

English in
Bull. WHO 19 (1): 200-3, 1958

INFORME PRELIMINAR SOBRE UN MEDIO SELECTIVO PARA EL CULTIVO DE BRUCELAS, INCLUSIVE DE TIPO ABERRANTE*

LOIS M. JONES† y W. J. BRINLEY MORGAN

Laboratorio Central de Veterinaria, Weybridge, Surrey, Inglaterra

El empleo de medios que contengan antibióticos para el aislamiento selectivo de brucelas de materiales contaminados, ha sido uno de los progresos más útiles logrados recientemente en el diagnóstico de la brucelosis. El medio que describen Kuzdas y Morse (1), modificado por Renoux (2), ha sido probablemente el medio de esta clase más ampliamente utilizado. Este medio consta de agar albimi como base del nutriente con adición de actidione, polimixina B, bacitracina y etilo violeta para inhibir el desarrollo de los organismos contaminantes. Este medio ha resultado satisfactorio para el aislamiento de *Br. abortus* y *Br. melitensis* de infecciones experimentales de las cuales se sabía que el organismo infectante se desarrollaba bien en este medio. Se han recibido también informes de su utilidad para aislar brucela de fuentes naturales, tales como la leche (3, 4).

Sin embargo, se vio que ciertos tipos difíciles de *Br. abortus* no se desarrollan en este medio. Los cultivos que Huddleson (5) denomina "tipo II (Wilson)" no proliferan en medios comerciales tales como albimi, triptosa, y tripticasa de soya sin adición de suero o de otros nutrientes, ni tampoco en presencia de colorantes bacteriostáticos. No se conoce la frecuencia de estos tipos en la naturaleza, aunque han sido aislados en Francia (6), Estados Unidos (7, 8), Inglaterra (9) y Japón (10).

El presente estudio tenía por objeto encontrar una base de nutrientes para el medio antibiótico que: a) favoreciera el desarrollo de tipos aberrantes de brucela, y b)

eliminara la necesidad de importar un medio comercial.

MATERIALES Y METODOS

El estudio abarcó cultivos de brucela de características muy diversas. La mayoría de los cultivos se enviaron al Centro de Brucelosis de Weybridge para su tipificación, y se desecaron y reconstituyeron para el presente estudio. Muchos de ellos fueron desecados poco después del aislamiento primario. No se han desecado unas cuantas cepas recientemente aisladas.

Con la ayuda de una pipeta de goteo calibrada se dejaron caer en placas de agar diluciones adecuadas de suspensiones de cultivos de 48 horas en tubos inclinados que contenían suero y dextrosa (11). Las placas se vaciaron el día antes de ser utilizadas y se secaron mediante incubación durante toda la noche o abriendo una incubadora unas horas antes de su empleo. Después de la inoculación, todas las placas fueron incubadas en una atmósfera de CO₂ a la temperatura de 37° C. y fueron examinadas 5 días más tarde. Se procedió al recuento de las colonias y se sacó el promedio de dos o más placas para obtener las cifras que figuran en el cuadro.

Se compararon entre sí los cultivos en agar suero-dextrosa, sin sustancias bactericidas, en agar suero-dextrosa y antibióticos, en agar suero-dextrosa y colorantes (12) y en albimi con antibióticos (2). La composición de los medios y las instrucciones para preparar las placas son las siguientes:

Agar suero-dextrosa (SD)—1,5% agar, 1% peptona, 0,5% cloruro de sodio y 0,5% extracto de carne. Ajustese a pH 7,5. Colóquese en el autoclave a una presión de 10 libras por

* Publicado originalmente en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 19, No. 1, 1958.

† Consultor en brucelosis de la Organización Mundial de la Salud.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS EN CULTIVOS

Tipo de brucela	No. de cultivo	Antecedentes o fuentes	Número de colonias en los medios			
			SD	SDA	SD + co- lorantes	AA
<i>Br. abortus</i>	544	Cepa de referencia	73	77	59	70
	2308	Cepa de prueba EUA	103	137	140**	140
	E4	Leche bovina, Gran Bretaña	83	81	42**	80
	579	Feto bovino, Gran Bretaña	{ 91	104		98
	1125	Vaca Holstein-Frisia, Japón	{++++	{++++	{++++	{++++
<i>Br. abortus</i> Tipo II	Wilson 2454	Steele, CDC, Georgia, EUA	106	83	—	—
	Fruin-Aston	Aborto bovino, Gran Bretaña	133	102	—	—
	Davidson	Feto bovino, Gran Bretaña	108	3	—	—
	C96	Feto bovino, Gran Bretaña	{120	20	{—	{—
			{96	72	{—	{—
	23	Vaca Holstein-Frisia, Japón	100	1	—	—
	24	“ “ “ “	51	33	—	—
	46	“ “ “ “	74	22	—	—
	122	“ “ “ “	74	15	—	—
	123	“ “ “ “	92	37	—	—
	126	“ “ “ “	95	18	—	—
	137	“ “ “ “	123	100	—	—
	138	“ “ “ “	135	102	—	—
	143	“ “ “ “	{118	—	{—	{—
			{107	43	{—	{—
144	“ “ “ “	104	17*	—	—	
153	“ “ “ “	{106	38*	—	—	
		{145	77	—	—	
<i>Br. suis</i>	Luong	Vaca Jersey, Viet Nam meridional	124	89	—	80
	8973/56	Cultivo en sangre, niño, Londres	88	102	—	91
<i>Br. suis</i> Tipo danés	15/1a	Liebre, Francia	118	109	—	—
<i>Br. melitensis</i>	16M	Cepa de referencia	++	++		++
	H38	Cepa de prueba, Túnez	135	174	27**	139
	B20/57	Sangre humana, Uganda	132	137	—	159
	B21/57	“ “ “	89	106	98	106
	B22/57	“ “ “	130	228	182	70*
	B29/57	Leche bovina, Gran Bretaña	108	122	121	138
	A481	Feto bovino, Gran Bretaña	115	158	70**	170
	233054	Leche bovina, Gran Bretaña	132	171	126*	158
177	Cabra, Malta	100	109	—	111	
<i>Br. melitensis/abortus</i>	VRL	Khartoum, Sudán	153	198	190*	165
<i>Br. abortus/melitensis</i>	Johnson A	Feto bovino, Gran Bretaña	66	67	35**	76
	Johnson B	“ “ “ “	100	108	112**	122
	69	Leche bovina, Gran Bretaña	98	96	55**	108

* Colonias pequeñas.

** Colonias muy pequeñas. Todas las demás colonias tenían aproximadamente 1 mm. de diámetro.

pulgada cuadrada (0,7 Kg./cm.²) durante 15 minutos. Déjese enfriar a 50° C.

Agréguese suero de caballo inactivado al 5% y dextrosa al 1%. Mézclese bien y viértase en las placas.

Agar suero-dextrosa con antibióticos (SDA)—Agréguese al medio de suero-dextrosa anterior las siguientes sustancias, antes de verterlo en las placas:

- 25.000 unidades de bacitracina por litro
- 6.000 unidades de polimixina B por litro
- 100 mg. de actidiona por litro

Agar suero-dextrosa con colorantes (SD + colorantes)—Agréguese al mencionado medio SD las siguientes sustancias antes de verterlo en las placas:

- 1/500.000 verde malaquita y 1/250.000 violeta de genciana.

Agar albimi con antibióticos (AA)—Agar albimi derretido y enfriado a la temperatura de 50° C.

Agréguese las siguientes sustancias, mézclese bien antes de verterlo en las placas:

- 25.000 unidades de bacitracina por litro
- 6.000 unidades de polimixina B por litro
- 100 mg. de actidiona por litro
- 1/800.000 violeta de etilo

RESULTADOS

Los estudios preliminares revelaron que la *Br. abortus* tipo II no se reproduce en agar de infusión de hígado, ni en agar glicerol-dextrosa, pero lo hace en grado considerable en agar suero-dextrosa. La adición de los tres antibióticos permitieron el cultivo de este tipo, pero la de violeta de etiol impidió el crecimiento.

Se compararon el agar suero-dextrosa (SD), el agar suero-dextrosa con antibióticos (SDA), el agar suero-dextrosa con colorantes (SD + colorantes) y el agar albimi

con antibióticos (AA) para determinar su capacidad de permitir el cultivo de 15 cepas de *Br. abortus* tipo II y 21 cepas de *Br. abortus*, *Br. suis*, *Br. melitensis* y brucelas atípicas (véase el cuadro). En el SD + colorantes, el desarrollo de casi todas las cepas fue escaso, mientras que, en los otros tres medios, casi todas las cepas, excepto la *Br. abortus* tipo II, se desarrollaron de manera comparable. El SDA fue más favorable al crecimiento de *Br. abortus* tipo II que el AA, pero los recuentos de microorganismos en SDA no fueron siempre comparables con los recuentos en SD. Algunas preparaciones de placas con SDA dieron mejores recuentos con *Br. abortus* tipo II que otras. Se puso de manifiesto la necesidad de poner especial cuidado en mezclar completamente los antibióticos después de agregarlos a la base de agar nutriente. Se investiga si hay otros factores que contribuyan a esta discrepancia, por ejemplo: la fuente de peptona y el tamaño del lote de agar nutriente. Hay que señalar que el desarrollo de todas las cepas, con excepción de la *Br. abortus* tipo II, fue excelente en todas las preparaciones de SDA.

En experimentos limitados con materiales contaminados, el SDA resultó eficaz para prevenir el desarrollo de organismos contaminantes, al mismo tiempo que permitió el de brucela. Se proyectan otros experimentos con materiales de campo.

CONCLUSIONES

El agar suero-dextrosa con antibióticos promete ser más eficaz que los medios empleados con anterioridad para aislar tipos aberrantes de brucela de materiales contaminados. La substitución del agar albimi por la base de agar nutriente suero-dextrosa en medios antibióticos permite un mejor desarrollo de *Br. abortus* tipo II y un desarrollo comparable de los otros tipos de brucela.

REFERENCIAS

- (1) Kuzdas, C. D., y Morse, E. V.: *Jour. Bact.*, 66:502, 1953.
- (2) Renoux, G.: *Ann. Inst. Pasteur*, 87:325, 1954.
- (3) Burgisser, H.: *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 96: 521, 1954.
- (4) Baumgartner, H.: *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, 97:357, 1955.
- (5) Huddleson, I. F.: *Am. Jour. Vet. Res.*, 16: 264, 1955.
- (6) Wilson, G. S.: *Jour. Hyg. (Londres)*, 4:516, 1933.

- (7) Huddleson, I. F., y White, E. A.: *Mich. State Coll. Vet.*, 14:120, 1954.
- (8) Goode, E. R., Jr.; Amerault, T. E., y Manthei, C. A.: En: *United States Livestock Sanitary Association, Proceedings. Fifty-eighth annual meeting . . .*, Baltimore, Md., 1954, pág. 180.
- (9) Stableforth, A. W.: Comunicación personal, 1957.
- (10) Shibata, S.; Isayama, Y., y Murata, M.: *Bull. Nat. Inst. Anim. Hlth.* (Tokyo), No. 34, 29, 1958.
- (11) Miles, A. A., y Misra, S. S.: *Jour. Hyg.* (Londres), 38:732, 1938.
- (12) Stockmayer, W.: *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 128:205, 1933.