

86-11001-13

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA



“EVIDENCIA SEROLOGICA Y BACTERIOLOGICA DE INFECCION
BRUCELOSICA EN HUMANOS Y BOVINOS, EN MUESTRAS DE SANGRE Y
LECHE TOMADAS AL AZAR, EN DOS DEPARTAMENTOS DE LA REPUBLICA
DE EL SALVADOR”

SEMINARIO DE GRADUACION PRESENTADO POR:
ANA MIRIAM CARTAGENA ORTIZ
ANA MIRIAM ORTIZ PERAZA
ANA JULIA DIAZ LOPEZ

PREVIA OPCION AL TITULO DE
LICENCIATURA EN LABORATORIO CLINICO



ABRIL, 1984



SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

T
616-957
C322e

G.1

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA

EVIDENCIA SEROLOGICA Y BACTERIOLOGICA DE INFECCION BRUCELOSICA EN HUMANOS Y BOVINOS, EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE TOMADAS AL AZAR, EN DOS DEPARTAMENTOS DE LA REPUBLICA DE EL SALVADOR"

PRESENTADO POR:

BR. ANA MIRIAM CARTAGENA ORTIZ
BR. ANA MIRIAM ORTIZ PERAZA
BR. ANA JULIA DIAZ LOPEZ

MINARIO PRESENTADO ANTE EL JURADO CALIFICADOR DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE EL SALVADOR, EN SATISFACCION
COMERCIAL DE LOS REQUERIMIENTOS PREVIOS A LA OBTENCION DEL TITULO DE
Especialista EN LABORATORIO CLINICO.

DRA. LEONOR MURILLO DE LINARI
ASESOR

ABRIL - 1984



AGRADECEMOS:

- A DIOS NUESTRO SEÑOR, QUE NOS ILUMINO HAS TA ALCANZAR EL TRIUNFO OBTENIDO.
- A NUESTRO ASESOR DRA. LEONOR ISABEL MURILLO, A LOS SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO, CON ESPECIAL GRATITUD AL DR. CAYETANO ANTONIO MIRON.
- AL PERSONAL DE LABORATORIO DE LA DIVISION GENERAL DE GANADERIA, MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA
- AL DR. BALTASAR QUEVEDO POR SU VALIOSA Y DESINTERESADA COLABORACION EN EL TRABAJO DE CAMPO.
- A TODAS AQUELLAS PERSONAS, QUE DE UNA U OTRA FORMA CONTRIBUYERON A LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.

DEDICATORIA:

A NUESTROS PADRES CON AMOR Y AGRADECIMIENTO

A NUESTROS FAMILIARES CON CARÍO.

BR. ANA MIRIAM CARTAGENA ORTIZ

BR. ANA MIRIAM ORTIZ PERAZA

BR. ANA JULIA DIAZ LOPEZ

INTEGRARON EL JURADO CALIFICADOR:

DRA. CONCEPCION DE BENDIX

DR. CARLOS FLORES MENENDEZ

DR. CAYETANO ANTONIO MIRON

CONTENIDO

	PAGINA
I. ANTECEDENTES	1 - 2
II. REVISION DE LITERATURA	3 - 8
III. OBJETIVOS	9
IV. MATERIALES Y METODOS	10 - 13
V. RESULTADOS Y DISCUSION	14 - 16
VI. RESUMEN	17
VII. APENDICE	22 - 34
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRAFIAS	35 - 37

INDICE DE TABLAS

PAGINA

I	<u>TABLA No. 1</u>	18
	RESULTADOS DE LA REACTIVIDAD A LA BRUCELOSIS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS ROSA DE BENGALA, AGLUTINACION LENTA EN TUBO (SAT) Y FIJACION DE COMPLEMENTO EN HUMANOS EN CONTACTO CON BOVINOS, HUMANOS FEBRILES DE ETIOLOGIA INDETERMINADA Y BOVINOS EN DOS DEPARTAMENTOS, DE LA REPUBLICA DE EL SALVADOR.	
II	<u>TABLA No. 2</u>	19
	BOVINOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS ESTUDIADOS SEROLOGICAMENTE PARA INVESTIGAR BRUCELOSIS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO, EN BOVINOS EN EL DEPARTAMENTO DE LA PAZ, REPUBLICA DE EL SALVADOR.	
III	<u>TABLA No. 3</u>	20
	RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL ANILLO "RING TEST" EN MUESTRAS DE LECHE DE BOVINOS DE DIFERENTE PROCEDENCIA, OBTENIDOS EN EL ESTUDIO "EVIDENCIA SEROLOGICA Y BACTERIOLOGICA DE INFECCION BRUCELOSICA EN HUMANOS Y BOVINOS, EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE TOMADAS AL AZAR, EN DOS DEPARTAMENTOS DE LA REPUBLICA DE EL SALVADOR.	

INDICE DE GRAFICAS

PAGINA

I	<u>FIGURA 1</u>	.21
	PATRON DE LECTURA DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLE- MENTO.	

I. ANTECEDENTES

En el Salvador como en Centro América, la brucelosis bovina es una zoonosis reconocida. Se han hecho estudios de prevalencia en el área centroamericana, así tenemos que en Guatemala, la prevalencia difiere según las regiones desde el 1 hasta el 20%, para 1978 la prevalencia global se calculó del 6.1%; para Honduras de 25 a 48%, Nicaragua 2%. En 1975 la prevalencia global en Costa Rica fue de 6.45%, Panamá de 2 a 4.7% (35). En El Salvador, en 1977 Ruano, Matamoros hizo el estudio en todo el país y encontró una prevalencia de 1.36% al 2.10% (31); dos años después (1979) Reyes y Rice reportan una prevalencia nacional de 2.5% (26). Soriano, Zelaya, Morataya encontraron en la zona oriental una prevalencia de 2.6% habiendo muestreado 23.083 bovinos (34).

Entre los estudios de brucelosis en humanos hechos en El Salvador está el de Reyes Knoke en 1978, de 632 sueros humanos de grupos ocupacionales reportó un 0.15% (28). En 1970 Rodríguez en el Departamento de Santa Ana realizó un estudio en 466 humanos y obtuvo el 0.64% de reactivos (29).

Datos sobre el aislamiento de la bacteria son pocos, así tenemos que en 1977 en Nicaragua se aisló por primera vez Brucella abortus biotipo I y IV. En Guatemala hay reportes de aislamiento de Brucella en humanos.

Teniendo como referencia la información anterior y con el objeto de colaborar más en este campo, se consideró oportuno realizar un estudio que comprendiera el uso de las diferentes pruebas serológicas con el fin de conocer sus ventajas, así como otros aspectos, Ejemplo: el bacteriológico en bovinos y leches, así mismo como se conoce muy poco sobre serología y bacteriología en humanos se incluyeron muestras de sangre de personas reportadas como procesos febriles de origen indeterminado, con el mismo objetivo se decidió incluir muestras de sangre de

personas relacionadas con los bovinos (corraleros, ordeñadores), y de esta forma tener información de todos los factores involucrados en la cadena epidemiológica de la enfermedad.

II. REVISION DE LA LITERATURA

1. HISTORIA

Las primeras investigaciones efectuadas en forma científica sobre brucelosis, denominada también como Melitococia, Fiebre Ondulante, Fiebre de Malta, Fiebre del Mediterráneo (en el hombre), aborto contagioso, aborto infeccioso, aborto epizootico (animales), enfermedad de Bang (bovinos), fueron las hechas en 1886 al aislarse un Micrococcus de un paciente humano, por el Británico David Bruce, quien atribuyó las enfermedades de los soldados de la isla de Malta a la leche de cabra infectada con determinadas bacterias, Brucella melitensis (1).

En 1897, Bernard Bang y Strebelt descubrieron el agente causal del aborto contagioso en el ganado bovino, afección llamada "Enfermedad de Bang" y lo llamaron Bacillus abortus (2,3,4,5,7,9).

En el año de 1914 Jacob Traum aisló otro microorganismo de fetos expulsados prematuramente de las marranas y le llamó Brucella suis (2,3,4,5).

En el año de 1918 Alice Evans, demostró el notable parecido de estas bacterias, en cuanto a morfología, cultivos y propiedades serológicas por lo que las consideró íntimamente relacionadas y les dió el nombre genérico de Brucella, estableciendo tres especies (2,3,4,5,7,12,13,14).

En 1953, Buddle y Boyes en Australia y Nueva Zelandia identificaron Brucella ovis como causa de epidemia en las ovejas (8).

En 1957, Stonner y Lechman descubrieron una bacteria de características similares a las brucelas aisladas de un roedor (Neotoma lepida), al cual llamaron Brucella neotomae (8).

En 1966 Carminchael, aisló un cocobacilo de un feto abortado de una pe-

rra la cual presentó similitudes al género *Brucella* y fue denominada *Brucella canis* (8).

2. DISTRIBUCION

Esta es una enfermedad de distribución cosmopolita.

La distribución de las diferentes especies de *Brucella* y sus biotipos varía con las áreas geográficas. *Brucella abortus* es la que está más ampliamente difundida; *Brucella suis* y *Brucella melitensis* están distribuidas irregularmente; *Brucella neotomae* es una infección con focos naturales en ciertos países del mundo (1).

Esta enfermedad se ha ido difundiendo en forma excéntrica a partir de la isla de Malta, primero sobre los países que rodean el Mediterraneo y mas tarde cruzando los mares ha llegado a ocupar extensas zonas, siendo transmitida por bovinos, suinos, caprinos, ovinos, equinos y caninos; pero no hay huésped definido, sino que puede afectar a cualquier mamífero e incluso a las aves en pocos casos (1).

3. ETIOLOGIA

El agente etiológico de la brucelosis del ganado bovino es *Brucella abortus*, además es patógena para el hombre. Esta especie comprende nueve biotipos, distinguiéndose unos de otros por sus reacciones bioquímicas y serológicas (Cepa de referencia Br. abortus 544) (2,16).

Brucella melitensis: es el agente etiológico de la brucelosis ovina y caprina; también es patógena para el ganado bovino y para el hombre. Esta especie comprende tres biotipos que se diferencian entre si por la aglutinación frente a sus sueros monoespecíficos (Cepa de referencia Br. melitensis 16 M) (3,4).

Brucella suis: es el agente etiológico de la brucelosis de los cerdos

y además es altamente patógena para el hombre. Comprende cuatro biotipos (Cepa de referencia Br. suis 1330) (3,4).

Brucella ovis: produce la epididimitis del carnero, afectando principalmente el macho causando infecciones pasajeras en la hembra. No se ha comprobado que sea patógena para el hombre (3,16).

Brucella canis: es el agente etiológico de la brucelosis en perros, afectando igual a ambos sexos. A excepción de pocos casos de infección en el hombre, no se han reportado hasta la fecha infecciones de otras especies (3,16).

Brucella neotomae: se aisló primeramente de ratas silvestres. Se desconoce su importancia como patógena para animales domésticos y para el hombre (3,16).

4. PATOGENIA

La patogenicidad en los animales comienza con la invasión inicial, a continuación son atacados los nódulos regionales correspondientes y luego otros órganos linfoides como el bazo y nódulos mamarios e ilíacos y por último el útero gestante, ubre, testículos y glándulas sexuales accesorias, otros nódulos, bolsas y cápsulas articulares (33).

5. MANIFESTACIONES CLINICAS

El hombre puede infectarse con tres especies de Brucellas, pero las infecciones por Br. melitensis y Br. suis suelen ser más graves que las producidas por Br. abortus. El período de incubación de la fiebre ondulante en el hombre varía mucho y es relativamente largo; puede ir de una semana a cuatro meses (7).

La mortalidad es baja, de 2 a 3%. Pueden presentarse manifestaciones clínicas variables, y se conocen cinco tipos: 1) tipo intermitente con

reumatismo articular migratorio, debilidad, sudores nocturnos y temperaturas casi normal en la mañana, pero se sube hasta 38.5 ó 40°C en la tarde; en este cuadro el paciente permanece en cama durante la segunda parte del día; 2) tipo ambulatorio con síntomas muy semejantes, pero aún más leves; tipo ondulante (infecciones generalizadas por *Br. melitensis*) caracterizado por aumentos progresivos de la temperatura de un día a otro hasta un máximo, y al cabo de algún tiempo descenso gradual de la misma; pueden repetirse varias veces estos fenómenos; 3) tipo maligno (casi siempre infecciones por *Br. melitensis*) en el cual la temperatura es alta y sostenida, con hiperpirexia muy intensa antes de la muerte; y 4) un tipo crónico atípico que puede tomar la forma de rigidez muscular, trastornos gástricos y síntomas neurológicos diversos. En general la fiebre ondulante es una enfermedad relativamente larga, de uno a cuatro meses, y no son raras las recaídas durante la convalecencia (7).

En los bovinos los principales síntomas son: aborto después del quinto mes de gestación, metritis y retenciones placentarias. Pueden haber septicemias agudas y muerte en caso de haber infecciones mixtas y también septicemias con esterilidad. En el toro hay a veces orquitis y epididimitis, edema del escroto y esterilidad (8,33).

6. TRATAMIENTO

La mayor parte de las cepas de brucela son sensibles a la estreptomicona y a las tetraciclinas. En las infecciones muy graves se ha recomendado el tratamiento combinado con ambos medicamentos. Aunque su administración puede ir seguida a los pocos días de mejoría de los síntomas, frecuentemente aparecen recaídas a menos que el tratamiento se prolongue como mínimo tres a cuatro semanas. La dificultad de erradicar los organismos depende sin duda de su localización intracelular, que los protege por lo menos temporalmente de su acción de los medicamentos y de los anticuerpos (7).

7. METODOS DE DIAGNOSTICO

El diagnóstico de brucelosis puede ser dado por el laboratorio por medio de pruebas serológicas y bacteriológicas. Las pruebas serológicas se basan en la detención de anticuerpos presentes en el suero, entre estas pruebas tenemos: Rosa de Bengala, Prueba lenta en tubo (SAT) y Fijación de complemento. En muestras de leche se emplea la prueba del anillo "Ring Test" (8).

En las pruebas bacteriológicas tenemos el aislamiento del microorganismo como método definitivo para el diagnóstico; además con el empleo de medios selectivos que contengan antibióticos, aumenta la posibilidad de aislar la *Brucella*. Entre las muestras de humanos que se pueden utilizar para el cultivo están: sangre, médula externa, ganglios linfáticos, etc. Entre las muestras de bovinos están: la placenta secreciones vaginales, restos de aborto y leche (7).

8. VACUNACION

Para el control de la brucelosis bovina en áreas enzoóticas con alta prevalencia se recomienda la vacunación. La vacuna de elección es la *Brucella abortus* Cepa 19, consagrada para uso universal, la protección que confiere durante toda la vida útil al animal y su bajo costo. Para obviar su interferencia con el diagnóstico se recomienda limitar (por legislación) la vacunación a animales de poca edad (terneras de 3 a 8 meses), que pierden rápidamente los anticuerpos originados por la vacuna. Se estima que un 65% a 80% de los animales quedan protegidos contra la infección.

El efecto antiabortivo de la vacuna es muy pronunciado contra la infección, reduciéndose de tal manera una de las fuentes principales de la infección. Los machos no deben ser vacunados, ni tampoco las hembras de más de 8 meses de edad. Tampoco se recomienda la revacunación. El objetivo principal de un programa de vacunación sistemática y obligatoria de terneros en una zona o país es reducir la tasa de infección y obtener rebaños resistentes a la brucelosis, para luego emprender la erradicación. (1).

III. OBJETIVOS

- 1o. Investigar serológicamente la incidencia de brucelosis en humanos, bovinos y leche de bovinos.
- 2o. Comparar la sensibilidad y especialidad de las pruebas serológicas usadas en el presente estudio.
- 3o. Intentar el aislamiento e identificación de bacterias del género *Brucella*.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. METODO DE CAMPO

Se tomaron muestras de sangre por punción de la vena mediana cefálica de personas aparentemente sanas con relación ocupacional (corraleros, ordeñadores), en haciendas del departamento de La Paz de El Salvador, Centro América. Así como a pacientes del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS) referidos como procesos febriles de etiología indeterminada o con sospecha de brucelosis sin llegar a un diagnóstico definitivo.

Así mismo se tomaron muestras de sangre de bovinos por punción de la vena yugular seleccionados al azar; las muestras de sangre tanto de bovinos como de humanos remitidas al laboratorio en tubos de ensayo, previamente identificados. Luego fueron remitidas al laboratorio de la Dirección General de Ganadería (MAG) Cantón El Matazano, Soyapango, para sus respectivos análisis. Para información complementaria fueron anotados en fichas elaboradas para tal fin, la que incluía: fecha de recolección de la muestra, identificación de las muestras, identificación del animal, si están vacunados, edad, sexo, raza, etc.

Para obtener mayor información sobre la brucelosis, en un producto derivado de los bovinos como es la leche, se colectó en frascos estériles para ser analizadas en el laboratorio de la Dirección General de Ganadería (MAG), ya que como se sabe es en la leche donde existe más probabilidades de aislamiento de la Brucella.

El número de muestras fue determinado arbitrariamente de la siguiente forma:

<u>M U E S T R A</u>	<u>NUMERO</u>
. Personas aparentemente sanas, con relación ocupacional	62
. Personas febriles de etiología indeterminada	61
. Bovinos	71
. Leche de bovinos	52

2. METODO DE LABORATORIO

a) SEROLOGIA

Inicialmente se procedió a efectuar la Prueba Rosa de Bengala como una prueba tamiz. Las muestras que resultaron positivas fueron analizadas con la Prueba lenta en tubo y las que resultaron positivas a ésta, se les verificó la Prueba de Fijación de Complemento. La leche fue analizada con la Prueba de "Screening" Ring Test.

Descripción de las Técnicas:

- Prueba Rosa de Bengala:

En el laboratorio se obtuvo el suero por centrifugación de las muestras durante 5 minutos a 3.000 rpm. Luego los sueros fueron colocados en recipientes previamente identificados. En los espacios que trae la tarjeta para la prueba Rosa de Bengala, se depositó 0.03 mls. de suero, luego se añadió 0.03 mls. de antígeno de Brucella (B-99) coloreado con Rosa de Bengala. A continuación se mezcló y después se agitó por 4 minutos haciendo la lectura que se basa en la detención de aglutinación resultante de la mezcla del antígeno con el anticuerpo presente en el suero. Cualquier grado de reacción, es confirmado con la prueba lenta en tubo.

- Prueba Lenta en Tubo:
 - a) Con una jeringa automática se colocó 0.5 mls. de solución salina fenolada en cada uno de los 5 tubos plásticos correspondientes a las 5 diluciones trabajadas (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160).
 - b) Con la jeringa se tomó 0.3 mls. de solución salina fenolada al 0.5% y luego 0.2 mls. de suero problema, llegando así a la marca de 0.5 mls.
 - c) Se depositó esta cantidad en el primer tubo, se mezcló y después se pasó 0.5 mls. al siguiente tubo y así sucesivamente hasta descartar 0.5 mls en el quinto tubo.
 - d) Con una pipeta se agregó 0.5 mls. de antígeno a cada tubo y se mezcló obteniendo así, las respectivas diluciones.
 - e) El resultado se interpretó 20 horas después de una incubación a 37°C.

Los controles para la lectura de la prueba se hicieron diariamente y se incubaron junto a las pruebas. Para evaluar el grado de reacción, se compararon las pruebas con los controles.

Como confirmación de los resultados a la prueba lenta en tubo, se usó la prueba de Fijación de Complemento.

- Prueba de Fijación de Complemento:
 - a) Al suero problema se le hizo una dilución 1:2 con buffer veronal, se colocaron en baño de María a 56°C por 60 minutos para inactivar el Complemento.
 - b) Al suero problema se le hizo diluciones seriadas de 1:10 hasta 1:2560 directamente en las excavaciones de la placa.
 - c) Se agregó 0.2 mls. de antígeno a cada excavación a excepción del control anticomplementario.
 - d) Se añadió 0.2 mls. de complemento a todas las excavaciones luego se incubó a 37°C por 30 minutos. Inmediatamente después agregamos 0.4 mls. del sistema hemolítico, incubamos

nuevamente a 37°C por 30 minutos

e) Interpretación de los resultados.

● Prueba del Anillo "Ring Test"

a) A un ml. de leche se le añadió 0.03 mls. de antígeno coloreado con hematoxilina, se mezcló por inversión, se incubó a 37°C por una hora.

b) Los resultados se interpretan por apreciación con cruces.

b) BACTERIOLOGIA

Las muestras de sangre que resultaron positivas en la prueba de fijación de complemento, que es una prueba sensible y confiable en el diagnóstico de Brucelosis y las muestras de leche que resultaron con prueba de anillo positiva se les hizo cultivo en los siguientes medios: Para las muestras de sangre fueron usados Caldo de Tripticasa Soya e Infusión Cerebro Corazón, estos se incubaron en Atmósfera de CO₂; se observaron cada 2 días haciendo frotis y coloración de Gram para ver si estaba presente el cocobacilo Gram negativo. Las muestras de leche se sembraron en GDA (Glicina dextrosa agar).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Para demostrar la evidencia serológica y bacteriológica de brucelosis se examinaron 62 sueros de personas en contacto con bovinos, 61 sueros de personas febriles de etiología indeterminada, 71 sueros de bovinos adultos y 52 muestras de leche con diferente procedencia del país (Ver Tabla No. 1).

Los resultados de las muestras de humanos con la Prueba Rosa de Bengala fueron: los 62 sueros de personas en contacto con bovinos, resultaron todos negativos: de los 61 sueros de personas febriles de etiología indeterminada, uno resultó positivo (1.6%) y 60 negativos (98.4%).

En la Prueba Lenta en tubo (SAT) el suero positivo (de persona febril) resultó sospechoso y en la Fijación de Complemento este suero resultó negativo. Por lo que el resultado final de las muestras de humanos fue negativo.

Los 71 sueros de bovinos en la Prueba Rosa de Bengala resultaron: 6 positivos (8.4%) y 65 negativos (91.4%).

Unicamente los 6 sueros positivos se sometieron a Prueba Lenta en Tubo (SAT) resultaron 5 positivos (7%) y un sospechoso (1.4%).

A los 5 sueros positivos y el suero sospechoso en la prueba lenta en tubo se les verificó la Prueba de Fijación de Complemento resultando 5 positivos (7%) y un negativo (1.4%); de los 5 sueros positivos uno con 97 U.I. y cuatro con 222 U.I. (Ver Figura No. 1).

De los 71 bovinos muestreados; 29 estaban vacunados, de los cuales solo 2 animales resultaron positivos (6.8%), 1 sospechoso (3.4%) y 26 negativos (89.8%). De los 42 animales no vacunados resultaron 3 positivos (7.1%) y 39 negativos (92.9%) (Ver Tabla No. 2). Se enfatiza que

para una correcta interpretación es necesario conocer si los bovinos son vacunados o no, para así usar el Patrón de Lectura e interpretar si un animal está siendo positivo por estar vacunado o positivo por estar enfermo (Ver Figura No. 1).

Las 52 muestras de leche de diferente procedencia se sometieron a Prueba de Anillo "Ring Test", resultándonos 5 positivas (9.6%) y 47 negativas (90.4%) (Ver Tabla No. 3).

A las muestras de sangre de bovinos y a las muestras de leche que resultaron positivas en el estudio serológico se les hizo un estudio bacteriológico, usando medios selectivos, en los cuales obtuvimos crecimiento de bacterias semejantes a cocobacilos Gram negativos en los cultivos de las muestras de leche, no así en los cultivos procedentes de sangre, que resultaron negativos. El crecimiento de bacterias en los cultivos de leche no nos fue posible aislarlo, por ser la Brucella una bacteria fastidiosa que requiere de condiciones especiales por lo que el resultado final de nuestro estudio bacteriológico fue negativo.

En nuestro estudio serológico en humanos obtuvimos un resultado negativo, a diferencia de estudios de Prevalencia anteriores realizados por Rodríguez en 1970 (26) y Reyes Knoke en 1978 (25) ellos tomaron un mayor número de muestras y obtuvieron 0.64% y 0.15% respectivamente.

En cuanto al resultado serológico de bovinos obtuvimos una evidencia de 0.35% en el área estudiada del Departamento de La Paz; Reyes Knoke en el estudio "Prevalencia Serológica de Brucelosis" reporta para este departamento el 2.7% (24). Considerando que a pesar de ser un porcentaje menor, nuestro estudio refleja la existencia de la enfermedad. Debemos de hacer notar que, cuando mencionamos la palabra evidencia en nuestro estudio nos referimos a que sí encontramos la enfermedad; pero no podemos mencionar prevalencia por no haber estudiado un número significativo de muestras.

Con respecto a las ventajas que pueden ofrecernos estas pruebas serológicas tenemos:

- a) La prueba Rosa de Bengala permitió procesar en corto tiempo todas las muestras empleadas en nuestro estudio, en la cual se usó poco material y reactivo, la interpretación es fácil y da resultados positivos y negativos; reduciendo así la cantidad de muestras para procesarlas en las otras pruebas.
- b) La prueba Lenta en tubo (SAT) que emplea mayor cantidad de material y reactivo, el procesamiento es lento, pero sin embargo, nos da resultados más confiables que la prueba Rosa de Bengala, dando lecturas de negativo, sospechoso y positivo. Esta prueba tiene limitantes como son la de no poder diferenciar anticuerpos vacunales (Cepa 19) de aquellos anticuerpos producidos por una infección natural; y también da reacciones cruzadas con anticuerpos de otros micro-organismos (8).
- c) La prueba de Fijación de Complemento, en ésta el procedimiento es más delicado, es la que nos confirmó los resultados sospechosos y positivos.
Estudios anteriores de Fijación de Complemento han demostrado que esta prueba distingue anticuerpos vacunales de anticuerpos naturales, que detecta anticuerpos de infección recientes o estados de cronicidad (8), por lo que se considera un método de análisis específico, exacto y sensible. La combinación de las dos últimas pruebas mencionadas nos proporcionaron en este estudio, una identificación eficiente de los animales infectados.
- d) La prueba del Anillo "Ring Test", es una prueba sencilla, de fácil interpretación que permite localizar con pocos gastos los rebaños de vacas lecheras infectadas y evita proceder a largas pruebas serológicas en rebaños sanos, permitiendo realizar sondeos frecuentes para descubrir focos de infección.

VI. RESUMEN

El presente estudio se efectuó para determinar la evidencia serológica y bacteriológica de infección brucelósica en humanos, bovinos y muestras de leche en un área del departamento de la Paz, República de El Salvador, C.A.

Se muestrearon 62 personas en contacto con bovinos, 61 personas con proceso febril de etiología indeterminada, 71 bovinos de diferente sexo y edad.

Todos los sueros de las muestras extraídas, fueron sometidas a la Prueba Rosa de Bengala, los que resultaron positivos en ésta fueron analizados con la prueba Lenta en Tubo (SAT) y Fijación de Complemento; y la prueba del anillo para las muestras de leche de bovinos.

En base a los resultados obtuvimos una prevalencia de 0% para los sueros de humanos, 0.35% para los sueros de bovinos y 9.6% para las muestras de leche de bovinos. En cuanto al estudio bacteriológico nuestros resultados fueron negativos.

TABLA No. 1

RESULTADOS DE LA REACTIVIDAD SEROLOGICA A LA BRUCELOSIS DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS ROSA DE BENGALA, AGLUTINACION LENTA EN TUBO (SAT) Y FIJACION DE COMPLEMENTO EN HUMANOS EN CONTACTO CON BOVINOS, HUMANOS FEBRILES DE ETIOLOGIA INDETERMINADA Y BOVINOS EN EL DEPARTAMENTO DE LA PAZ, REPUBLICA DE EL SALVADOR

MUESTREADOS	TOTAL	PRUEBAS SEROLOGICAS								
		ROSA DE BENGALA			LENTA EN TUBO (SAT)			FIJACION DE COMPLEMENTO		
		Pos*	Sos	Neg	Pos	Sos	Neg	Pos	Sos	Neg
- Humanos en contacto con bovinos	62	0	0	62(100)**						
- Humanos febriles	61	1(1.6)	-	60(98.4)	1(1.6)	-	-	-	-	1(1.6)
- Bovinos	71	6(8.4)	-	65(91.4)	5(7.0)	1(1.4)	-	-	5(7.0)	1(1.4)

* : Pos = positivo; Sos = sospechoso, Neg = negativo.

** : Los números encerrados entre paréntesis son porcentajes.

TABLA No. 2

BOVINOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS ESTUDIADOS SEROLOGICAMENTE PARA INVESTIGAR BRUCELOSIS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO, EN BOVINOS EN DEPARTAMENTO DE LA PAZ, REPUBLICA DE EL SALVADOR

MUESTREADOS	T O T A L	POSITIVOS	SOSPECHOSOS	NEGATIVOS
- Bovinos vacunados	29	2 (6.8)*	1 (3.4)	26 (89.8)
- Bovinos no vacunados	42	3 (7.1)	-	39 (92.9)

* : Los números entre paréntesis son porcentajes.

TABLA No. 3

RESULTADOS DE LA PRUEBA DEL ANILLO "RING TEST" EN MUESTRAS DE LECHE DE BOVINOS DE DIFERENTE PROCEDENCIA OBTENIDOS EN EL ESTUDIO "EVIDENCIA SEROLOGICA Y BACTERIOLOGICA DE INFECCION BRUCELOSICA EN HUMANOS Y BOVINOS, EN MUESTRAS DE SANGRE Y LECHE TOMADAS AL AZAR, EN DOS DEPARTAMENTOS DE LA REPUBLICA DE EL SALVADOR".

MUESTRA	T O T A L	POSITIVOS	NEGATIVOS
- Leche	52	5 (9.6)*	47 (90.3)

* : Los números entre paréntesis son porcentajes.

FIGURA No. 1

PATRON DE LECTURA DE LA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

<u>DILUCION DEL SUERO</u>	<u>LECTURA</u>	<u>ANIMALES VACUNADOS</u>	<u>RESULTADOS</u>	
			<u>NO VACUNADOS Y TOROS</u>	<u>U.I.*</u>
1/2	**	Negativo	Sospechoso	17
	***	Negativo	Sospechoso	19
	****	Negativo	Sospechoso	22
1/4	**	Negativo	Sospechoso	33
	***	Sospechoso	Positivo	39
	****	Sospechoso	Positivo	45
1/10	**	Sospechoso	Positivo	83
	***	Sospechoso	Positivo	97
	****	Positivo	Positivo	117
1/20	**	Positivo	Positivo	167
	***	Positivo	Positivo	194
	****	Positivo	Positivo	222
1/40	**	Positivo	Positivo	333
	***	Positivo	Positivo	387
	****	Positivo	Positivo	444

* : U.I. Unidades Internacionales

Una Unidad Internacional de Anticuerpo se define como la actividad contenido en 0.09552 mgrs. del Patrón Internacional de Suero Anti Brucella abortus (PISAb).

VII. APENDICE

Para la elaboración de antígenos de *Brucella* conviene utilizar cepas poco virulentas como la Cepa 99 de *Brucella abortus*. Esta cepa tiene la ventaja de no necesitar anhídrido carbónico para desarrollarse.

Para preparar la suspensión madre, se recomienda sembrar la cepa 99 de *Brucella abortus* en medios de cultivo, tales como: Glicerina Dextrosa Agar (GDA), Suero Dextrosa Agar (SDA) y Agar Papa.

1. ELABORACION DE SUSPENSION MADRE

Se parte de una ampolla liofilizada de cepa 99 de *Brucella abortus*, la cual se suspende en caldo nutritivo para sembrar tubos inclinados con medio Glicerina Dextrosa Agar (GDA) por 72 horas a 37°C, se levantan las brucellas con solución salina al 0.85% y se pasan al medio Glicerina Dextrosa Agar en frascos de Roux por 72 a 96 horas a 37°C, colocándose las botellas de Roux con el medio invertido. Antes de sembrar los medios se tira el agua de condensación, para evitar en lo posible disociación del cultivo. La recolección de la suspensión bacteriana se levanta con solución salina al 0.85%. De los frascos que contienen suspensión madre se siembran placas con medio Glicerina Dextrosa Agar (GDA) que se incuban a 37°C y se examinan diariamente por 48 a 72 horas para descartar si hay contaminación ó colonias disociadas; se matan las Brucellas por calor 1 hora a 60°C, luego se guardan en refrigeración por 8 días, concentrándose por centrifugación refrigerada hasta obtener la masa celular p/v. Todas las manipulaciones se hacen con precaución asépticas a fin de evitar la contaminación del antígeno y del técnico que lo prepara.

La muestra obtenida (suspensión madre) se examina desde el punto de vista de la pureza y esterilidad. La prueba de pureza se hace preparando un frotis, el que se colorea por el método de Gram y se observa al mi-

croscopio con el fin de descubrir gérmenes contaminantes.

Para la prueba de esterilidad se siembra 0.1 ml de antígeno en tres tubos inclinados de Agar Papa. El producto debe estar libre de contaminación y no mostrar desarrollo de *Brucella*. El producto terminado se envasa en condiciones asépticas en frascos adecuados estériles. A cada frasco se le pone una etiqueta con el nombre del producto, fecha de elaboración y de expiración.

Al producto elaborado se le da un año de validez, a partir de la fecha de elaboración. El antígeno se mantiene a 4°C.

Con la suspensión madre así obtenida se preparan todos los antígenos de *Brucella abortus*: Antígeno para prueba de aglutinación rápida en lámina (ROSA DE BENGALA), Antígeno para prueba de aglutinación de suero lenta en tubo (SAT), Antígeno para prueba de fijación de complemento y Antígeno para prueba de anillo en leche (Ring Test) ó Antígeno de Hematoxilina.

a) ELABORACION DE ANTIGENO PARA PRUEBA DE AGLUTINACION RAPIDA EN LA LAMINA (ROSA DE BENGALA)

El antígeno para esta prueba se prepara a partir de la misma suspensión madre de la cepa 99 de *Brucella abortus*, que contiene una concentración de 8 a 14% de células bacterianas por volumen, se colorean con el colorante Rosa de Bengala y se suspenden en solución tampon de pH 3.65.

Este antígeno es estable por largos períodos a 4°C, pero se deteriora cuando se remueve constantemente del refrigerador (6).

La prueba Rosa de Bengala en lámina da lectura de positivo a negativo y no se aplica a titulación, por eso se usa como prueba preliminar solamente, o sea para reducir la cantidad de trabajo en las otras pruebas que son más complicadas.

- Preparación del Diluyente para Antígeno Rosa de Bengala (Buffer Brucella abortus)

Pesar 30 grs. de hidróxido de sodio, agregar 500 ml de solución salina al 0.85%, fenolada al 0.5% y mezclar. Agregar 135 ml de ácido láctico concentrado y mezclar, luego agregar suficiente cantidad de solución salina al 0.85%, fenolada al 0.5% hasta un total de 1500 ml. Se debe obtener un p^H 3.65 ± 0.05 , el p^H es crucial. De este diluyente se tomará 7.5 ml para 1 gr. de masa celular coloadas.

- Colorante Rosa de Bengala

Pesar 1 gr. de Rosa de Bengala, agregar 100 ml de agua destilada estéril y mezclar. Suspensión de colorante Rosa de Bengala al 1%.

- Tinción

(1º) Se toma 1 gr. de células sin colorear y 22.5 ml de solución salina al 0.85%, fenolada al 0.5% (quedando la suspensión al 4.44%).

(2º) De esta suspensión 4.44%, se toman de 30 a 35 ml y se agrega 1 ml de colorante al 1%.

(3º) Colorear (agitando con agitador magnético) por 2 horas.

(4º) Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C, tirar sobrenadante. (Residuo = masa celular coloadada).

(5º) Resuspender en Buffer Brucella abortus (BBA) así: 1 gr. de células coloadas más 7.5 ml de diluyente de Buffer Brucella abortus (BBA), dando 13.33% de concentración.

El p^H debe ser 3.65 ± 0.05 . La concentración celular va del 8 al 14%. Verificar prueba de pureza inoculando antígeno en placas con Glicerina Dextrosa Agar (GDA) o Suero Dextrosa Agar (SDA), incubando las placas de 3 a 5 días para descartar contaminación. Se con-

serva el antígeno a 4°C hasta que se utilice.

b) ELABORACION DE ANTIGENO PARA PRUEBA DE AGLUTINACION DE SUERO LENTA EN TUBO (SAT) Y PARA PRUEBA DE FIJACION DE COMPLEMENTO

El antígeno para la prueba de aglutinación de suero lenta en tubo (SAT) y fijación de complemento se prepara a partir de una suspensión al 4.5% de la Cepa 99 de Brucella abortus en solución salina al 0.85%, fenolada al 0.5%, a manera que quede la suspensión al 0.045% para aglutinación de suero lenta en tubo (SAT) y fijación de complemento.

Este antígeno concentrado se estandariza de acuerdo al Standard International Anti Brucella abortus, en donde el 50% (++) de aglutinación ocurre con dos Unidades Internacionales de anticuerpos por ml. (6).

Una UNIDAD INTERNACIONAL se define como la actividad contenida en 0.09552 mgs. del Patrón Internacional de suero Anti-Brucella abortus (PISAb).

Dicho patrón se prepara con el suero de una vaca inoculada con el biotipo 1 de Brucella abortus Cepa 544 (Cepa de Referencia). Este patrón de suero contiene 1000 UI por ml y son anticuerpos exclusivamente inmunoglobulinas G (16).

El antígeno para estas dos pruebas debe tener una concentración de 4.5% de células bacterianas por volumen, que luego se diluye adecuadamente para el uso. Al producto elaborado se le da un año de validez a partir de la fecha de elaboración del antígeno y se mantiene a 4°C.

● Antígeno para Prueba de Fijación de Complemento

NOTA: Se trabaja con la bacteria viva, porque el fenol hemoliza a los glóbulos rojos.

Se tiene la masa celular, se agrega solución salina al 0.85% con merthiolate, se centrifuga a 5000 rpm para que el agar suba y luego centrifugar a 6000 rpm por 40 minutos. Se lava dos veces más con solución salina al 0.85%, las células se suspenden en 100 ml de solución salina al 0.85%, y se ponen en baño María por 1 hora.

Se mezcla por agitación durante 15 minutos para tener el Stock de antígeno. Se estandariza con el suero control, luego tienen que dar 50% de fijación con el suero control.

Si el volumen celular no llega a ser igual a 4.5%, se ajusta la concentración añadiendo una cantidad proporcional de solución salina fenicada o de brucellas procedentes de la suspensión madre.

c) ELABORACION DE ANTIGENO PARA PRUEBA DE ANILLO EN LECHE O DE HEMATOXILINA

La composición de este antígeno consiste en células de Brucella abortus Cepa 99, cultivadas en medio Glicerina Dextrosa Agar (GDA) y teñidas con una solución colorante a base de hematoxilina. El antígeno tiene una concentración celular entre 3.5 y 5.8%.

● Antígeno de Hematoxilina

- (1º) Disolver 9 gr. de sulfato amonicoaluminico ($(\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O})$) en 100 ml de agua destilada, calentando a 90°C. Agregar 30 ml. de glicerina.
- (2º) Disolver 1.9 gr. de hematoxilina en 10 ml de alcohol etílico al 95%, calentando a 50-60°C. Llevar el volumen hasta 100 ml. con agua destilada.
- (3º) Disolver 0.2 gr. de yodato de sodio en 2 ml de agua destilada, calentando a 90°C.
- (4º) Mezclar los reactivos preparados en los numerales 1 y 2 y añadir a la mezcla el reactivo preparado en el numeral 3,

mezclar cuidadosamente por agitación y dejar la solución en reposo por 30 minutos a temperatura ambiente para que se produzca la oxidación.

- (5°) Preparar una solución al 10% de sulfatoamonicoalumínico, di solviendo 94 gr. de sulfato en 500 ml de agua destilada, ca lentando a 90°C. Agregar agua destilada a temperatura ambiente hasta un volumen final de 940 ml.
- (6°) Diluir la solución colorante descrita en el numeral 4, en los 940 ml de solución de sulfatoamonicoalumínico.
- (7°) Dejar enfriar a temperatura ambiente, determinar el pH de la solución colorante y si es necesario ajustarlo a 3.1 agregando hidróxido de sodio al 10%. La solución colorante se conserva de 45 a 90 días a temperatura ambiente y en la oscuridad.
- (8°) Antes de usar agitar y filtrar solución colorante para eliminar precipitados y las sustancias insolubles.

Tinción del Antígeno de Hematoxilina

Agregar a la solución colorante, las brucellas muertas por calor a 60°C por una hora a razón de 45 grs. de pasta de células por 1000 ml. de solución coloreada. Dejar suspensión a temperatura ambiente durante 48 horas, agitando continuamente. Al cabo de ese tiempo las células quedarán uniformemente teñidas de color violeta azulado.

Preparar una solución para lavar células teñidas, agregando a 1600 ml, de agua destilada 64 grs. de cloruro sódico, 15 ml. de ácido láctico (85% de pureza) y 4.4 ml. de hidróxido sódico al 10%. Determinar el pH de la solución y si es necesario ajustarlo a 4.0 con ácido láctico o hidróxido sódico al 10%.

Centrifugar las células teñidas, desechar sobrenadante y suspender de nuevo en la solución de lavado hasta triplicar volumen.

Mezclar cuidadosamente suspensión y centrifugar. Eliminar sobrenadante y suspender por tercera vez las células en la misma cantidad de solución de lavado. Centrifugar y desechar sobrenadante. El diluyente final es una solución salina fenolada ajustada a pH 4.0 con solución de ácido cítrico 0.1 mol/l y solución de fosfato disódico 0.5 mol/l (una solución de 26 ml. de ácido cítrico 0.1 mol/l y 1 ml. de fosfato disódico 0.5 mol/l en 1000 ml de suero salino fenicado pH 4.0).

Suspender las brucellas teñidas en el diluyente descrito a razón de 1 gr. de células por 27 ml de diluyente y mezclar cuidadosamente. Dejar mezcla en el refrigerador durante 24 horas. Mezclar de nuevo, filtrar y determinar pH.

El pH final ha de estar entre 4.0 y 4.3.

Determinar la concentración celular del producto final agregando 0.25 ml de antígeno y 4.75 ml de agua destilada en c/u de 4 tubos de centrifuga (Fish - Hopskins modificados). La concentración total de brucellas se determina si no es de 3.5 y 5.8 ajustando la concentración, agregando brucellas teñidas o diluyente.

El antígeno para la prueba del anillo se conserva siempre en el refrigerador, pero sin congelar.

2. PREPARACION DE BUFFER VERONAL CONCENTRADO

FORMULA:	Cloruro de Sodio	42.5	gr.
	Acido barbitúrico	2.875	gr.
	Barbiturato de magnesio	1.785	gr.
	Sulfato de magnesio	1.018	gr.
	Cloruro de calcio	0.1147	gr.

Se lleva a un litro con agua destilada. Debe de tener un pH de 7.5 y

es estable por tiempo indefinido. Para usar diluir 1:5 para una semana de trabajo.

● Preparación de Veronal (Dilución 1:5)

Aditivo para que los glóbulos rojos sean estables Gelatin Bacto*
1 gr. de gelatina disolver en 200 ml. de agua destilada, se pone a hervir. Llevar hasta 800 ml. con agua destilada y luego agregar 200 ml. de veronal concentrado.

3. SOLUCION SALINA FENOLADA

Esta solución contiene 0.85% de cloruro de sodio y 0.5% de fenol en agua destilada o desmineralizada.

4. SOLUCION DE ALSEVERS PARA CONSERVAR GLOBULOS ROJOS DE CARNERO**

FORMULA:	Dextrosa	20.5	gr.
	Citrato de sodio	8.0	gr.
	Cloruro de sodio	4.2	gr.
	Acido Cítrico	0.55	gr.
	Agua destilada	1000	ml

PREPARACION:

La solución se esteriliza por filtración. También se puede esterilizar en autoclave a 15 lbs. de presión durante 15 minutos. Evitar que llegue a caramelizarse y en caso de que ello ocurra, se debe descartar la solución.

Conviene seleccionar 4 carneros sanos que suministren eritrocitos de

* "difco" Certified. Detroit Michigan, U.S.A.

** Preparado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Ganadería. Cantón El Matazano, Soyapango. El Salvador, Centro América.

fragilidad normal. Cada semana se sangra un carnero, de forma que el mismo carnero será sangrado a la quinta semana. La sangre se recogerá asépticamente en un recipiente que contenga un volumen de solución de alsevers similar al de la sangre que se va a tomar. Se mezcla bien y se conservan en refrigeración.

La sangre de cada carnero se empieza a utilizar una semana después de su recolección y en condiciones normales se le puede emplear durante un período de 2 a 6 semanas a temperatura de 4°C, siempre que no aparezca contaminada.

5. COMPLEMENTO*

Es suero fresco de cobayo, obtenido comercialmente de Burroughs Wellcome. Para usarlo primero se reconstituye y se diluye 1.10 con agua destilada.

6. SUERO HEMOLITICO

Se prepara en conejos y se preserva con glicerol al 33%, se obtiene comercialmente.

● Sistema Hemolítico

a) Suspensión de Eritrocitos

Consiste en glóbulos de oveja preservados en solución de alsevers** y guardados a 4°C durante 7 días antes de usarse. para la prueba se usan los glóbulos en suspensión al 3%. Antes de preparar esta suspensión, los glóbulos se lavan tres veces con solución salina al 0.85%. Para esto se centrifuga

* Wellcome Reagents Ltd. Wellcome Reseach Laboratories. Beckenhan England BR 3 3D5.

** Preparado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Ganadería. Cantón el Matazano. Soyapango, El Salvador, Centro América.

la suspensión de eritrocitos a 2500 rpm durante 5 minutos. Después se descarta el sobrenadante, se resuspende nuevamente el paquete de glóbulos rojos en solución salina y se repite el proceso. Se hace una dilución de globulos rojos 1:3 agregando 3.5 ml. del paquete de glóbulos rojos a 7 ml de diluyente buffer veronal. Luego se hemoliza 0.1 ml de esta suspensión con el reactivo de Sicca*, y se lee en el hemoglobinómetro de Sicca. Esta lectura representará el 50% de hemólisis.

Si no fuera así, la concentración de glóbulos rojos deberá ser ajustada de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{Lectura de Sicca}}{50} \times \text{Volumen presente} = \text{Volumen correcto para Lectura de 50\% de hemólisis.}$$

Finalmente, después de que los glóbulos rojos se estandarizan, se hace una dilución 1:11 agregando a 10 ml de esta suspensión de glóbulos 100 mls. de diluyente veronal. Ya sea la dilución de glóbulos rojos 1:3 antes de la estandarización ó 1:11 después, nos da una suspensión de eritrocitos que equivale al 3%.

7. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Sangre

Se añade 5 ó 10 ml. de sangre desfibrinada estéril al agar Tripti casa soya derretido que ha sido enfriado a unos 45°C (esto es comprobado usualmente en forma aproximada, colocando sobre la mejilla la botella, debe sentirse una sensación agradable de calor). Se mezcla agitando en forma circular en cajas de Petri estériles o

* Testa-Laboratory DK 2730 Kenmarck Copenhagen. Le Denmarck. Dina

también en recipientes de otro tipo y se dejan en reposo

FORMULA DE AGAR TRIPTICASA SOYA

grms/1 de agua destilada

Peptona triptícasas	15 grs.
Peptona phytona	5 grs.
Cloruro de sodio	5 grs.
Agar	15 grs.
ph final 7.3 [†]	

PREPARACION

Se suspenden 40 grs. del polvo en un litro de agua destilada, mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Después de que se haya disuelto distribuir y esterilizar se en autoclave a 118-121°C a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

● Caldo Triptícasas Soya

Fórmula en grs/1 de agua destilada

Peptona triptícasas	17 grs.
Peptona phytona	5 grs.
Cloruro de sodio	5 grs.
Fosfato dipotásico	2.5 grs.
Dextrosa	2.5 grs.
ph final 7.3 [†]	

PREPARACION:

Hacer una suspensión con 30 grs. del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar bien. Calentar ligeramente si fuere necesario para completar la solución. Distribuir y esterilizar en tubos en

autoclave a 118-121°C a 15 lbs de presión durante 15 minutos.

● Caldo Infusión Cerebro Corazón

Fórmula en grs/1 de agua destilada

Infusión de cerebro de ternera	200.0	gr.
Infusión de corazón de res	250.0	gr.
Peptona	10.0	gr.
Cloruro de sodio	5.0	gr.
Fosfato disódico	9.5	gr.
Dextrosa	2.0	gr.
ph final † 7.4		

PREPARACION:

Disolver 37 gr. del material deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir en los frascos y esterilizar en autoclave a 121°C a 15 lbs. de presión durante 15 ó 20 minutos.

● Glicerina Dextrosa Agar + Antibiótico

Agar	16	gr.
Triptosa	33	gr.
Cloruro de sodio	5	ml.
Glicerina	20	ml.
Agua destilada	1000	ml.

Esterilizar a 15 lbs. de presión por 25 minutos. Agregar la solución acuosa estéril de glucosa al 20% (5 ml/lt).

METODO:

Las soluciones estériles de los antibióticos se añaden asépticamente al medio Glicerina Dextrosa Agar (GDA).

Actidione (Solución N)

Disolver 4 gr. de actidione en 10 de acetona. Añadir 190 ml. de agua destilada estéril. Reposar por 30 minutos. Refrigerar a 4°C.

Bacitracina (Solución N)

Disolver 0.5 mgs. unidades de bacitracina en 250 ml de agua destilada estéril. Dejar reposar por 30 minutos. Refrigerar a 4°C.

Polimixin B Sulfato

Disolver 0.5 mgs. unidades en 500 ml de agua destilada estéril, refrigerar a -20°C. A cada litro de medio de cultivo añadir:

- 1.25 ml. de actidione.
- 3.125 ml. de bacitracina.
- 1.5 ml. de polimixin B sulfato. Mezclar y colocar en placas de Petri.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ACHA, P.N. y BORIS, S. Zoonosis y Enfermedades Transmisibles. Comunes al hombre, a los animales. Washington, OPS/OMS, 1977. Publicación Científica N° 354.
2. ALTON, G.G.; JONES LOUIS, M.E. y PRETZ, D.E. (1976). "Las técnicas del laboratorio en la Brucelosis". Segunda Edición, publicada bajo los auspicios de la FAO y OMS.
3. BAYLEY, R.R.; SCOTT, E.G. (1974). "Diagnóstico Microbiológico de Laboratorio". Saint Louis, V.V., Mosby Co. Cuarta Edición, Cap. 22, págs. 168-175.
4. BOLETIN INFORMATIVO DE NOMENCLATURA BACTERIOLOGICA (1963). Cap. 13, págs. 145-158.
5. BRAY, W.E.; M.D. "Métodos de Laboratorio Clínico". Segunda Edición, Unión Tipográfica. Editorial Hispanoamericana. Cap. 9, págs. 381-385.
6. BRYNLEY, M.S., MACKINNON, D.J., GILL, P.M., GOWER, S., MORRIS, P.T. W. "Standard Laboratory Technique for the Diagnosis of Brucellosis", Central Veterinary, New Haw, Weybridge, Surrey, England.
7. BURROWS, W. (1972). "Tratado de Microbiología". Décimocuarta Edición, Editorial Interamericana, págs. 513-514.
8. CASTRO, M.J.C. "Prevalencia de Brucelosis en suinos en el municipio de San Luis Talpa, Departamento de La Paz, El Salvador, Centro América.
9. DAVIS, B.D.R., DULBECCO, "Tratado de Microbiología". Salvat Editorial, Barcelona. 1a. Edición (1977).
10. EDWARDS, S., ROLDAN, M.G. (1979). "Variaciones de los Títulos de Anticuerpos e Interpretaciones de las Pruebas Serológicas". Boletín Informativo de la Dirección General de Agricultura y Ganadería. Departamento de Laboratorios.
11. HEPLER, O.E., (1965). "Manual Práctico de Análisis Clínicos". Editorial Labor, S.A., Cap. 8, págs. 211-214.
12. JAWETZ, ERNEST AT. "Manual de Microbiología Médica". Cuarta Edición, El Manual Moderno, S.A. Cap. 19, págs. 242-245.

13. LENNETTE SPAULDING TRUANT. 'Manual of Clinical Microbiology', Second Edition. American Society for Microbiology, Editorial Board (1974). Cap. 25, págs. 295-301.
14. LENNETTE SPAULDING TRUANT. 'Manual of Clinical Microbiology', Third Edition. American Society for Microbiology. Editorial Interamericana, págs. 325-329 (1980).
15. LYNCH, M.J., RAPHAEL MELLOR, LL., SPARE, P.D., INWOOD, J.J. (1972) 'Métodos de Laboratorio', Segunda Edición, Editorial Interamericana, págs. 945-947.
16. MANUAL PRACTICO DEL GANADERO, VII Edición. Laboratorios Life, S.A., págs. 105-117.
17. OMS (1965) Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, Quinto Informe Técnico. Ginebra.
18. OMS (1968) Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, Quinto Informe. Serie de Informes Técnicos. Ginebra.
19. OMS (1970) Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis, Quinto Informe. Serie de Informes Técnicos. Ginebra.
20. OMS (1971). 'Elaboración y Normalización de Antígenos para las pruebas de seroaglutinación de las Brucellas', Centro Panamericano de Zoonosis. Nota técnica N° 3.
21. OMS (1972) 'Guía para la preparación y Evaluación de Proyectos de lucha contra la brucelosis bovina y criterios y principios para el analisis de programas de lucha contra la brucelosis bovina'. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota Técnica N° 14.
22. OMS (1976) 'Técnica de Difusión en Gel de Agar para el diagnóstico de la epididimitis de los carneros'. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota Técnica N° 20.
23. PORTILLO, R. (1976) 'Diagnóstico y Control de la Brucelosis Bovina en El Salvador'. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Ganadería.
24. PROGRAMA DE EDUCACION PARA LA SALUD EN EL CONTROL DE LA BRUCELOSIS (1977). Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección General de Ganadería.
25. 'REPORTE EPIDEMIOLOGICO SEMANAL'. División de Epidemiología, Dirección General de Salud Pública y Asistencia Social (1975).

26. REYES KNOKE, M.A., RICE, D. (1977) "Evaluación de la campaña de control de brucelosis bovina en El Salvador". Primer Congreso Médico Veterinario. Dirección General de Ganadería.
27. REYES KNOKE, M.A. (1977) "Prevalencia de Brucelosis". Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Ganadería.
28. REYES KNOKE, M.A. (1979). "Prevalencia Serológica de Brucelosis en grupos ocupacionales expuestos en El Salvador". R.I.I.M. Vol. 8, Nº 1.
29. RODRIGUEZ, M.A. (1970). "La Brucelosis como enfermedad Zoonótica". Facultad de Ciencias Agronómicas. Universidad de El Salvador".
30. RUANO WILSON, S.E. (1977). "Repercusión Económica de la Brucelosis y Tuberculosis Bovina en El Salvador, Centro América". Publicado en el Primer Congreso Médico Veterinario. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Ganadería.
31. RUANO WILSON, S.E., MATAMOROS, V.I.A., ROSALES, M.M.I.A. (1973). "Diagnóstico de la Ganadería Bovina en El Salvador". Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Ganadería.
32. SEMINARIO NACIONAL SOBRE SANIDAD ANIMAL (1977). Ministerio de Agricultura y Ganadería. Dirección General de Ganadería.
33. SILVA, H.O.A., "Determinación de la Prevalencia de Tuberculosis, Brucelosis, Mastitis Sub-Clínica e Identificación de garrapatas en Bovinos del Municipio de Izalco, Departamento de Sonsonate, El Salvador". Tesis de Graduación, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala.
34. SORIANO, M.M.L., ZELAYA, M.S.R., MORATAYA, P.A.M. (1979). Prevalencia de Brucelosis Bovina en la Zona Oriental de El Salvador". Tesis de Graduación. Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador.
35. "SUB-PROGRAMA DE SANIDAD ANIMAL, EL SALVADOR". Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA). 1976.
36. ZINSSER, SMITH DAVID (1977). "Microbiología". Tercera Edición. U.T.E.H.A.