

Epidemiología molecular de un foco primario de brucelosis en el Estado de México

✉ Diana S Leal-Klevezas,¹ Alberto Barbabosa-Pliego,² Marcial Flores-Trujillo,² Ahidé López-Merino,³ Juan P Martínez-Soriano⁴

¹Centro de Investigación Biomédica del Noreste. Instituto Mexicano de Seguro Social. San Luis Potosí y 2 de abril, Colonia Independencia, 64720 Monterrey, NL, México. Telf: (52-8) 343 1251; Fax: (52-8) 344 4116; E-mail: dsleal@academ01.mty.itesm.mx

²Universidad Autónoma del Estado de México. ³Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. ⁴Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados.

ABSTRACT

A polymerase chain reaction (PCR) assay was used to diagnose and analyze a brucellosis outbreak. In this study *Brucella* spp. were detected in humans by serological means (rose Bengal, buffered acidified antigen, rivanol and complement fixation) and were confirmed by direct and semi-nested PCR. These procedures were also used on farm animals, demonstrating the presence of this pathogen in bovines, ovines, swines, and canines. The molecular diagnosis was also confirmed by the isolation and typification of *Brucella abortus* as the pathogen associated with the outbreak. Herein it is discussed that the initial infection likely started in bovines and spread horizontally to the other species. PCR could be considered as a concluding test for the "molecular isolation of *Brucella*", since the pathogen can be efficiently detected by such procedures in early or latent infections of symptomless animals or humans.

Keywords: brucellosis, epidemiology, molecular diagnosis, PCR, polymerase chain reaction

Biotecnología Aplicada 1999;16:149-153

RESUMEN

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) fue utilizada para diagnosticar y analizar un foco de brucelosis en un núcleo familiar agropecuario. *Brucella* spp. fue detectada en humanos por seroaglutinación (rosa de Bengala, antígeno acidificado buferado, rivanol y fijación de complemento) y confirmada por RCP directa y semianidada. Estas pruebas se extendieron a los animales de la granja familiar, lo que demostró la presencia del patógeno también en bovinos, ovinos, porcinos y caninos. El diagnóstico molecular fue reforzado por el aislamiento bacteriológico y la tipificación de *Brucella abortus* como agente causal de ese foco primario. En este trabajo se discute que la infección inicial probablemente partió de bovinos infectados y se dispersó horizontal e interespecíficamente a las otras especies. La RCP podría ser considerada como una prueba definitiva en el "aislamiento molecular de *Brucella*", ya que estos procedimientos permiten la detección de infecciones tempranas o latentes en pacientes o animales asintomático

Palabras claves: brucelosis, epidemiología, diagnóstico molecular, RCP, reacción en cadena de la polímera

Introducci

La brucelosis es una zoonosis que ocasiona enormes pérdidas a la industria pecuaria y representa un verdadero riesgo ocupacional para las personas que trabajan o consumen productos crudos provenientes de animales infectados. *Brucella* spp., agente causal de la brucelosis, es una bacteria cocobacilar aeróbica, gramnegativa, que no produce cápsula ni esporas y tampoco posee flagelos. La bacteria es un parásito que generalmente se localiza en los tejidos reticuloendoteliales, órganos reproductivos, articulaciones y huesos, donde ocasiona infecciones crónicas en el ganado caracterizadas por bacteremias recurrentes o persistentes que culminan en el aborto en vacas, ovejas y cabras, además de infectar los órganos reproductivos del macho y causarles lesiones de consideración.

Esta enfermedad causa hasta 65% de los abortos en vacas, cerdos, ovejas y cabras [1, 2], lo que hace que la producción de carne y leche merme considerablemente. Se estima que durante 1992 la brucelosis causó pérdidas superiores a 33 millones de dólares en los ganados bovino y caprino productores de leche y carne [1]. Otros efectos negativos son las pérdidas económicas causadas por la brucelosis, con la restricción

de movimiento territorial (entre entidades federativas o países), lo que dificulta la comercialización y el mejoramiento genético del ganado e incrementa los costos de operación de los mismos [2, 3].

En humanos, el período de incubación puede ser de una a tres semanas y constituye una enfermedad debilitadora caracterizada por fiebre, escalofríos, cefalea y dolor muscular o articular. Como promedio, la recuperación ocurre en uno o tres meses, aunque la laxitud permanece por un período más prolongado. En cursos crónicos, la fiebre puede mostrar un patrón ondulatorio y de ahí el apelativo "fiebre ondulatoria". Cuando la enfermedad es aguda, la toxemia extrema, la trombopenia y la endocarditis pueden llevar a la muerte del individuo.

El control de la enfermedad en animales tiene un gran impacto en la reducción de la incidencia en humanos. La incidencia de brucelosis en la población humana de México es oscilatoria, con una variación temporal y dependiente de la entidad. Los estados de Nuevo León, Querétaro, Coahuila, Guanajuato, Zacatecas, Michoacán, San Luis Potosí y Chihuahua ocupan el primer lugar, con una incidencia de 1,2 a 25 casos por cada 100 000 habitantes [4]. El prolongado

1. Valdespino OJR. Impacto económico de la brucelosis y tuberculosis bovina durante 1992 en México. In: Proceedings of the XIV Panamerican Congress of Veterinarian Science; 1994; Acapulco, Gro. México; 1994. p.858.

2. Beal VC. Current estimated brucellosis losses. Hyattsville, MD: Veterinary Services. Animal and Plant Health Inspection Services. US Department of Agriculture; 1984.

3. Jawetz E, Melnik JL, Adelberg EA. Microbiología médica. 11a. ed. México, D.F.: El Manual Moderno; 1985.

4. López-Merino A. Brucelosis: avances y perspectivas. En: Publicación Técnica del INDR-SSA No. 6; 1991. p. 54.

período de postración y los elevados costos del tratamiento de la brucelosis en humanos, tienen un gran impacto en las economías familiar y nacional, debido a que afecta primordialmente a la población económicamente activa, o sea, el grupo de edades comprendido entre 15 y 44 años. Este grupo está seguido por el de 5 a 14 años, y la menor frecuencia de casos corresponde a los menores de 1 año [4, 5].

Se considera que el método más confiable para el diagnóstico de una enfermedad infecciosa se basa en el aislamiento e identificación del agente etiológico. En el caso de *Brucella*, estos procedimientos son lentos (de una a cuatro semanas), tediosos, poco exitosos [5], y por su contagiosidad, de gran riesgo para la salud de los técnicos encargados del estudio. Por estas razones, el examen bacteriológico no siempre es practicable, lo que hace que el diagnóstico se realice generalmente por métodos serológicos rápidos y relativamente fáciles de aplicar [6]. Para *Brucella*, se utilizan la prueba de rosa de Bengala (RB), el método de fijación de complemento (FC), la aglutinación estándar en tubo, la prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol y la prueba de Coombs [6-11].

Los métodos serológicos, además de una insuficiente sensibilidad, también presentan problemas de especificidad, ya que con frecuencia ocurren reacciones cruzadas o aparecen falsos positivos, y es difícil detectar infecciones tempranas o latentes y prácticamente imposible diferenciar entre los anticuerpos de un animal enfermo y uno vacunado [11, 12].

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) ha sido incorporada en la detección de *Brucella* a nivel de género, con la utilización de diversas secuencias como blanco: entre ellos, el gen de la proteína de 43 kDa de membrana externa de *Brucella abortus* [13] y el gen que codifica el ARN ribosomal 16S de *B. abortus* [14]. También se ha utilizado la metodología desarrollada por Kulakov y colaboradores [15].

Dos últimos protocolos de RCP para *Brucella* fueron desarrollados por algunos investigadores del grupo de trabajo de los autores, con el empleo de la secuencia del gen *omp2*, que codifica una proteína de la membrana externa del patógeno [16-18].

Las técnicas empleadas en estos protocolos son las más sensibles que se han reportado para la detección de *Brucella* spp. Los análisis genéticos por RCP con la utilización de los cebadores mencionados, han permitido amplificar secuencias de *Brucella* a partir de muestras de sangre y/o de leche de caprinos [17], ovinos, bovinos [19] y humanos [18].

La especificidad de la prueba es elevada, ya que estudios de especificidad realizados con anterioridad demostraron que no hay amplificación de los genomas de organismos relacionados filogenéticamente [12, 20].

El presente trabajo tuvo como objetivo realizar el diagnóstico de la brucelosis por medio de la RCP, en apoyo al estudio epidemiológico de un foco primario de la enfermedad en una explotación lechera en la que conviven humanos y varias especies de animales domésticos. En el estudio, la presencia de *Brucella* spp. en la mencionada comunidad rural fue determinada inicialmente por varios métodos de diagnóstico. Finalmente, se dedujeron aspectos del comportamiento epidemiológico de la brucelosis y su cadena epizootica.

Materiales y Métodos

Recolección de muestras

El presente estudio se realizó en un rancho de explotación lechera en el Municipio de Villa Victoria, Estado de México, donde se sospechaban posibles casos de brucelosis en humanos. Debido a la importancia en la determinación de la posible cadena epidemiológica entre los diversos animales de la granja y de posibles focos de infección primaria, se tomaron muestras de cuatro especies animales (bovinos, porcinos, ovinos y caninos) sin considerar la edad, el sexo, la función zootécnica o el estado reproductivo. Se incluyeron también trabajadores del rancho y un menor de edad.

Se colectaron muestras de sangre de todos los miembros de una familia rural (8 humanos) y de sus animales de granja (88 animales), con la realización ocasional de muestreos sucesivos hasta por cuatro veces (Tabla). El muestreo preliminar se realizó en el mes de noviembre de 1994, y se continuó cada seis a ocho semanas en los meses de febrero, abril y junio de 1995. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos Vacutainer™ de 13 x 100 mm, etiquetados con los respectivos nombres o el número de la muestra. La sangre heparinizada de humanos, cerdos, perros, ovejas y bovinos fue utilizada para realizar pruebas moleculares. Una porción de las muestras de sangre fue coagulada a temperatura ambiente, y el suero fue separado para la realización de las pruebas serológicas.

Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas se realizaron para el diagnóstico presuntivo, de acuerdo con lo descrito por Alton y colaboradores [9]. Las pruebas desarrolladas fueron RB, rivanol (R), FC y antígeno acidificado bufferado (AAB). La prueba de anillo en leche (AL) se llevó a cabo únicamente para vacas que se encontraban en el período de lactancia. El antígeno usado provino de Pronabive, México.

Reacción en cadena de la polimerasa

Extracción de ADN. El ADN bacteriano fue extraído por el método previamente descrito [17]: muestras de 400 µL de sangre heparinizada fueron centrifugadas en tubos Eppendorf™ de 1.5 mL a 5 000 rpm por 5 min (microcentrífuga Beckman-5415C, EUA). El sobrenadante se desechó y al paquete celular se le agregó 1 mL de solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM; NaHCO₃ 10 mM; Na₂EDTA 0,1 mM pH 7,4). El contenido de los tubos se homogenizó por inversión y posteriormente se centrifugó a 6 000 rpm por 3 min. El procedimiento se repitió hasta la completa aclaración.

Tabla. Número de humanos y animales analizados por RCP directa y/o semianidada y cultivo.

Organismo	Total	RCP directa	RCP semianidada	Cultivo
Humanos	8	2	3	0
Bovinos lecheros	55	9	11	1*
Porcinos	22	4	5	0
Ovinos	9	1	1	0
Caninos	2	2	2	0
Total	96	18	22	1*

*El aislamiento se logró en uno de cuatro cobayos inoculados con restos fetales de bovinos.

5. Ruiz-Castañeda M. Brucelosis. 3ra. ed. México, D.F.: La Prensa Médica; 1986.

6. Ariza J. Diagnóstico de la brucelosis en la actualidad. Med Clin 1992;98:491-483.

7. Huddleson IF, Abell F. Rapid macroscopic agglutination test for the serum diagnosis of Bang's abortion disease. J Infect Dis 1928;42:242-7.

8. Byrd JW, Heck FC, Hidalgo RJ. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Brucella abortus* antibodies. Am J Vet Res 1979;40:896-8.

9. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: Imprimerie Louis Jean; 1988.

10. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis 1992; 14(1):131-40.

11. Hess WR, Roepke MH. A nonspecific *Brucella*-agglutinating substance in bovine serum. Proc Soc Exp Biol Med 1951;77:469-72.

12. Perry M, Bundle DR. Antigenic relationships of the lipopolysaccharides of *Escherichia hermannii* strains with those of *Escherichia coli* O157:H7, *Brucella melitensis*, and *Brucella abortus*. Inf Immun 1990;58:1391-5.

13. Fekete A, Bantle JA, Halling SM, Sonborn MR. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. J Appl Bacteriol 1990;69:216-27.

14. Herman L, de Ridder H. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 1992;58(6):2099-101.

15. Kulakov YK, Gorelov VN, Motin VL, Brukanskii GV, Skavroskaya AG. A highly sensitive nonisotopic DNA hybridization system using amplification (PCR) for the identification and indications of *Brucella*. Molekulyarnaya Genetika, Microbiologiya i Virusologiya 1992;7:8:23-7.

16. Leal-Klevezas DS, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar 1 using PCR. Arch Med Res 1995;26(3):263-7.

17. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, López-Merino A, Martínez-Soriano JP. Single step PCR for the detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J Clin Microbiol 1995;33(12): 3087-90.

18. Leal-Klevezas DS, Martínez-Vázquez IO, Martínez-Soriano JP. «Nested PCR» en la confirmación del diagnóstico de brucelosis en humanos. Reunión Regional de Investigación Médica del IMSS; Monterrey, N.L. México; 1995. p.16.

19. Martínez-Soriano JP, Cab-Barrero EL, Tamez-González R, Leal-Klevezas DS. Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. Bioquímica 1993;18(4):10-6.

20. Yanagi M, Yamasato K. Phylogenetic analysis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of the 16S genes using PCR and DNA sequencer. FEMS Microbiol Lett 1993;107(1):115-20.

ción del paquete celular. El sobrenadante fue desechado y el paquete de células restante fue resuspendido en 400 µL de solución de lisis total (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,0), con la adición de 100 µg de Proteinasa K (Sigma, USA). Las muestras se agitaron suavemente y se incubaron por 30 min a 50 °C, para proseguir con la adición de un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) [21]. Posteriormente, se centrifugó durante 2 min a 8 000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. La eliminación de los contaminantes se realizó mediante la adición y mezcla de 200 µL de NH₄Ac 7,5 M, seguido de reposo por 10 min en hielo y centrifugación por 2 min a 10 000 rpm. El contenido acuoso se transfirió a un nuevo tubo y se adicionaron dos volúmenes de etanol 95% o un volumen de 2-propanol. Los tubos se dejaron en reposo toda la noche a -20 °C y el ADN fue recuperado por centrifugación a 10 000 rpm por 5 min. Las pastillas se lavaron con 1 mL de etanol 70%, se secaron y se resuspendieron en 20 µL de tampón TE (Tris-HCl 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

Diseño de oligonucleótidos sintéticos. Los cebadores empleados en las RCP fueron sintetizados y preparados por la compañía BioSynthesis Inc. (Texas, USA). Las secuencias de los cebadores previamente reportados son:

Bru1, 5'-gcgctcaggctgccgacgcaa-3' [16];
 Bru3, 5'-ccagccattgcggtcggtac-3' [17] y
 Bru4, 5'-accccagacagcccaa-3' [16].

Otros cebadores utilizados en el estudio fueron los reportados por Bricker y Halling en 1994 [22]: *B. abortus*-specific 5'-gacgaaccgaattttccaatccc-3'; *B. melitensis*-specific 5'-aaatcgctccttctgctgtctga-3' y IS711-specific 5'-tgccgatcacttaaggccttcac-3'.

Reacción enzimática cíclica. La RCP se realizó en un volumen total de 50 µL que contenía 250 ng de ADN, 50 pmol de cada cebador (oligonucleótidos sintéticos), KCl 50 mM, Tris-HCl pH 9,0 10 mM, Tritón X-100 0,1%, MgCl₂ 3,0 mM, 200 mM de cada uno de los cuatro desoxirribnucleósidos trifosfatados y 2,5 unidades de la polimerasa *Taq* (GIBCO-BRL Inc., Maryland, USA). Para prevenir la evaporación, la solución de reacción fue cubierta con 50 µL de aceite mineral. La reacción se desarrolló en un termociclador (Perkin Elmer, USA) con el siguiente perfil de amplificación: 94 °C por 3 min, 34 ciclos a 94 °C por 60 s, 60 °C por 60 s y 72 °C por 60 s. Se tomaron 6 µL de la reacción de amplificación y se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa a 1,5% preparado en tampón TBE 1X (Tris-HCl 100 mM, ácido bórico 90 mM, Na₂EDTA 1 mM), posteriormente se introdujo en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se visualizó el ADN mediante luz ultravioleta.

RCP semianidada. Este procedimiento se llevó a cabo mediante dos amplificaciones secuenciales con el uso de diferentes juegos de cebadores. Los sitios de alineamiento y los productos esperados de las amplificaciones se muestran en la Figura 1A. El primer paso o RCP directa se realizó con los cebadores Bru1 y Bru4. La segunda amplificación se realizó con los cebadores Bru1 y Bru3 a partir de 1 µL de la primera reacción de amplificación con la adición de todos los componentes descritos en el subcapítulo anterior.

Bioensayo, aislamiento bacteriano y tipificación bioquímica

El bioensayo y las observaciones histopatológicas realizados en un feto bovino abortado, y el cultivo y la tipificación bacterianos, se llevaron a cabo según protocolos establecidos previamente [9]. La prueba biológica se realizó mediante la inoculación a cuatro cobayos de 1 mL de macerado del producto del aborto de una vaca de la explotación, los cuales fueron

21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

22. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994;32(1): 2660-6.

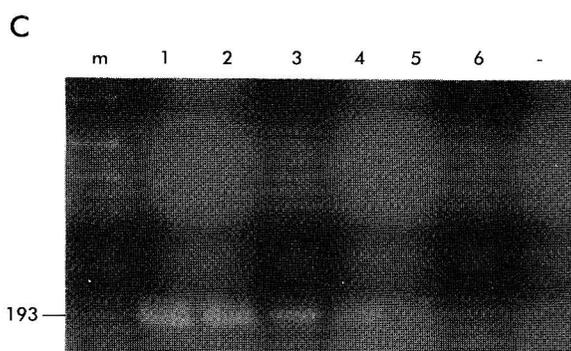
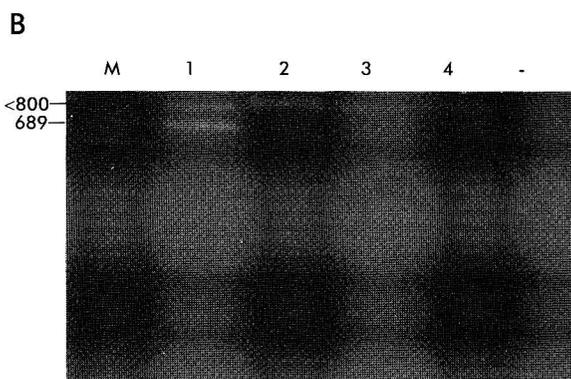
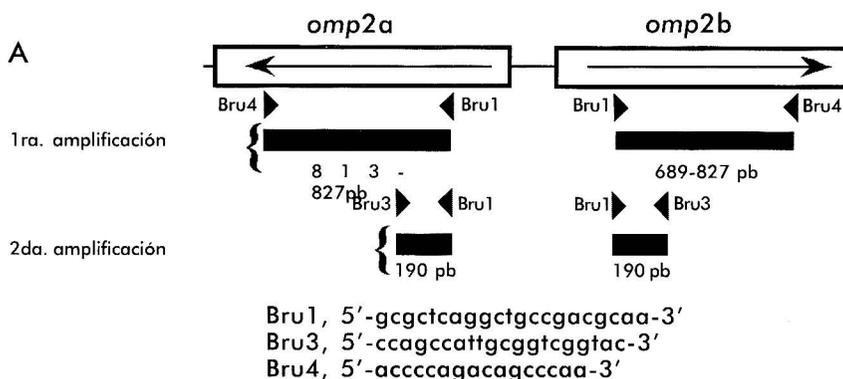


Figura 1. (A) Mapa de amplificación de la región *omp2a/omp2b* que muestra con barras las amplificaciones esperadas con los iniciadores señalados. M y m: escalera de 100 pb y PBR 322 *AluI* usados como marcadores de talla molecular, respectivamente. Amplificación de una porción del genoma de *Brucella* por RCP directa (B) y semianidada (C) a partir de DNA extraído de cepas y muestras de sangre de individuos infectados. Carrilera 1, cepa 544 de *B. abortus* (control positivo); carrilera 2, cepa aislada de un feto bovino abortado; carrileras 3 y 4, humano y bovino, respectivamente; carrileras 5 y 6, amplificación simple con Bru1 y Bru3 de las muestras usadas en 3 y 4; (-), genoma de *Ochrobactrum anthropi*, usado como control negativo.

monitoreados serológicamente los días 9, 18, 36 y 42 después de la inoculación. Luego, se procedió a los estudios anatómicos e histopatológicos correspondientes, así como al aislamiento microbiológico e identificación de *Brucella*.

Epidemiología

Se elaboró y aplicó una encuesta epizootológica que recogiera los aspectos más importantes sobre la situación, entre ellos, los antecedentes que permitirían determinar el origen del foco, el empleo de vacunas y en qué dosis, medidas de control aplicadas con los reactores positivos, la ocurrencia de abortos u otros trastornos del aparato reproductor, la utilización de cuarentena, entre otros que permitieron evaluar el comportamiento del foco.

Resultados y Discusión

Diagnóstico molecular en humanos

De los ocho humanos seleccionados, uno (un infante) presentaba el cuadro clínico característico de la brucelosis, con reacciones febriles positivas al antígeno brucelar desde etapas tempranas del estudio. La RCP directa (Figura 1B) a partir de ADN extraído de glóbulos blancos de sangre periférica, mostró amplificaciones notables en dos de los ocho individuos y amplificación débil en otro más. La resolución de este último procedimiento fue optimizada considerablemente con la técnica de RCP semianidada (Figura 1C), lo que permitió la confirmación de tres casos de brucelosis humana en la misma localidad (Tabla). Al final del estudio, los tres pacientes positivos por RCP y/o RCP semianidada mostraron seroaglutinaciones. Esto indicó que, en dos de los tres casos, la RCP directa y la RCP semianidada mostraron la capacidad de detectar casos subclínicos de brucelosis. En la encuesta se determinó que dos de los tres humanos infectados tenían contacto directo y continuo con los animales, y el tercero (menor de edad) posiblemente contrajo la enfermedad al consumir productos lácteos contaminados en forma sistemática.

Diagnóstico molecular en animales

Los resultados obtenidos mediante RCP directa y semianidada se muestran en la Tabla. Los métodos de extracción y RCP resultaron ser exitosos en la determinación, por estas pruebas moleculares, de la presencia de *Brucella* en animales de diferentes especies como caninos, ovinos y porcinos, lo que no había sido reportado anteriormente en la literatura. Si se consideran las limitaciones de los métodos de diagnóstico utilizados actualmente, se puede asumir que un número importante de animales portadores pasan desapercibidos en dichas pruebas diagnósticas, permaneciendo subregistrados y, peor aún, como foco de infección.

Diagnóstico serológico

Los análisis serológicos realizados como punto de partida en muestras de animales, mostraron de inmediato que la brucelosis estaba presente en el rancho. La incidencia relativa derivada de los resultados de las diferentes técnicas serológicas varió con la prueba y con el tiempo. El diagnóstico basado en pruebas serológicas fue eficiente como prueba tamiz antes de la RCP y el aislamiento microbiológico. El mayor número de animales positivos se detectó mediante las pruebas RB y FC.

Se registraron seroprevalencias promedio muy elevadas que van desde 20% en humanos y 30% en porcinos, hasta 50% en ovinos, y 48% y 100% en caninos (lo cual no es sorprendente debido al tamaño de muestra tan reducido: dos animales). El comportamiento de tan elevadas seroprevalencias momentáneas con tendencia ascendente, es característico para los estados epizooticos naturales y espontáneos; es decir, aquellos en los que no existe control sobre las fuentes y vías de transmisión de la brucelosis. Las mismas tendencias se encontraron por RCP semianidada (Figura 2). Se ha demostrado que cuando la infección está establecida en forma endémica, prácticamente todos los animales tienen o han tenido contacto con el patógeno, por lo que existe respuesta inmunológica en animales portadores y no portadores de la bacteria. Estos resultados indicaron, de forma general, una mayor sensibilidad de la prueba de RB en comparación con los métodos restantes, seguido en orden de sensibilidad por la prueba de FC (datos no mostrados).

Bioensayos

Debido a la imposibilidad de lograr el aislamiento microbiológico a partir de muestras directas de animales y aprovechando que ocurrió un aborto bovino, se realizaron estudios diagnósticos para determinar la causa del mismo en la vaca arete No. 24 azul, que abortó el 30 de mayo de 1995 con 253 días de gestación aproximadamente (8.5 meses). El aborto se manifestó en horas tempranas de la mañana de manera espontánea, sin alteraciones del feto ni de la placenta, ni secreciones posaborto. Las primeras 24 h se manifestó poca secreción láctea (calostro), sin embargo, a partir de las 48 h la producción de leche fue normal. Las muestras de leche tomadas los días 1 y 8 después del aborto, mostraron resultados positivos a la prueba de AL.

Durante el examen anatomopatológico del feto se apreció, como característica macroscópica, un ligero tinte icterico generalizado y esplenomegalia marcada. La prueba de patogenicidad fue realizada en cuatro cobayos a partir de la inoculación subcutánea del maçerado de órganos y de más contenido gástrico del feto. El muestreo para los exámenes serológicos se realizó los días del 7 al 12, 21 y 42 posteriores a la inoculación. Mediante el muestreo serológico se determinó positividad en todos los cobayos con las pruebas RB y FC; los títulos obtenidos en la última fueron de hasta 1:1 024. En los hemocultivos practicados en medios de Farrell modificado, se obtuvo crecimiento a partir del día 8 al 12 después de la inoculación con colonias que, por sus características morfológicas y de tinción, y según pruebas bioquímicas, aglutinación con sueros antiA y antiM y tipificación con bacteriófagos y RCP, corresponden a *Brucella* spp.

En el examen histopatológico realizado a fragmentos de hígado, bazo y pulmón de los cobayos, se detectaron las siguientes alteraciones: necrosis focal múltiple de tipo coagulativa con reacción proliferativa de tipo histolinfocitaria y características granatomatosas, principalmente en el hígado y el bazo.

Este bioensayo permitió, además, recuperar la única cepa de *Brucella* aislada en este estudio y determinar con ella, por medio de dos RCP diferenciales previamente descritas por Leal-Klevezas y colaboradores [16] y por Bricker y Halling [22], que *B. abortus* (sin pertenecer a la biovariedad 1) fue la especie aso-

ciada al brote. El hecho anterior fue confirmado por pruebas bioquímicas específicas [9].

Encuesta

La encuesta mostró claramente deficiencias en las medidas de cuarentena, ya que no se controla el estado sanitario de los animales nuevos que se incorporan a los hatos. Aunque se elimina parte de los reactores positivos, otros permanecen en el rebaño sin que exista un calendario de pruebas correcto, de acuerdo con lo que establecen las normas del Programa Nacional para el Control de la Brucelosis. Al no efectuar el saneamiento, se permite la convivencia de animales de diferentes especies bajo medidas de bioseguridad exiguas e insuficientes para los trabajadores.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo muestran el enorme potencial de la RCP en estudios epidemiológicos, al contribuir en la identificación del agente etiológico de un foco primario de brucelosis. Este trabajo no sólo confirma la presencia de *Brucella* en la comunidad, sino también indica las incidencias reales de *Brucella* en la misma. Las actividades familiares y de trabajo de la comunidad familiar permiten establecer, en forma tentativa, que el foco se inició en los bovinos y luego se dispersó horizontalmente entre las demás especies. Este razonamiento es reforzado por varias observaciones:

- El agente causal fue aislado y tipificado bioquímica y molecularmente como *B. abortus*, que aunque no es exclusiva de bovinos (tiene la capacidad de infectar a todas las especies aquí estudiadas), generalmente está asociada a la brucelosis bovina.
- Uno de los humanos infectados es un infante que no tuvo contacto directo con los animales de la granja,

por lo que se presupone que la infección proviene de los productos lácteos obtenidos de los bovinos del rancho y consumidos por el niño.

- La asociación de *B. melitensis* con el brote fue descartada por pruebas moleculares y reforzada con la observación de que en la comunidad estudiada no se cuenta con caprinos y la presencia de *Brucella* spp. en ovinos fue muy baja.
- La cadena epizootica puede ser tentativamente deducida a partir de los hábitos alimentarios de los animales que conviven con el ganado. Los altos porcentajes de infección en humanos y caninos (Tabla) pueden estar relacionados con su estrecho contacto con los animales y el consumo de productos derivados de éstos. Normalmente, los perros se alimentan de productos crudos, por lo que el paso de la infección a esta especie pudo provenir del consumo de leche, carne, sangre o fetos abortados contaminados con *Brucella* provenientes de cualquiera de las otras especies animales. Una situación similar pudiera observarse en la población de cerdos, dada su condición omnívora, el hacinamiento y la insalubridad. La baja incidencia de brucelosis en ovinos puede deberse a que no son hospederos primarios de *B. abortus* y a que son herbívoros.
- La sensibilidad y especificidad de las pruebas usadas demuestran ser herramientas excelentes para estudios epidemiológicos y sobre dispersión del agente causal, y para la detección de infecciones latentes o tempranas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Irma Olivia Martínez-Vázquez y a Juan Carlos Ochoa-Sánchez por su valioso auxilio técnico. Esta investigación ha sido apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México, mediante el proyecto 264100-5-1382PN.

Recibido en octubre de 1998. Aprobado en abril de 1999.



Lic. José L. Martínez
Presidente
Comisión Organizadora

Tercer Congreso Internacional
de Plantas Medicinales Chile '99

Casilla 70036, Santiago 7, Chile
Fax: (562) 6300467 / 6300507
E-mail: pulpito@entelchile.net

Tercer Congreso Internacional de Plantas Medicinales Chile '99

23 - 26 de Octubre de 1999

Centro El Canelo de Nos
Av. Portales N° 3020
San Bernardo
Santiago de Chile, Chile

La Corporación para la Investigación Multidisciplinaria y el Desarrollo Sustentable de la Flora Nacional le invitan a participar en este Congreso.

El programa comprenderá las siguientes actividades:

- Comunicaciones libres orales
- Paneles
- Simposia
- Conferencias