

BACTERIOLOGIA Y FAGOTIPIFICACION DE BRUCELAS AISLADAS DE CAPRINOS Y BOVINOS ^a

Héctor Villegas Albarrán ^b
Laura Hernández Andrade ^c
Efrén Díaz Aparicio ^{c,d}
Francisco Suárez Güemes ^d

RESUMEN

Villegas A H, Hernández A L, Díaz A E, Suárez G F. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 37 No 1 1999 pp 63-69. Los objetivos de este estudio fueron realizar el aislamiento, identificación, biotipificación y fagotipificación de brucelas aisladas a partir de órganos obtenidos a la necropsia en caprinos y de muestras de leche en bovinos. Además conocer el porcentaje de aislamientos de *Brucella* a partir de los órganos obtenidos a la necropsia. Se trabajaron tres grupos de animales; el grupo 1 constó de 32 caprinos procedentes de Torreón, Coahuila sin antecedentes de vacunación, el grupo 2 lo conformó 35 caprinos de Ajuchitlán, Querétaro vacunados con Rev 1 a dosis reducida y desafiados experimentalmente con una cepa de campo de *B melitensis* biovariedad 1 y el grupo 3 constó de 55 vacas vacunadas con *B. abortus* cepa 19, provenientes del Estado de México. Los grupos 1 y 3 resultaron 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 fue el medio Farrell. La identificación y tipificación se llevó a cabo con pruebas convencionales. En el grupo 1 se logró el aislamiento en 17 caprinos (53%). Después de la tipificación todas las cepas resultaron ser *B melitensis* biovariedad 1. En el grupo 2 se logró el aislamiento en 23 animales (65%), en todos los casos sólo se aisló la cepa de desafío. En el grupo 3 se aisló *B abortus* biovariedad 1 de 6 animales (11%). Los nódulos linfáticos fueron los tejidos de donde se logró el mayor número de aislamientos, seguido por el bazo, glándula mamaria y útero. El resultado de la tipificación en el grupo de animales que presentaban una infección natural por *Brucella* coincide, en donde la biovariedad 1 es la que tiene mayor prevalencia tanto para *B melitensis* como para *B abortus* en México.

PALABRAS CLAVE: Brucelosis, Aislamiento, Caprinos, Bovinos.

La brucelosis es una zoonosis de gran importancia para la salud pública, los animales más comúnmente afectados son los bovinos, caprinos y porcinos; el contagio al hombre se considera accidental. Las fuentes de transmisión son la leche, el semen, material excretado por el tracto genital de la hembra y el producto de los abortos. Los signos más característicos en

los hatos son abortos en la última etapa de gestación, retenciones placentarias y esterilidad en los machos por orquitis o epididimitis, aunque también pueden existir higromas y abscesos; además de que la producción láctea disminuye. Los animales pueden quedar como portadores que eliminan *Brucella* al medio ambiente y contagiar, al resto de los animales, por el variable periodo de incubación y el estado latente del agente causal (1,2,3).

^a Recibido el 28 de enero de 1999 y aceptado para su publicación el 30 de marzo de 1999

^b Tesista de Licenciatura FMVZ UNAM

^c Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria. INIFAP-SAGAR. Km 15.5 Carr. México Toluca, Col. Palo Alto, Cuajimalpa, México D.F. CP 05110

^d Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Cd. Universitaria, México, D.F.

El diagnóstico bacteriológico es un método directo, el cual está orientado al aislamiento e identificación del agente etiológico, cuyo carácter diagnóstico es definitivo, ya que el crecimiento de la

bacteria es la confirmación de las demás pruebas. Para el aislamiento de *Brucella* se debe contar con las técnicas adecuadas para la obtención y procesamiento de las muestras, así como para su inoculación en los medios de cultivo apropiados, que eviten una posible contaminación del técnico (4, 5).

El material que puede ser utilizado para el aislamiento es el procedente del aborto como cotiledones placentarios, líquido amniótico, contenido gástrico, hígado y bazo fetales; material de necropsia como bazo, útero, glándula mamaria, nódulos linfáticos, submaxilares, parotídeos, retrofaríngeos, 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 (5).

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 éstos los más recomendados son: agar dextrosa con suero, agar infusión con papa y suero, tripticasa soya agar, agar triptosa y agar Brucela (Albimi) También existen medios líquidos como caldo triptosa soya, caldo triptosa y caldo Brucela, 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 también es

recomendable 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* que son sensibles a los colorantes (4,5).

Se han descrito varios bacteriófagos activos para el género *Brucella*, que no lisan a otros géneros de bacterias por lo que son de gran 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 Bk₀, Bk₁ y Bk₂ grupo 5 incluye los fagos para brucelas no lisas. Todos son derivados del fago R, el cual fue 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 Izatnahger (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 (6,7).

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

BACTERIOLOGIA Y FAGOTIPIFICACION DE BRUCELAS DE CAPRINOS Y BOVINOS

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. 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 los 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, que son el requerimiento de CO₂, la producción de H₂S, el crecimiento en presencia de colorantes y la aglutinación con sueros monoespecíficos (4,7).

Con bastante frecuencia, se presentan mutaciones en este género cuya expresión fenotípica se traduce en cambios en la morfología de las colonias, pérdida del requerimiento de CO₂ necesario para el crecimiento de algunas biovariedades, ausencia de producción de H₂S y de actividad uréasica y de la oxidasa y modificaciones en los patrones de sensibilidad a los colorantes y antibióticos (7).

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, ya que al tratarse de una vacuna viva un cambio en las características fenotípicas puede alterar su efectividad de protección.

Los objetivos de este trabajo fueron realizar el aislamiento, identificación, biotipificación y fagotipificación de brucelas aisladas a partir de órganos obtenidos a la necropsia, en caprinos y de muestras de leche en bovinos. Además, conocer el porcentaje de aislamientos de *Brucella* a partir de los órganos obtenidos a la necropsia.

Se trabajaron muestras de tres grupos de animales: el grupo 1 estuvo formado por 32 caprinos procedentes de Torreón, Coahuila, sin antecedentes de vacunación; el grupo 2 lo conformaron 35 caprinos de Ajuchitlán Querétaro, los cuales habían sido vacunados con Rev 1 a dosis reducida y desafiados experimentalmente vía conjuntival (la cepa de desafío era un aislamiento de campo de *Brucella melitensis* biovariedad 1 (1 X 10⁵ UFC/ml) y el grupo 3 constó de 55 bovinos productores de leche procedentes del Estado de México, vacunados con la cepa *B. abortus* 19. Los animales de los grupos 1 y 3 fueron positivos a brucelosis en la prueba de aglutinación en tarjeta.

Los caprinos se sacrificaron humanitariamente por el método de pistola de émbolo cautivo y se obtuvieron nódulos supramamarios, retrofaríngeos, submaxilares, preescapulares, mediastínicos y mesentéricos, bazo, útero y glándula mamaria, guardándose y conservándose a -20 C.

En los bovinos se logró el aislamiento a partir de muestras de leche, para lo que previamente se lavó y secó la ubre, se desinfectaron los pezones con etanol 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.

El medio de cultivo selectivo utilizado fue el Farrell, el cual está constituido de una base de agar brucela, suplemento selectivo de antimicrobianos y 5% de suero de ternera estéril.

Se realizó la disección a las muestras de órganos y nódulos linfáticos para remover la grasa y tejido excedente, se sumergieron en alcohol al 70% y se flamearon.

Las muestras se cortaron en pequeños pedazos para depositarlas en bolsas de plástico estériles, y se procedió a su maceración. En una proporción de dos partes de órgano y 10 partes de diluyente se añadió solución salina fisiológica estéril a las bolsas, las cuales se procesaron en un macerador de tejidos durante 20 segundos.

El macerado se distribuyó de manera uniforme por toda la superficie del medio Farrell con hisopos estériles.

Las muestras de leche se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min con la finalidad de separar la grasa del sedimento. Se realizó la siembra del sedimento como de la grasa. Las placas se inocularon por duplicado para su incubación en presencia y ausencia de CO₂.

Los cultivos del primoaislamiento se revisaron diariamente a partir de 48 h de

ser incubados y se sembraron nuevamente las colonias sospechosas de *Brucella*. Los cultivos del primoaislamiento que después de 10 días no indicaban crecimiento de colonias sospechosas fueron eliminados.

Una vez que se logró el crecimiento en las siembras, se realizaron frotis de los cultivos sospechosos y se examinaron con la tinción de Gram. A los frotis que indicaron características de la presencia de bacterias del género *Brucella* se les realizaron pruebas bioquímicas. Para la realización de estas pruebas, así como crecimiento en presencia de colorantes, fagotipificación y aglutinación con antiseros monoespecíficos A y M, se utilizaron cepas de referencia como controles.

Como los cultivos de *Brucella* tienden a modificarse de colonias en fase lisa a fase rugosa, se realizó la prueba de aglutinación con Acriflavina. Se observó que los cultivos problema permanecían en suspensión (cultivos en fase lisa), mientras que en un cultivo de *Brucella ovis* (aislamiento de campo) utilizado como cepa control, mostró formación de pequeños grumos (cultivo en fase rugosa).

Se utilizaron los fagos Tb, Wb, Iz, Bk₂, Fi y R/C a la dilución corriente de prueba, la cual es la dilución fágica o la 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 estandarizadas al 0.9×10^9 *Brucella*/ml en el espectrofotómetro a una densidad óptica de 0.165.

BACTERIOLOGIA Y FAGOTIPIFICACION DE BRUCELAS DE CAPRINOS Y BOVINOS

Para la diferenciación de cepas vacunales de cepas de campo se utilizó agar tripticosa soya adicionado con penicilina, a una concentración de 5 UI/ml, estreptomycin 2.5 µg/ml y meso-eritritol 1 mg/ml.

En el grupo 1 se logró el aislamiento en 17 animales (53%). Los aislamientos por órgano fueron: nódulos linfáticos en 13 animales (76%), bazo en 10 animales (58%), glándula mamaria en 8 (47%) y útero en 4 (23%).

En el grupo 2 se aisló la bacteria en 23 animales (65%), a partir de nódulos linfáticos en 22 animales (95%), bazo en 17 (74%), glándula mamaria en 9 (39%) y útero en 7 (30%). El porcentaje de aislamientos por nódulo linfático fue: nódulo submaxilar (56%), retrofaríngeo (34%), supramamario (43%), mediastínico (30%), mesentérico (13%) y preescapular (8%).

Los resultados de la fagotipificación de las cepas aisladas confirmaron plenamente la identificación por especie, 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.

En los grupos de caprinos los aislamientos fueron identificados como *B. melitensis* biotipo 1, cepa de campo. En los bovinos se logró el aislamiento en seis animales (11%) de *B. abortus* biotipo 1.

Con respecto al grupo 1, se observó mayor porcentaje de aislamientos a partir de los nódulos linfáticos (76%), seguido por el

bazo, la glándula mamaria y el útero; en el grupo 2 los aislamientos por órgano fueron similares; en este caso, se pudo establecer que en los nódulos submaxilares se obtuvo el mayor porcentaje de aislamientos (56%), lo que concuerda con Soberón (7,8), quien realizó aislamientos en cabras desafiadas experimentalmente por vía conjuntival con una cepa de campo de *B. melitensis*, principalmente a partir de los nódulos linfáticos submaxilares, por lo que 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 indica Renoux (9).

Alton (4) considera que los órganos blanco más frecuentes para el aislamiento de *Brucella* a partir de animales sacrificados tanto en hembras caprinas, ovinas y bovinas es el tejido linforreticular, seguido por el útero en gestación o puerperal y en la ubre.

Marín (10) realizó aislamientos de *B. melitensis* principalmente a partir de nódulos linfáticos en 17 ovejas procedentes de un rebaño infectado naturalmente por las biovariedades 1 y 3.

En relación con los aislamientos de *Brucella* a partir de muestras de leche, se conoce 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 de 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, para disminuir riesgo de

contaminación y aumentar la posibilidad de aislamiento.

En este estudio sólo se logró el aislamiento en seis animales de los 55 bovinos positivos a brucelosis en la prueba de aglutinación a tarjeta, debido a que sólo se realizó un muestreo y que posiblemente 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.

Con relación al medio de cultivo Farrell utilizado en este estudio, se observaron resultados satisfactorios al aislamiento en los grupos 1 y 2 ya que además de haber obtenido gran cantidad de aislamientos, se redujo el crecimiento de microorganismos contaminantes facilitando el aislamiento de *Brucella*. Para las muestras de leche, también se observaron buenos resultados en el primoaislamiento, ya que se presentaron pocos casos de contaminación en las muestras.

La tipificación del género *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*.

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. En este estudio, al realizar las pruebas de identificación, tipificación y biotipificación no se encontraron resultados atípicos en las cepas aisladas.

El aislamiento de *B. melitensis* y *B. abortus* biotipo 1 confirma que es la biovariedad que se presenta en mayor frecuencia en México, esta información es importante ya que contribuye al conocimiento epidemiológico de esta enfermedad.

BACTERIOLOGIC AND PHAGE-TYPING OF BRUCELLA ISOLATED FROM GOATS AND COWS

SUMMARY

Villegas A H, Hernández A L, Díaz A E, Suárez G F. *Téc. Pec. Méx.* Vol 37 No 1 1999 pp 63-69. The goal in this study was the identification, biotyping, and fagotyping of different *Brucella* strains isolated from 3 different groups of animals. A second goal was to learn the frequency of isolation of *Brucella melitensis* from the different internal organs of infected goats. Group 1, had 32 adult goats without previous vaccination against *Brucella*, these animals originated in Torreón, Coahuila. Group 2, had 35 goats from Ajuchitlan, Queretaro, these animals had had previous vaccination using *B. melitensis* Rev 1 vaccine in reduced dose, after vaccination they were challenged with *B. melitensis* field strain. Group 3, had 55 cows previously vaccinated with *B. abortus* strain 19, these animals were from the State of Mexico. All 3 groups were card test positive to brucellosis. For brucella isolation lymph-nodes, spleen, mammary gland, and uterus were taken from goats while; in the cows the isolation was done from milk samples in Farrell selective media. The identification and typing was done according to techniques previously reported. In group 1 *B. melitensis* was isolated from 17 goats (53%). After typing all the strains isolated were biotype 1. In group 2 the number of goats with isolation of *B. melitensis* were 23 (65%), in all cases the strain isolated was the challenged strain. In group 3 *B. abortus* biotype 1 was isolated from 6 of the 55 cows (11%). The lymph-node was the tissue with the highest frequency in isolation of the bacteria followed by the spleen, mammary gland and uterus. The typing results from the group of naturally infected goats, and cows is coincident with the biotype of *B. melitensis* and *B. abortus* respectively more frequently reported in Mexico, biotype 1 for both species.

KEY WORDS: Brucellosis, Bacteriology, Goats, Cows

REFERENCIAS

1. Acha P N, Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Publicación científica OPS, 1977: 98.
2. Angulo B G, García ZS.: Estudio retrospectivo sobre los diferentes biotipos de *Brucella abortus* aislados en el Centro Nacional de Salud Animal de Santa Ana Tecamac, México (SARH). Memorias de II Foro Nacional de Brucelosis. México, D.F. 1988 Fac, de Med. Vet y Zoot. UNAM CANIFARMA, México, D.F. 1988.
3. 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.
4. Alton G G, Jones L M, Angus RD, Verger J M: Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris. 1988.
5. Blasco J M, Nicoletti P y Verger J M: Tratado de Veterinaria Práctica. Bovis. Ed. Luzan , Madrid 1986.
6. Corbel M J. Recent advances in Brucella-phage research. Vet. Bull 1984; 54:65.
7. Soberón M A, Maldonado E C, Díaz A E, Hernández A L, 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.
8. Soberón M A. Protección conferida por la vacuna RB51 de *Brucella abortus* en cabras expuestas a la infección experimental por *Brucella melitensis*. Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1997:52.
9. Renoux G A, Alton G, Amarasinghe A, Saquet E. Presence et repartition de *B. melitensis* dans les tissus et les organes des caprins artificiellement infectés. Ext. Arch. Inst. Parteur. Tunis. 1956; 33:397.
10. Marín M P, Grilló M J, Jiménez de Bagués M, 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.