificación se lleva a cabo mediante la utilización del fago Tb, sin embargo, la utilización de las demás fagos resulta importante para determinar posibles variaciones en esta prueba. La tipificación se lleva a cabo mediante el estudio de cuatro determinaciones principales que ponen en evidencia las características fenotípicas de las biovariedades dentro de cada especie, estas son: el requerimiento de CO_2 , la producción de H_2S , el crecimiento en presencia de colorantes y la aglutinación con antiseros monoespecíficos. Con bastante frecuencia y en determinadas circunstancias, se presentan mutaciones en este género cuya expresión fenotípica se traduce en cambios en la morfología de las colonias, pérdida del requerimiento de CO_2 necesario para el crecimiento de algunas biovariedades, ausencia de producción de H_2S y de actividad ureásica y de la oxidasa, en aquellas que habitualmente lo producen, y modificaciones en los patrones de sensibilidad a los colorantes y antibióticos. Por lo anterior, es importante determinar las posibles variaciones que se pudieran presentar en las pruebas de identificación y tipificación, y con ello alterar el diagnóstico bacteriológico; además el estudio de las características fenotípicas es de gran utilidad en los laboratorios de diagnóstico de brucelosis, así como en los dedicados a la investigación o elaboración de productos biológicos, especialmente antígenos y vacunas (2, 8, 9, 10, 14).

OBJETIVOS :

Aislamiento de bacterias del género *Brucella* a partir de órganos obtenidos a la necropsia en caprinos y de muestras de leche en bovinos.

Identificación, biotipificación y fagotipificación de las brucelas aisladas.

Conocer el porcentaje de aislamiento de *Brucella* a partir de los órganos obtenidos a la necropsia.

MATERIAL Y MÉTODOS.

El presente trabajo se realizó en el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria , del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. S. A. G. A. R. localizado en el Km. 15.5 de la carretera federal México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, México, D. F. ; y en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D. F.

Descripción del estudio:

La investigación se clasifica como un estudio observacional, descriptivo, transversal, prospectivo (24).

Procedencia de las muestras.

Se trabajaron muestras que provenían de tres grupos de animales; el grupo 1 estaba formado por 32 caprinos procedentes de Torreón, Coahuila; el grupo 2 lo conformaban 35 caprinos de Ajuchitlán Querétaro, los cuales habían sido vacunados (Rev 1 dosis reducida) y desafiados experimentalmente vía conjuntival (la cepa de desafío era un aislamiento de campo de *Brucella melitensis* biovariedad 1), y el grupo 3 constaba de 55 bovinos productores de leche procedentes del Estado de México. En el grupo 1 no se sabían antecedentes de alguna posible vacunación, mientras que en el grupo 3 se tenía el antecedente de que el hato había sido vacunado con la cepa 19. Los grupos 1 y 3 eran positivos a brucelosis en la Prueba de Aglutinación en Tarjeta.

Las técnicas de recolección y procesamiento de las muestras se siguieron de acuerdo con lo descrito por Alton y col. 1988 (2).

Obtención de las muestras.

Los caprinos se sacrificaron humanitariamente por el método de pistola de émbolo cautivo, en el rastro ubicado en la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, Edo. de México, en donde se realizó la necropsia y se obtuvieron los órganos más adecuados para aislar a la bacteria, los cuales fueron: nódulos linfáticos (supramamarios, retrofaríngeos, submaxilares, preescapulares, mediastínicos y mesentéricos) bazo, útero y glándula mamaria.

Los órganos se recolectaron en bolsas de plástico y fueron llevados al laboratorio, en donde, se congelaron para su posterior procesamiento.

En los bovinos se intentó el aislamiento a partir de muestras de leche, la cual se recolectó en tubos estériles a partir de todos los cuartos. Previamente se lavó y secó la ubre, y se desinfectaron los pezones con algodón y alcohol al 70%, se desechó el primer chorro de leche y se procedió a recolectar de 10 a 20 ml de leche de cada pezón. Las muestras se enviaron en condiciones de refrigeración al laboratorio para su procesamiento.

Procesamiento de las muestras para aislamiento.

El medio de cultivo selectivo que se utilizó para los aislamientos fue el medio de Farrell. Para su elaboración se siguieron las recomendaciones del fabricante, utilizando los siguientes ingredientes basales:

- Base de Agar *Brucella** 45 gr.
- Suplemento selectivo de antibiótico** 20 ml.
- Suero de ternera estéril.

El procesamiento de los órganos obtenidos a la necropsia fue el siguiente:

- Con ayuda de instrumental quirúrgico, se realizó la disección de las muestras para remover
 - * DIFCO Laboratories, Detroit, Michigan. EUA.
 - ** OXOID Laboratories, Hampshire, England.

la grasa y tejido excedente, se sumergieron en alcohol al 70% y se flamearon hasta que se consumió totalmente el alcohol absorbido.

- Se cortaron en pequeños pedazos las muestras para depositarlas en bolsas de plástico estériles (dos bolsas por órgano).
- Se procedió a macerar las muestras utilizando un pistilo de mortero.
- En una proporción de 2 partes de órgano y 10 partes de diluyente se añadió Solución Salina Fisiológica (SSF) estéril a las bolsas, las cuales se procesaron en el aparato macerador de tejidos* por un lapso de 60 segundos, para lograr una distribución homogénea de la muestra.
- El líquido procedente del procesamiento de las muestras, se distribuyó de manera uniforme en bandas por toda la superficie del medio de Farrell mediante hisopos estériles.

Las muestras de leche se centrifugaron a una velocidad de 4000 rpm. por 15 minutos, con la finalidad de separar la grasa del sedimento. Se realizó la siembra sobre el medio de Farrell con el asa microbiológica en dilución por estrías, tanto del sedimento como de la grasa.

Las placas se inocularon por duplicado para su incubación en presencia y ausencia de CO₂.

Identificación bacteriológica.

Las técnicas de identificación, fagotipificación y biotipificación se realizaron de acuerdo con lo descrito por Alton y col. 1988 (2).

Los cultivos del primoaislamiento se revisaron diariamente a partir de las 48 h. de ser incubados, y se resembraron todas las colonias sospechosas de pertenecer al género *Brucella*. Los cultivos del primoaislamiento que después de 10 días no indicaban el crecimiento de colonias sospechosas, fueron eliminados.

* STOMACHER 400 Laboratory Blender, England.

Una vez que se logró el crecimiento en las resiembras, se realizaron frotis de los cultivos sospechosos y se examinaron por la tinción de Gram. Los frotis que indicaban características de la presencia de bacterias del género *Brucella* (pequeños cocobacilos Gram-negativos) se les procedió a realizar las pruebas bioquímicas.

Para la realización de las pruebas bioquímicas, crecimiento en presencia de colorantes, fagotipificación y aglutinación con antiseros monoespecíficos A y M, se utilizaron las siguientes cepas de referencia¹ como controles:

- 16 M Biovariedad 1 *B. melitensis*.
- 544 Biovariedad 1 *B. abortus*. Dependiente de CO₂
- 1330 Biovariedad 1 *B. suis*.

Pruebas bioquímicas.

a) **Citrato de Simmons***: Esta prueba determina la capacidad bacteriana para utilizar el citrato de sodio como única fuente de carbono.

La inoculación se realizó con estría continua sobre la superficie del medio, efectuándose la lectura de la prueba a las 24 h. después de ser incubadas a 37 °C, con y sin CO₂.

Interpretación de la prueba:

- positiva: Cambio del medio a color azul.
- negativa: El medio permanece color verde.

b) **Triple Azúcar Hierro(TSI)***. Esta prueba determina la capacidad para utilizar azúcares (fermentación de glucosa y lactosa).

Se inoculó por picadura y estría, realizándose la lectura a las 24 h. después de ser incubadas a 37 °C, en presencia y ausencia de CO₂.

* BIOXON de México.

1 Cepas donadas por el Institut de la Recherche Agronomique, Paris, Francia.

Interpretación:

Las bacterias del género *Brucella*, presentan la reacción 5 en esta prueba:

- superficie (color rojo. Alcalinización)
- fondo (color rojo. Alcalinización)
- Producción de gas Negativa.
 - (Ausencia de burbujas de gas en el medio)
- Producción de sulfuro de hidrógeno Negativo.
 - (Ausencia de precipitado color negro en el medio)

c) Urea de Christensen(agar).* Esta prueba determina la habilidad de las bacterias de producir la enzima ureasa que desdobra la urea en amoniaco.

Se inoculó por estría continua, incubándose los tubos a 37 °C, con y sin CO₂. Se revisaron los tubos desde el momento de su inoculación para observar el tiempo de reactividad a la urea.

Interpretación:

- positiva: El medio cambia de color a rosa intenso.
- negativa: El medio permanece sin cambio de color.

d) Oxidasa [™] (Método de Kovac). Se impregnó un pedazo de papel filtro con 2 a 3 gotas de solución acuosa del reactivo de oxidasa, antes de que el papel se secase completamente, se utilizaron palillos de madera para tomar una porción de cultivo a probar, frotándolo sobre la superficie del papel filtro.

En esta prueba, además de las cepas control antes mencionadas, se utilizó una cepa de *Brucella ovis* (aislamiento de campo) como cepa "control", la cual es negativa en la reacción de oxidasa.

* BIOXON de México.

** SIGMA Chemical CO. St. Louis. EUA.

Interpretación:

- positiva: aparición de un color púrpura intenso en 10 segundos después de frotar el cultivo al papel filtro. Una reacción tardía (después de 10 segundos) debe ser ignorada.
- negativa: aparición de cualquier otro color o ausencia de este.

d) Producción de ácido sulfhídrico (H_2S). Determina la capacidad bacteriana para producir H_2S .

El medio empleado fué el Agar Trypticosa Soya* (TSA) , aunque también se puede usar Agar-*Brucella*, servidos en tubos de manera inclinada.

Se inculó por estría continua; posteriormente se introdujo una tira de papel filtro impregnada con acetato de plomo al 10 %** sujeta al tapon del tubo. Es muy importante que el papel no toque la superficie de agar para evitar falsos resultados.

Los tubos se tapan parcialmente incubándose a 37 °C, con y sin CO_2 . La lectura se realizó a las 24 h. Diariamente se cambio la tira de papel por 3 días, realizándose las respectivas lecturas.

Interpretación:

- positiva: aparición de un color negro en el extremo de la tira de papel debido a la producción de H_2S .
- negativa: el extremo de la tira de papel aparece sin cambio de color.

* BIOXON de México.

** MERCK de México.

Prueba de Acriflavina.

Como los cultivos de *Brucella* tienden a modificarse de colonias en fase lisa a fase rugosa, se realizó la prueba de Acriflavina*

La Acriflavina se diluyó en relación 1:1000 en agua destilada (10 mg. en 10 ml), se depositó sobre un portaobjetos una gota de la solución de Acriflavina, con el asa microbiológica, se suspendió en ella una porción de cada cultivo. Se observó que los cultivos problema permanecían en suspensión (cultivos en fase lisa), mientras que un cultivo de *Brucella ovis* (aislamiento de campo) utilizado como cepa "control", se observó formación de pequeños grumos (cultivo en fase rugosa).

Crecimiento en presencia de colorantes.

Para esta prueba se prepararon soluciones madre para cada uno de los siguientes colorantes* : Ver CUADRO 7.

- Tionina 0.1%
- Fucsina básica 0.1%
- Safranina 1%

Las soluciones madre se mantuvieron 1 h. en un baño de agua hirviendo y se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

El medio base utilizado fue el TSA , al cual se le agregó la cantidad necesaria de cada solución madre de los colorantes y, después de mezclar cuidadosamente, se vertieron en placas de Petri.

* Técnica Química de México.

Una vez solidificadas las placas se incubaron un día anterior en la estufa a 37 °C para secarlas y como control de contaminación. Las placas así preparadas deben utilizarse dentro de los 7 días de haberse preparado.

La siembra se realizó a partir de cultivos recientes de 24 a 48 h.; se prepararon suspensiones de cada cepa en 1 ml de SSF estéril. El grado de turbidez de las suspensiones debe ser bastante uniforme.

Se sumergió en cada suspensión bacteriana un hisopo estéril con el que se sembró una sola estría en cada una de las placas con colorante previamente identificadas.

El orden de la siembra fue el siguiente:

Se sembraron primero las placas con colorantes de las más diluidas a las más concentradas, girando el hisopo, para no pasar colorante de un tipo a una placa de otro tipo de colorante.

Ejemplo: Tionina 10 µg- Tionina 20 µg - Tionina 40 µg - Fucsina 10 µg-

Fucsina 20 µg- Safranina 100 µg.

Se incubaron las placas a 37 °C, en presencia y ausencia de CO₂, realizándose la lectura a las 72 h.

FAQOTIPIFICACIÓN.

Se utilizaron los siguientes fagos a la Dilución Corriente de Prueba (DCP): Tb^{*}, Wb^{*}, Iz^{*}, Bk₂^{**}, Fi^{**} y R/C^{*}. La Dilución Corriente de Prueba, es la dilución fagica o la

* Bacteriófagos donados por el Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, Francia.

** Bacteriófagos donados por el Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK.

concentración del fago necesaria que produce una lisis completa de un crecimiento bacteriano de *Brucella*.

La tipificación se realizó a partir de cultivos recientes, con los cuales se prepararon suspensiones bacterianas que tuvieran una turbidez uniforme.

Para esta prueba las suspensiones bacterianas se estandarizaron por densidad óptica a 600 nm, 0.165 de D.O. = $0.9 \cdot 10^9$ *Brucella* por ml, en el espectrofotómetro.

En esta prueba las placas contenían como medio base TSA, las cuales se introdujeron un día anterior a la estufa a 37 °C para secarlas y como control de contaminación. Se sumergió en cada suspensión bacteriana un hisopo estéril con el que se sembró una sola estría en las placas previamente identificadas.

Sobre las estrias de siembra se depositaron 30 μ l de la DCP de cada fago. Una vez que se depositó el fago, las placas no deben moverse hasta que la gota del fago se haya absorbido en el medio; las placas se llevaron a incubar a 37 °C en presencia y ausencia de CO₂, realizándose la lectura a las 72 h. de ser incubadas.

SEROTIPIFICACIÓN.

Se prepararon suspensiones de cultivos jóvenes en tubos de 1 ml de Solución Salina Fenolada estéril, las cuales se inactivaron a 65 °C por 1 h. en baño de agua. Las suspensiones deben tener una turbidez uniforme.

Se depositaron 30 μ l de cada uno de los antisueros A y M * sobre un portaobjetos y a cada una de ellas se añadieron 30 μ l de las suspensiones bacterianas a probar, mezclandolos con el asa microbiológica. La aglutinación debe producirse durante el primer minuto con uno de los antisueros. Como en los dos sueros monoespecíficos se produjo aglutinación, se

* Antisueros monoespecíficos provenientes del National Veterinary Services. U. S. D. A., Ames. Iowa. EUA.

practicó la prueba en tubo de ensayo. En este caso ,como se disponía de poca cantidad de antisueros, se realizó la prueba en microplacas; utilizando una microplaca para el antisuero A y otra para el M.

Se realizaron diluciones dobles seriadas de cada antisuero, empezando por la dilución 1:5 (40 μ l de Solución Salina Fenolada estéril y 10 μ l de antisuero), hasta la dilución 1:160. Posteriormente se adicionaron 25 μ l de las suspensiones bacterianas a cada una de las diluciones.

Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h. para la examinación de la aglutinación.

Diferenciación de cepas vacuñales de cepas de campo.

En esta prueba se emplearon placas cuyo medio de cultivo base era el TSA, al cual se le agregaron los antibióticos: penicilina a una concentración de 5 UI por ml de medio de cultivo, estreptomycinina 2.5 μ g por ml de medio de cultivo, y el azúcar meso-eritritol,** a una concentración de 1 mg por ml de medio de cultivo.

Las placas al igual como en las pruebas anteriores se incubaron 24 h. en la estufa a 37 °C antes de ser utilizadas, previamente identificadas.

Las cepas utilizadas como control fueron:

- 544 *Br. abortus* * biovariedad 1. Dependiente de CO₂
- C 19 *Br. abortus* ** biovariedad 1. (cepa vacunal)
- 16 M *Br. melitensis* * biovariedad 1.
- Rev 1 *Br. melitensis* ** biovariedad 1. (cepa vacunal)

* Cepas de referencia donadas por el Institut de la Recherche Agronomique.
Paris. Francia.

** Vacunas comerciales de la Productora Nacional de Biológicos. PRONABIVE.

*** SIGMA Chemical CO. St. Louis. EUA

En el caso de las cepas identificadas como *B. abortus* se utilizaron las placas con penicilina (5 UI/ml) y meso-eritritol (1mg/ml), que inhiben la proliferación de la cepa 19. Cabe señalar además que la cepa 19 no necesita CO₂ para crecer.

Con respecto a las cepas identificadas como *B. melitensis*, se utilizaron las placas que contenían penicilina (5UI/ml), que inhiben la proliferación de la cepa Rev 1, y estreptomicina(2.5 µg/ml) en donde la cepa Rev I prolifera y las cepas de campo de *B. melitensis* no crecen.

Para la siembra se prepararon suspensiones de las cepas problema y de las cepas control en tubos con 1 ml de SSF estéril, procurando que las suspensiones tuvieran una turbidez uniforme: posteriormente se sumergió en cada suspensión un hisopo estéril y se inoculó una sola estria en las placas, previamente identificadas.

Las placas se incubaron a 37 °C en presencia y ausencia de CO₂, realizándose la lectura a las 72 h.

RESULTADOS**Aislamiento.**

En el grupo 1, se logró el aislamiento en 17 animales (53%). El porcentaje de aislamientos por órgano fue el siguiente: nódulos linfáticos en 13 animales (76%), bazo en 10 animales (58%), glándula mamaria en 8 (47%) útero en 4 (23%). **FIGURA 1.**

En el grupo 2, se aisló la bacteria en 23 animales (65%), cuyo porcentaje de aislamientos por órgano fue el siguiente: nódulos linfáticos en 22 animales (95%), bazo en 17 (74%), glándula mamaria en 9 (39%) y útero en 7 (30%). **FIGURA 2.**

El porcentaje de aislamientos por nódulo linfático en este grupo, fue el siguiente: nódulo submaxilar (56%), retrofaríngeo (34%), supramamario (43%), mediastínico (30%), mesentérico (13%) y preescapular (8%) **FIGURA 3.**

En el grupo 3 se logró el aislamiento a partir de las muestras de leche en 6 animales (11%).

Identificación.

El resultado en las pruebas bioquímicas, aunado a las características de las colonias aisladas, y lo observado en la tinción de Gram, confirmaron la presencia de bacterias del género *Brucella*. **CUADRO 1.**

La producción de H₂S y la necesidad de utilización de CO₂ indicaron que los aislamientos en los grupos 1 y 2 se identificaran como *B. meliønsis* mientras que los aislamientos en el grupo 3 se identificaron como *B. abortus*. **CUADROS 2 y 3.**

Fagotipificación.

Mediante esta prueba se confirmó la identificación por especie, en donde los aislamientos obtenidos en los grupos 1 y 2 se identificaron como *B. melitensis* y los obtenidos en el grupo 3 como *B. abortus*. **CUADRO 4.**

Crecimiento en presencia de colorantes.

Con esta prueba se confirmó aun más la identificación por especie y además en el caso de los aislamientos de *B. abortus*, que éstos pudieran pertenecer a las biovariedades 1 ó 4, ya que sólo estas dos biovariedades no crecen en ninguna concentración del colorante Tionina como sucedió con los aislamientos del grupo 3. **CUADROS 2 y 3 .**

SEROTIPIFICACIÓN.

Con esta prueba los aislamientos identificados como *B. melitensis* resultaron ser biovariedad 1, mientras que los aislamientos de *B. abortus* se identificaron también como biovariedad 1. **CUADROS 2 y 3.**

Diferenciación de cepas vacunales de cepas de campo.

Como los aislamientos de *B. melitensis* y *B. abortus* resultaron ser biovariedad 1, se puede sugerir la existencia de alguna cepa vacunal, ya que las cepas vacunales de ambas especies pertenecen a la biovariedad 1.

En los grupos 1 y 3 no se logró recuperar cepa vacunal en ningún caso, mientras que en el grupo 2, sólo se logró aislar la cepa de desafío. **CUADROS 5 y 6.**

DISCUSIÓN

En el aislamiento de cepas de *Brucella* en órganos a partir de animales sacrificados son clásicos los estudios realizados por Renoux y col. (1956) acerca del aislamiento de *B. melitensis* en tejidos y órganos de cabras infectadas experimentalmente por vía conjuntival, en donde se señala una amplia variación en la frecuencia de aislamientos. A través de este conocido trabajo, este autor llega a las siguientes conclusiones: ningún órgano muestreado fue positivo en el 100% de los casos, que los nódulos linfáticos están casi siempre infectados por *B. melitensis*, que los nódulos linfáticos más próximos al sitio de inoculación están infectados más frecuentemente y que cualquier órgano tejido o víscera, puede estar infectado (28).

Considerando las diferencias que pudieran existir en cuanto al material y métodos utilizados por Renoux, se pueden realizar algunas comparaciones con el presente estudio.

Con respecto al grupo 1, se observó que se logró un mayor porcentaje de aislamientos a partir de los nódulos linfáticos (76%), seguido por el bazo, la glándula mamaria y el útero

En relación al grupo 2 de caprinos que fueron inoculados experimentalmente vía conjuntival, se observó que aquí también el mayor porcentaje de aislamientos se obtuvo a partir de los nódulos linfáticos (95%), seguido igualmente por el bazo, la glándula mamaria y útero; en este grupo 2 en donde se estableció el porcentaje de aislamiento por tipo de nódulo linfático, se observó que en los nódulos submaxilares se obtuvo el mayor porcentaje de aislamiento (56%); Soberón y col. (1996), siguiendo los procedimientos de Alton y col. (2), realizaron aislamientos en cabras desafiadas experimentalmente por vía conjuntival con una cepa de campo de *Brucella melitensis*, principalmente a partir de los nódulos linfáticos submaxilares (32); por lo anterior se puede mencionar que en los

nódulos más próximos al sitio de inoculación de la cepa de desafío, se tiene la mayor posibilidad de realizar el aislamiento como lo indican Renoux y col. (28).

Alton y col. (1988) consideran que las localizaciones más frecuentes de *Brucella* para realizar el aislamiento a partir de animales sacrificados tanto en hembras caprinas, ovinas y bovinas es en órganos del tejido linforeticular, seguido por el útero en gestación o puerperal y en la ubre (2).

Mancera y col. (1992) realizaron una evaluación serológica en cabras vacunadas y desafiadas experimentalmente, en donde para el aislamiento siguieron las técnicas recomendadas por Alton y col. (2), en este trabajo obtuvieron aislamientos principalmente a partir de los nódulos linfáticos y el bazo (22).

Marin, M. P. y col. (1995), siguiendo los procedimientos por Alton y col. (2), realizaron aislamientos de *B. melitensis* principalmente a partir de nódulos linfáticos en 17 ovejas procedentes de un rebaño infectado naturalmente por *B. melitensis* biovariedades 1 y 3 (23).

Con relación a lo anterior se observó en el presente trabajo que en los grupos 1 y 2 a partir de los nódulos linfáticos y el bazo, se obtuvieron los porcentajes más altos de aislamiento, debido a que éstos son órganos del sistema linforeticular, y de acuerdo con la patogenia de *Brucella*, esta tiene una localización inicial en los nódulos linfáticos, de donde se propaga a otros órganos linfoides como el bazo, además de que la bacteria tiene predilección por el útero y la glándula mamaria (16).

En relación con los aislamientos de *Brucella* a partir de muestras de leche, la literatura menciona que el microorganismo se elimina de manera intermitente a través de la leche y que esta eliminación puede ser masiva, poco intensa, continua o discontinua e incluso nula, dependiendo la etapa de la enfermedad, debido a esto es necesario efectuar muestreos repetidos para hacer posible el aislamiento, además de que se requiere de muchos cuidados

tanto en la obtención como en el procesamiento de las muestras, ya que el riesgo de que estas se contaminen es alto y por ende se reduce la posibilidad de realizar el aislamiento (2, 5, 14).

En el presente estudio sólo se logró el aislamiento en 6 animales de los 55 bovinos positivos a brucelosis en la Prueba de Aglutinación en Tarjeta, debido a que sólo se realizó un sólo muestreo y que este coincidió con una etapa de baja o nula eliminación del microorganismo; no obstante si el aislamiento de la bacteria confirma la enfermedad, su ausencia no asegura lo contrario.

El aislamiento del microorganismo en los grupos 1 y 3 confirmó el diagnóstico de la enfermedad, ya que estos grupos habían resultado positivos a brucelosis en la Prueba de Aglutinación en Tarjeta.

Con respecto a los medios de cultivo selectivos que han de utilizarse en el aislamiento primario de *Brucella*, la literatura recomienda la utilización de medios de cultivo selectivos; estos son medios base a los que se les añaden antibióticos, fungicidas y en determinadas ocasiones colorantes capaces de inhibir la presencia de microorganismos contaminantes que dificulten el crecimiento de *Brucella*, al crecer más rápidamente que esta, y por lo tanto, la realización de un diagnóstico bacteriológico correcto, sobre todo cuando se procede a la siembra de material altamente contaminado (2, 9, 29).

Autores como Kuzdas, Morse y Renoux, han descrito medios selectivos compuestos de antibióticos, fungicidas y colorantes con los que obtuvieron buenos resultados en el aislamiento primario (28, 29).

Más recientemente Farrell (1974) elabora un medio selectivo en el que incorpora un total de 6 sustancias inhibidoras de microorganismos contaminantes. Este medio selectivo es en la actualidad ampliamente utilizado por su excelente calidad, poder de selección y

capacidad de asegurar el crecimiento de las especies de *Brucella*, a excepción de *B. ovis*. (2, 14, 29).

En relación al medio de cultivo selectivo de Farrell utilizado en el primoaislamiento del presente estudio, se observaron resultados al aislamiento satisfactorios en los grupos 1 y 2, ya que además de haber obtenido gran cantidad de aislamientos, se redujo en gran medida el crecimiento de microorganismos contaminantes facilitando el aislamiento de *Brucella*. Con respecto al grupo 3, también se observaron buenos resultados en el primoaislamiento, ya que se sólo se presentaron pocos casos de contaminación en las muestras, no interfiriendo con los resultados al aislamiento.

Los resultados a las pruebas bioquímicas han sido recomendados en la identificación de las especies de *Brucella*, Alton y col. 1988 (2).

Particularmente en lo que se refiere a la prueba de la ureasa, Corbel y col. (1985) realizaron un estudio en el que examinaron 604 cepas pertenecientes a las 6 especies de *Brucella* procedentes de varios países, entre estos México. La mayoría de estas cepas pertenecían a la biovariedad 1 tanto de *B. abortus* como de *B. melitensis*. En este trabajo se menciona que esta prueba es sólo sugestiva para diferenciar especies de *Brucella*, en relación al tiempo de reactividad a la urea. La mayoría de las cepas de *B. suis*, *B. canis* y *B. neotomae* que examinaron Corbel y col. mostraron una actividad rápida a la urea (menos de 15 minutos) como lo establece la literatura, aunque encontraron cepas positivas hasta en un lapso de 1 hora. Con respecto a *B. abortus* y *B. melitensis* encontraron que la mayoría de las cepas examinadas resultaron positivas a la urea en un lapso que iba desde 1 hasta 24 horas; también observaron que las cepas de *B. abortus* tenían una reactividad relativamente más rápida que las cepas de *B. melitensis*. Cabe resaltar que encontraron cepas negativas de *B. abortus* y *B. melitensis* e inclusive cepas de *B. ovis* con reacción positiva, lo cual no es habitual en estas especies; en conclusión se menciona que esta prueba no es

definitiva para diferenciar especies del género *Brucella* con base al tiempo de reactividad, y que en el caso de *B. abortus* y *B. melitensis* esta prueba es menos confiable para diferenciar ambas especies (10).

En el presente estudio la mayoría de los aislamientos tanto de *B. melitensis* como de *B. abortus* fueron positivos a la urea en un lapso de 3 a 5 horas, sugiriendo que estos pudieran pertenecer a estas especies, tomando como relación que la cepa de *B. suis*(1330) utilizada como control resultó positiva a los 15 minutos, como lo establece la literatura. Sin embargo no se encontró diferencia en el tiempo de reactividad entre ambas especies. Cabe señalar como menciona Corbel y col. (1985) que la prueba de ureasa no es definitiva para diferenciar especies de *Brucella*, sobre todo tomando en cuenta que se pueden encontrar resultados atípicos con respecto al comportamiento habitual de las bacterias de este género según lo establecido por la literatura.(2, 10)

Las pruebas de producción de H_2S , requerimiento de CO_2 y crecimiento en presencia de colorantes, son pruebas importantes para diferenciar especies y biovariedades de *Brucella*.

En los aislamientos obtenidos en el presente trabajo , las pruebas de producción de H_2S y requerimiento de CO_2 fueron determinantes para establecer la especie a la que pertenecían, ya que ningún aislamiento de *B. melitensis* presentó producción de H_2S , además de que no necesitaron atmósfera enriquecida con CO_2 para su crecimiento, mientras que los aislamientos de *B. abortus* presentaron una marcada producción de H_2S y siempre necesitaron de atmósfera enriquecida con CO_2 para su crecimiento, concordando con lo establecido en la literatura (2, 9).

La prueba de crecimiento en presencia de colorantes fue determinante para establecer la biovariedad en los aislamientos de *B. abortus*, ya que sólo las biovariedades 1 y 4 no crecen en presencia del colorante Tionina a ninguna concentración. Las cepas de *B. abortus*

que se aislaron no crecieron en presencia del colorante Tionina a ninguna concentración, lo que indicó que las cepas aisladas pudieran pertenecer a las biovariedades 1 ó 4.

La prueba de fagotipificación ha sufrido gran evolución desde que en la Ex-Unión Soviética en 1955 Podkadze y Abashidze aislaron el fago Tbilisi (Tb), siendo el primer bacteriófago estable del género *Brucella*. Con posterioridad se han aislado otros bacteriófagos que, con mayor o menor éxito se han aplicado a la identificación de *Brucella* (8, 11, 14).

M. Moreira-Jacob(1968) reportó el aislamiento de tres nuevos fagos designados como A422, M58 y S708, estos fagos fueron examinados por Morris y col. (1973), quienes concluyeron que al igual como sucede con el fago Tb, estos fagos lisaron sólo las cepas identificadas como *B. abortus*, y ninguno de los fagos fue capaz de lisar las cepas de *B. melitensis* (8, 26).

El aislamiento y estudio de los fagos Bk₀, Bk₁ y Bk₂, específicos de *Brucella melitensis*, fue realizado por Douglas y Elberg entre 1976 y 1978. Si bien estos trabajos representaron un notable avance dentro la fagotipia aplicada a la identificación de *B. melitensis*, Corbel estima que existen imperfecciones, debidas fundamentalmente, a la gran variabilidad de este fago. Según este autor han surgido problemas con el fago Bk₂ debido a las dificultades de su propagación y a una lisis pobre o poco definida en muchas cepas de *B. melitensis* (8).

La tipificación del genero *Brucella* se basa principalmente en el estudio de la lisis por bacteriófagos ya que permite una fácil y rápida identificación de especies, principalmente cuando se trata de diferenciar *B. melitensis* y *B. abortus* (5, 8, 14).

Los resultados de la fagotipificación de las cepas aisladas en el presente estudio confirmaron plenamente la identificación por especie, concordando con lo establecido en la literatura (12), ya que los aislamientos de los grupos 1 y 2 se identificaron como *B. melitensis* al ser lisados parcialmente por los fagos Bk₂ e Iz, mientras que los aislamientos

del grupo 3 se identificaron como *B. abortus* al ser lisados por los fagos Tb, Wb, Bk₂, Iz y Fi.

La identificación, tipificación y biotipificación de los aislamientos de *Brucella* es importante para la realización de estudios epidemiológicos sobre distribución y prevalencia de las especies y biovariedades (4, 5, 14, 21).

En el presente estudio al realizar las pruebas de identificación, tipificación y biotipificación, no se encontraron resultados atípicos en las cepas aisladas en relación con lo establecido en la literatura (2, 9).

En 1981 en un estudio realizado en el Centro de Salud Animal de Santa Ana Tecamac, México, se encontró que los biotipos de *B. abortus* que prevalecían en muestras de leche de bovino eran el biotipo 1 (57.5%), biotipo 4 (35%), biotipo 2 (2.5%) y biotipo 9 (2.5%) (3).

En un trabajo donde se realizaron aislamientos de *B. abortus* a partir de muestras de leche procedentes de bovinos Holstein adultos revacunados con dosis reducida de la cepa 19 en el Edo. de México, se obtuvieron los siguientes resultados: De 100 aislamientos de *B. abortus* en 61 casos se determinó el biotipo; treinta y cuatro de ellos correspondieron al biotipo 4 y veinticuatro al biotipo 1. Los biotipos 2, 7 y 9 se aislaron en una ocasión y en ningún caso se recuperó cepa vacunal (19).

En 1983 se hizo un estudio en Mexicali a 5430 bovinos, los cuales se examinaron serológicamente y por cultivo de muestras de leche. De 53 vacas examinadas bacteriológicamente se aislaron cinco cepas de *B. abortus* biotipo 1 y dos cepas del biotipo 2 (15).

Según el Centro Panamericano de Zoonosis en el continente Americano, el biotipo de mayor prevalencia de *B. abortus* es el 1, seguido por orden en el número de aislamientos por el 4, el 2, el 6 y el 9. Con respecto a *B. melitensis* el biotipo más frecuente es el 1 (15).

Los resultados en la prueba de aglutinación con antisueros monoespecíficos del presente trabajo, indicaron que los aislamientos se identificaron como biovariedad 1 tanto como para *B. melitensis* como para *B. abortus*. Al ser identificados los aislamientos como biovariedad 1, se puede pensar que algunos pudieran pertenecer a cepas vacunales, ya que la cepa Rev-1 de *B. melitensis* y la cepa 19 de *B. abortus* pertenecen a la biovariedad 1; sin embargo en ninguno de los casos se logró aislar cepas vacunales.

De acuerdo al resultado obtenido en el presente estudio y lo reportado en la literatura, se indica que la biovariedad 1 es la que más prevalece en nuestro país como en el Continente Americano tanto para *B. melitensis* como para *B. abortus*, siendo importante para la realización de análisis epidemiológicos sobre prevalencia y distribución de especies y biovariedades. Además en el caso de *B. abortus* la biovariedad 1 se considera universal, siendo la que más predomina de las demás biovariedades que ocurren en el mundo. En América Latina se ha comprobado que más del 80% de las cepas aisladas de *B. abortus* correspondían a la biovariedad 1 (1, 15).

CONCLUSIONES.

El mayor porcentaje de aislamiento en los órganos obtenidos a la necropsia en los grupos de caprinos se obtuvo a partir de los nódulos linfáticos, seguido por el bazo, la glándula mamaria y el útero.

En el grupo 2, donde se obtuvo el porcentaje de aislamiento por tipo de nódulo linfático, se observó que en los nódulos submaxilares se logró el porcentaje de aislamiento más alto debido a su proximidad con el sitio de inoculación de la cepa de desafío, la cual se inoculó vía conjuntival.

Con la prueba de fagotipificación se confirmó plenamente la identificación por especie de las cepas aisladas.

No se encontraron resultados atípicos en las pruebas realizadas a las cepas aisladas.

El aislamiento del microorganismo confirmó la presencia de la enfermedad en los grupos 1 y 3 que eran positivos en la Prueba de Aglutinación en Tarjeta.

No se identificaron cepas vacunales en ninguno de los aislamientos obtenidos en los 3 grupos.

El resultado de la biotipificación, en donde las cepas aisladas se identificaron como biovariedad 1 tanto para *B. melitensis* como para *B. abortus*, confirma lo reportado en la literatura en donde se establece que la biovariedad 1 es la que presenta una mayor prevalencia tanto en México como en el Continente Americano, siendo importante en la realización de estudios epidemiológicos.

LITERATURA CITADA.

1. Acha, P. N.: Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales domésticos. *CPS-OMS*. Washington, 1986.
2. Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. and Verger, J. M.: Techniques for the Brucellosis Laboratory. *Institut National de la Recherche Agronomique*. Paris, 1988.
3. Angulo, B. G., García, Z. S.: Estudio retrospectivo sobre los diferentes biotipos de *Brucella abortus* aislados en el Centro Nacional de Salud Animal de Santa Ana Tecamac, México (SARH). Memorias del II Foro Nacional de Brucelosis. México, D. F. 1988. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.*, U. N. A. M., CANIFARMA, México, D. F. (1988).
4. Blasco, J. M., Marín, C. M., Barberán, M., Moriyón, I., Gamazo, C. y Jiménez, M. P.: Tratado de Veterinaria práctica. Ovis. *Luzans*. Madrid, 1990.
5. Blasco, J. M., Nicoletti, P. y Verger, J. M.: Tratado de Veterinaria práctica. Bovis. *Luzans*, 1986.
6. Carter, G. R.: Bacteriología y Micología Veterinarias. *El Manual Moderno*. México, 1985.
7. Corbel, M. J.: Recent advances in brucellosis. *J. Med. Microbiol.* 46: 101-103 (1997).
8. Corbel, M. J.: Recent advances in *Brucella*- phage research. *Vet. Bull.*, 54: 65-74 (1984).
9. Corbel, J. M., Gill, K. P. and Thomas, E. L.: Methods for the identification of *Brucella*. *Ministry of Agriculture, fisheries and food*. Weybridge, 1983.
10. Corbel, J. M. and Hendry, F. D.: Urease activity of *Brucella* species. *Res. vet. Sci.*, 38: 252-253 (1985).
11. Corbel, J. M. and Thomas, E. L.: Use of phage for the identification of *Brucella canis* and *Brucella ovis* cultures. *Res. vet. Sci.*, 38: 35-40 (1985).
12. Corbel, J. M. and Thomas, E. L.: The *Brucella* phages their properties characterisation and applications. *Ministry of Agriculture, fisheries and food*. Weybridge, 1980.

13. Corro, E. S.: Compendio de Bacteriología Veterinaria y su importancia en Salud Pública. Tesis de Licenciatura. *FES. Cuautitlán.*, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 1994.
14. Crespo, L. F.: Brucelosis ovina y caprina. *Office International Des Epizooties.* Paris, 1994.
15. García, C. C.: La brucelosis de los animales en América y su relación con la infección humana. *Office International Des Epizooties.* Paris, 1987.
16. Gyles, C. L., Thoen, Ch. O. and Enright, F.: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. *The Iowa State University Press.* Iowa, 1986.
17. Hagan, W. A., Bruner, W. D., Gillespie, H. J. y Timoney, F. J.: Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 4a. Ed. *La Prensa Médica Mexicana.* México, D.F. 1983.
18. Hernández, M. I., Peña, F. G. P. y Betancourt, M. X.: Manual de Procedimientos de Laboratorio. INDRE. SAGAR. Brucelosis. *Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.* México, D. F. 1996.
19. Hitos, F., García, Z. S. y Angulo, G. B.: Aislamiento de *Brucella abortus* biotipos 1, 2, 4, 7, y 9 a partir de muestras de leche procedentes de bovinos Holstein adultos revacunados con dosis reducida de la cepa 19 y su relación con la prueba de Fijación del Complemento. *Rev. Vet. Méx.: 14(1).* 35-38 (1983).
20. Jawetz, E., Melnick, L. J. y Adelberg, A. E.: Microbiología Médica. 14a. Ed. *El Manual Moderno,* México, D.F. 1992.
21. López, M. A.: Brucelosis avances y perspectivas. *Secretaría de Salud. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos.* México, D. F. 1991.
22. Mancera, M. A., Díaz, A. E., Vázquez, N. J., Velázquez, Q. F., Suárez, G. F. y Flores, C. R.: Vacunación de cabras con la cepa Rev-1 de *Brucella melitensis* en diferentes dosis: Evaluación serológica y desafío. *Rev. Vet. Méx., 2:* 117-123 (1992).

23. Marin, M. P., Grilló, M. J., Jiménez de Bagués, M. y Blasco, J. M.: Transmisión de *Brucella melitensis* en ganado ovino de una generación a la siguiente. VI Jornadas sobre Producción Animal. *Depto. Sanidad Animal*. Zaragoza, España. (1995).
24. Méndez, R. I., Namihira, G. D., Moreno, A. L. y Sosa, M. C.: El Protocolo de Investigación. 2a. Ed. *Trillas*. México, D. F. 1990.
25. Meyer, M. E. : Evolutionary Development and Taxonomy of the genus *Brucella* in: *Advances in Brucellosis Research*. Edited by: Adams, L. G. 12-36. *Texas A & M. University Press*, College Station, Texas. 1990.
26. Morris, J. A., Corbel, J. M. and Phillip, J. I.: Characterization of three phages lytic for *Brucella species*. *J. Gen. Virol.*, 20: 63-73 (1973).
27. Pérez, M. J., Miranda, M. R., Vázquez, M. R., Romo, G. A., Rodríguez, S. C. y Nader, G. E.: Procedimientos de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. U.N.A.M. México, D. F. 1987.
28. Renoux, G., Alton, G., Amarasinghe, A. et Saquet, E.: Presence et repartition de *B. melitensis* dans les tissus et les organes des caprins artificiellement infectes. *Ext. Arch. Inst. Parteur. Tunis*, 33: 397-402 (1956).
29. Robertson, L., Farrell, I. D. and Hinchliffe, P. M.: The isolation of *Brucella* from contaminated sources. A Review. *Br. vet. J.* 33: 93-100 (1977).
30. Ruiz, C. M.: Brucelosis. 3a. Ed. *La Prensa Médica Mexicana*. México, D.F. 1986.
31. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Federación de Colegios Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México.: *Manual de actualización técnica para la aprobación del Médico Veterinario en el diagnóstico de la Tuberculosis Bovina y la Brucelosis*. México, 1995.

32. Soberón, M. A., Maldonado, E., Díaz, A. E., Hernández, A. L. y Suárez, G. F.: Evaluación de la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en cabras adultas. Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Morelos, México. 1996. *Fac. de Med. Vet y Zoot.*, U. A. E. M., Morelos, México.
33. Suárez, G. F.: Brucelosis: Un viejo problema de actualidad. Memorias Magistrales del Congreso Internacional de Producción Caprina, Simposio Internacional sobre Brucelosis Caprina. Zacatecas, México. 1995. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.*, U. A. Z., Zacatecas, México. (1995).

CUADRO 1 CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES ENTRE *Brucella*
Y OTROS MICROORGANISMOS GRAM NEGATIVOS.

| ESPECIE | <i>Brucella</i> | <i>Bordetella bronchiseptica</i> | <i>Campylobacter fetus</i> | <i>Moraxella</i> | <i>Acinetobacter</i> | <i>Yersinia enterocolitica</i> O9 | CEPAS | CEPAS | CEPAS |
|---|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------|----------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | pequeños cocobacilos | pequeños cocobacilos | forma de coma | diplococos | diplococos | bacilos | GRUPO 1 Pequeños cocobacilos | GRUPO 2 Pequeños cocobacilos | GRUPO 3 Pequeños cocobacilos |
| Producción de ácido en agar con glucosa | -(a) | - | - | - | v | v | - | - | - |
| Oxidasa | +b) | + | + | + | - | - | + | + | + |
| Ureasa | +c) | + | - | v | v | + | + | + | + |
| Utilización de citrato | - | + | - | - | v | - | - | - | - |

Fuente: Atton, G. G., Jones, J. M., Angus, R. D. and Verger, J. M.:
Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National
National de la Recherche Agronomique. Paris, 1938.

En este cuadro se observa que las cepas aisladas
en los tres grupos pertenecen al género *Brucella*.

+ = reacción positiva.
- = reacción negativa.
v = variable.

- a) *B. neotomae* puede producir alguna fermentación.
b) Excepto *B. ovis* y algunas cepas de
B. neotomae *B. abortus* que son negativas.
c) Excepto *B. ovis*
y ocasionalmente *B. abortus* que son negativas

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
 CENTRO NACIONAL DE BIODIVERSIDAD

CUADRO 2. IDENTIFICACIÓN DE *Brucella*

Determinación de las principales técnicas aplicadas para la tipificación *Brucella*

| ESPECIE | BIOVARIEDAD | NECESIDAD DE CO ₂ | PRODUCCIÓN DE H ₂ S | UREASA | OXIDASA | CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE COLORANTES | | | | | | AGLUTINACIÓN CDN ANTISUEROS MONOESPECÍFICOS | | HOSPEDADOR HABITUAL |
|----------------------|-------------|------------------------------|--------------------------------|--------|---------|--|------|------|---------|----|-----------|---|---|------------------------|
| | | | | | | Tionina | | | Fucaina | | Safranina | | | |
| | | | | | | 10 | 20 | 40 | 10 | 20 | 100 | A | H | |
| <i>B. melitensis</i> | 1 | - | - | +b | + | +AB | +A+B | -A+B | + | + | + | - | + | caprinos ovinos |
| | 2 | - | - | +b | + | + | + | + | + | + | + | - | - | |
| | 3 | - | - | +b | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| <i>B. abortus</i> | 1 | +a | + | +c | + | - | - | - | + | + | + | + | - | bovinos |
| | 2* | +a | + | +c | + | - | - | - | - | v | + | - | - | |
| | 3 | +a | + | +c | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| | 4 | +a | + | +c | + | - | - | - | + | + | + | - | + | |
| | 5 | - | - | +c | + | + | + | + | + | + | + | - | + | |
| | 6 | - | - | +c | + | + | + | - | + | + | + | - | + | |
| <i>B. suis</i> | 1 | - | + | +d | + | + | + | + | - | -g | - | + | - | Blo 1 porcino |
| | 2 | - | - | +d | + | + | + | + | - | - | - | + | - | Blo 2 liebre y porcino |
| | 3 | - | - | +d | + | + | + | + | + | + | - | + | - | Blo 3 porcino |
| | 4 | - | - | +d | + | + | + | + | - | -h | - | + | + | Blo 4 reno |
| | 6 | - | - | +d | + | + | + | + | - | - | - | + | + | Blo 5 roedor silvestre |
| <i>B. neotomae</i> | - | - | +d | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | rata del desierto |
| <i>B. ovis</i> | - | - | - | - | - | + | + | + | - | -h | - | - | - | ovinos |
| <i>B. canis</i> | - | - | +d | + | + | + | + | + | - | -h | + | - | - | perros |

En este cuadro se observan las diferentes especies y biovariades de *Brucella* y sus resultados a las pruebas de identificación; este es un cuadro de referencia para comparar los resultados de las pruebas realizadas a las cepas aisladas.

- a) Usualmente positiva en el aislamiento primario.
 b) Actividad intermedia, en algunas cepas rápida.
 c) Actividad intermedia, excepto en la cepa de referencia 544 (biovariedad 1), y ocasionalmente algunas cepas patógenas que son negativas.
 d) Actividad rápida
 e) Excepto la biovariedad 3, aislada en Senegal y Guinea Bissau que es negativa.
 f) Algunas cepas aisladas en Canadá, Gran Bretaña y USA no crecen en colorantes.
 g) Algunas cepas fucaina resistentes han sido aisladas en Sudamérica y Sureste de Asia.
 h) Negativa para muchas cepas.
 v) Variable, 50% positivas.
 * Requiere de suero.
 A) Sin presencia de CO₂.
 B) En presencia de CO₂.

+ = Reacción o crecimiento positivo.
 - = Reacción o crecimiento negativo.
 v = variable.

CUADRO 3. RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS APLICADAS PARA LA TIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS.

| ESPECIE | BIOVARIEDAD | NECESIDAD DE CO ₂ | PRODUCCIÓN DE H ₂ S | UREASA | OXIDASA | CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE COLORANTES | | | | | | AGLUTINACIÓN CON ANTISUEROS MONOESPECÍFICOS | | |
|-------------------------------|-------------|------------------------------|--------------------------------|--------|---------|--|------|------|--------|----|-----|---|---|---|
| | | | | | | Tionina | | | Fucina | | | Safranina | A | B |
| | | | | | | 10 | 20 | 40 | 10 | 20 | 100 | | | |
| GRUPO 1 | 1 | - | - | + | + | +AB | +A+B | -A+B | + | + | + | - | + | |
| GRUPO 2 | 1 | - | - | + | + | +AB | +A+B | -A+B | + | + | + | - | + | |
| GRUPO 3 | 1 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + | - | |
| Cepas utilizadas como control | | | | | | | | | | | | | | |
| 544 (1) | 1 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | |
| 18 M (2) | 1 | - | - | - | + | +AB | +A+B | -A+B | + | + | + | - | + | |
| 1330 (3) | 1 | - | - | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | |
| B. ovis* | | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | - | |

En este cuadro se aprecian los resultados de las pruebas aplicadas para la identificación de las cepas aisladas.

Los aislamientos de los grupos 1 y 2 se identificaron como *B. melitensis* biovariedad 1; en el grupo 2 los aislamientos corresponden a la cepa de desalojo.

Los aislamientos de grupo 3 se identificaron como *B. abortus* biovariedad 1.

- (1) Cepa de referencia biovariedad 1 de *B. abortus*
 - (2) Cepa de referencia biovariedad 1 de *B. melitensis*
 - (3) Cepa de referencia biovariedad 1 de *B. suis*
- * Aislamiento de campo utilizado como cepa "control"

CUADRO 4. FAGOTIPIA DE *Brucella* CON LOS FAGOS MAS UTILIZADOS ACTUALMENTE

| GRUPO | FAGO a la DHP | Brucella abortus | Brucella suis | Brucella melitensis | Brucella neotomes | Brucella canis | Brucella ovis | CEPAS GRUPO 1 | CEPAS GRUPO 2 | CEPAS GRUPO 3 | Cepas utilizadas como control | | |
|-------|---------------|------------------|---------------|---------------------|-------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------------------------|---------|-------------|
| | | | | | | | | | | | 544 (1) | 16M (2) | B. ovis (3) |
| 1 | Td | L | NL | NL | NL o LP | NL | NL | NL | NL | L | L | NL | NL |
| 2 | F1 | L | LP | NL | L | NL | NL | NL | NL | L | LP | NL | NL |
| 3 | Wb | L | L | V NL | L | NL | NL | NL | NL | L | L | NL | |
| 4 | Bk | L | L | L o LP | L | NL | NL | LP | LP | L | L | L | |
| 5 | R/C | NL | NL | NL | NL | L | L | NL | NL | NL | NL | NL | L |
| 6 | tz | L | L | L o LP | L | NL | NL | LP | LP | L | L | LP | NL |

Fuente: Corbel, M. J. y Thomas, E. L.:
The *Brucella* phages their properties characterization
and applications. 1980.

En este cuadro se aprecia que los aislamientos de los grupos 1 y 2
se tipificaron como *B. melitensis*, y los aislamientos del grupo 3 como *B. abortus*.

- | | |
|--------------------|--|
| L = lisis | 1) Cepas biovariedad 1 de <i>B. abortus</i> |
| NL = No lisis | 2) Cepas biovariedad 1 de <i>B. melitensis</i> |
| LP = lisis parcial | 3) Cepas aislamiento de campo. |
| V = variable | |

DHP = Dilución fagica necesaria que produce una lisis completa de un crecimiento bacteriano.

CUADRO 5. Características diferenciales entre la Cepa 19 de *Brucella abortus* y la cepa de campo de *Brucella abortus* biovariedad 1.

| CEPA | Requerimiento de CO ₂ | | Crecimiento en medio que contiene : | |
|--|----------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------|
| | | | Eritritol (1 mg/ml) | Penicilina (5 UI/ml) |
| Típica biovariedad 1 | +a | | + | +a |
| Cepa 19 vacunal. utilizada como control | - | | -b | - |
| Cepas GRUPO 3 | + | | + | + |
| S44 biovariedad 1 utilizada como control | + | | + | + |

Fuente: Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. and Verger, J. M.:
Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National
de la Recherche Agronomique. Paris, 1988.

- a) Usualmente positiva en el aislamiento primario.
- b) La cepa puede mutar y crecer en presencia de eritritol.
- + = crecimiento positivo.
- = crecimiento negativo.

En este cuadro se aprecia que los aislamientos del GRUPO 3 (bovinos) pertenecen a cepas de campo.

CUADRO 6. Características diferenciales entre la cepa Rev - 1 vacunal *Brucella melitensis* y la cepa de campo típica de *Brucella melitensis* biovariedad 1

| CEPA | Crecimiento en medio que contiene : | |
|---|-------------------------------------|------------------------------|
| | Penicilina (5 UI/ml) | Estreptomicina (2.5 µg/ml) |
| Típica biovariedad 1 Rev - 1 | + | - |
| Cepa vacunal utilizada como control | - | + |
| 16 M Biovariedad 1 utilizada como control | + | - |
| CEPAS GRUPO 1 | + | - |
| CEPAS GRUPO 2 | + | - |

Fuente : Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. and Verger, J. M.:
Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National
de la Recherche Agronomique. Paris, 1988.

En este cuadro se aprecia que las cepas aisladas en ambos grupos pertenecen a cepas de campo; en el caso del grupo 2 la cepa aislada es la de desafío.

CUADRO 7.

PREPARACION DE PLACAS DE PETRI CON COLORANTES

Cuentas para preparar 100 ml de cada medio con colorante.

| Dilución del colorante | Concentración en µg del colorante | Soluciones madre de colorantes | | |
|------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Tionina 0.1% | Fucsina 0.1% | Safranina 1% |
| 1/25 000 | 40 | 4ml colorante/ 96ml medio | - | - |
| 1/50 000 | 20 | 2ml colorante/ 98ml medio | 2ml colorante/ 98ml medio | - |
| 1/100 000 | 10 | 1ml colorante/ 99ml medio | 1ml colorante/ 99ml medio | - |
| 1/10 000 | 100 | - | - | 1ml colorante/ 99ml medio |

Fuente : Alton, G. G., Jones, L. M., Angua, R. D. and Verger, J. M.:
Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National
de la Recherche Agronomique. Paris, 1988.

No. de animales.

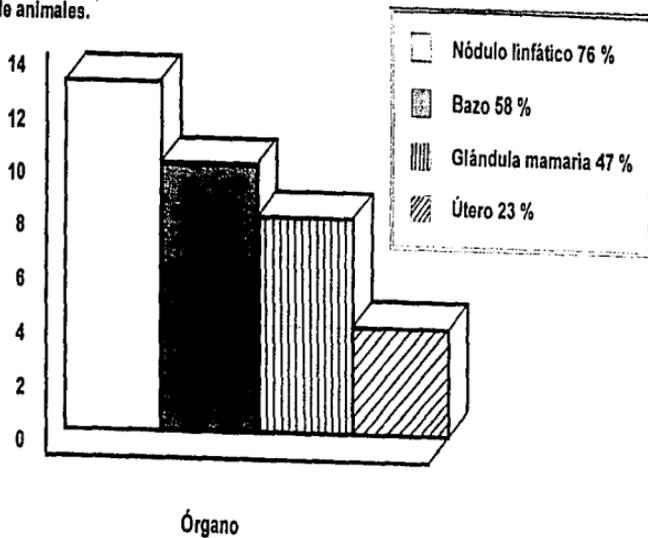


FIGURA 1. NÚMERO DE ANIMALES CON AISLAMIENTO. (Por órgano).

Total : 32 caprinos.

* 17 animales con aislamiento (100%).

GRUPO 1.

No. de animales.

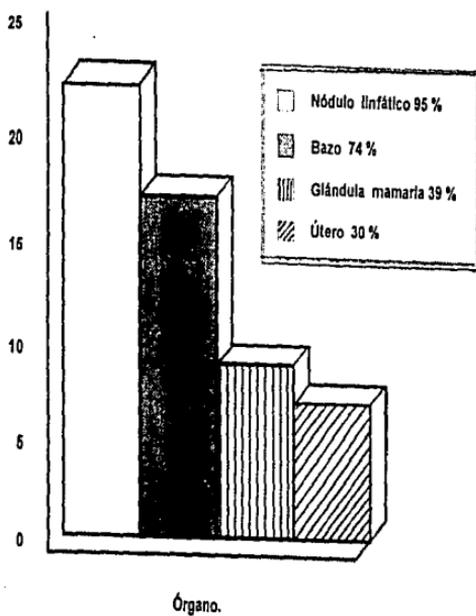


FIGURA 2. NÚMERO DE ANIMALES CON AISLAMIENTO. (Por órgano).

Total : 35 caprinos.

• 23 animales con aislamiento. (100%)

GRUPO 2.

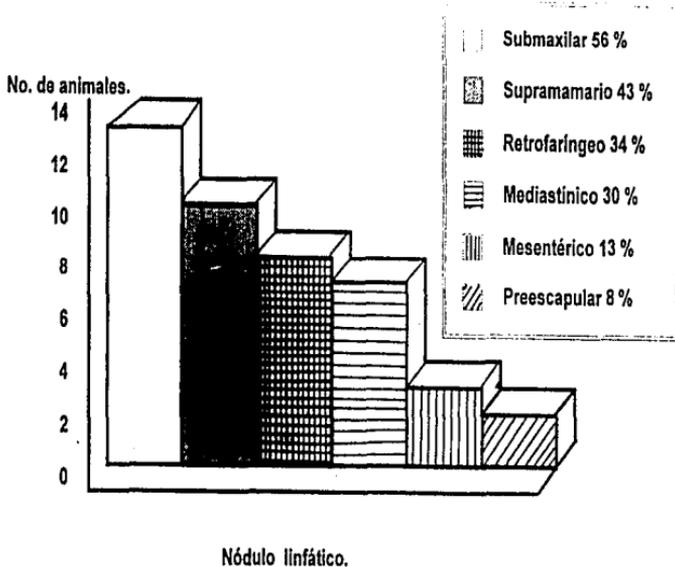


FIGURA 3. NÚMERO DE ANIMALES CON AISLAMIENTO. (Por nódulo linfático).

* 22 animales con aislamiento en nódulos linfáticos (100%).

GRUPO 2.