

ASLAMIENTO DE CEPAS DE *BRUCELLA* sp., EN MUESTRAS DE LECHE BOVINA PRODUCIDAS EN FINCAS DEL SECTOR EL DOS DE SOCOPO, ESTADO DE BARINAS, VENEZUELA

Angela A. Lugo*, Victor J. Roa*, Adolfo L. Martínez*, Judith Araque**, Datty V. Rosales Zambrano* y Félix D. Andueza**

*Laboratorio de Zoonosis, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes (Mérida, Venezuela); **Laboratorio de Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes (Mérida, Venezuela)

E-mail: alugo@ula.ve



Introducción

La brucelosis es una zoonosis presente en los países del continente Americano. Por su impacto en la salud es reconocida como una de las zoonosis más importantes a nivel mundial. En el hombre; la enfermedad causa problemas de salud y repercusiones socioeconómicas; el riesgo de infección es mayor cuando la población humana está en estrecho contacto con el ganado enfermo, productos lácteos con deficiente pasteurización principalmente los quesos frescos. También es debido a deficientes hábitos sanitarios en mataderos, carnicerías y frigorífico (1). En el hombre la brucelosis es llamada fiebre de malta u ondulante. En los

animales se denomina como enfermedad de Bang, o del aborto contagioso (2).

En Venezuela el valor del producto es casi similar, independientemente si proviene de zonas significativamente contrastantes en potencial y productividad, dándoles el mismo tratamiento a productores absolutamente diversos en calidad tecnológica y calidad del producto. Esta absurdo económico de zonas y productores totalmente variados, pero homogenizados por el valor del producto trajo las más profundas consecuencias en la producción (3,4).

El productor lechero no ha tenido estímulos suficientes, ni razones de peso, para producir a nivel de finca leche de alta calidad físico- química y bacteriológica, en segundo lugar se ha conformado un enorme mercado de leche cruda sin controles efectivos, generando algunos productos que pueden poner en peligro la salud pública. El ambiente creado, ha favorecido una baja calidad de leche cruda, situación que parece no interesar a nadie. El sector oficial con máxima responsabilidad sobre lo que está aconteciendo, permanece inerte, lo cual agudiza el problema (5).

Una de esas consecuencias, es la transmisión de la brucelosis animal, esta puede generar barreras en la comercialización de los animales y sus productos, lo cual podría alterar seriamente el desarrollo socioeconómico, especialmente de los pequeños ganaderos, el sector más vulnerable en muchas poblaciones rurales. Por esta razón, la OMS y otros organismos han establecido planes para eliminar la brucelosis de bovinos, ovinos y caprinos tanto en Europa como en América Latina. Los programas de control y erradicación de la brucelosis bovina tienen un marcado efecto en la incidencia y prevalencia de la infección bovina y humana (6,7,8).

Obtener un certificado de hato libre de brucelosis, a veces se obtiene pagando muchos dividiendos y así evitar restricciones de movilización, además es más fácil comercializar animales de fincas sanas que aquellos que son sospecha de enfermedad. La brucelosis es una enfermedad que por su difusión afecta a fincas vecinas. La falla de controles sanitarios vigentes puede ser un factor de diseminación continua de la infección. Por todas estas razones y en mira de conocer la verdadera situación que se presenta en los rebaños lecheros del sector El Dos de Socopó Estado Barinas, se realizó la presente investigación (9).

Materiales y Métodos

Área de estudio: El sector el Dos está ubicado en las orillas del río Michay al occidente del Estado Barinas en Socopó, Municipio Antonio José de Sucre el cuál se encuentra entre los meridianos 70° 30' y 71° 00' y los paralelos 8° 00' y 8° 30' aproximadamente. Parroquia Ticoporo, específicamente en la carretera Batatuy. Sus coordenadas geográficas son: al norte con el Estado Mérida al sur con el Municipio Pedraza, al este con el Municipio Pedraza y al oeste con el Municipio Ezequiel Zamora. Éste sector cuenta con 20 fincas que abarcan seis mil (6000) hectáreas de tierra, destinadas a la crianza de ganado bovino para la producción de leche (10).

Tipo de muestra: Se estudiaron muestras de leche bovina. La toma de las muestras de leche cruda se realizó durante el período correspondido de mayo a junio del año 2009, en cada una de las fincas estudiadas. El volumen de las muestras analizadas fue de 250mL, obtenido de manera aséptica y en envases estériles, a partir de las cantaras. El transporte para la preservación de las muestras fue bajo refrigeración hasta e procesamiento en el laboratorio de zoonosis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. El tipo de muestreo utilizado fue el aleatorio simple, según (11). Se analizaron muestras de leche procedentes de 8 fincas en el sector el Dos Socopó Estado Barinas.

Reactivos y medios de cultivo: Para la realización de ésta investigación se utilizaron anticuerpos contra *Brucella* sp. Los cuales se obtuvieron a través de Instituto de Investigaciones Veterinarias (INIA) ubicado en Maracay Estado Aragua y Productora Nacional Biológica Veterinarios, México. El sistema de identificación batería API se obtuvo del Laboratorio GAMBARO C.A. Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico. Para el análisis microbiológico se utilizaron medios de cultivo deshidratado como agar *Brucella*, TSA, y pruebas bioquímicas complementarias. En el preparación de los medios se aplicaron todas las medidas de bioseguridad necesarias para evitar cualquier tipo de contaminación. Los medios deshidratados fueron sometidos a esterilización a 15 PSI de presión y 120°C, durante 30 mín.. Posterior a su elaboración se le realizó un control de calidad durante 24 horas a 37° C. En el caso de agar *Brucella* (OXOID) se le agregó para 500 ml. Un frasco de suplemento selectivo conteniendo los siguientes antibióticos: Polimixina B, 2,500 U.I.; Bacitracina, 12,500 UI; Cicloheximida, 50mg, Acido Nalidixico, 2.5 mg, Nistatina, 50,000 UI y Vancomicina 10mg.

Metodología: Se realizaron determinaciones cualitativas de los anticuerpos anti-*Brucella* presentes en la leche, aplicando la prueba presuntiva del anillo en leche (PAL); las muestras que resultaron positivas se sembraron en agar *Brucella*; las mismas se sometieron a incubación en condiciones de anaerobiosis y microaerofilia a 37°C durante 24 a 48 horas. Las colonias que se desarrollaron, se purificaron en agar tripticasa soya, aplicándose posteriormente las pruebas complementarias como coloración de Gram y prueba de la oxidasa, esto con la finalidad de observar la morfología, coloración y diferenciación de la bacteria. Por otra parte a partir de un cultivo puro se identificaron las diferentes cepas utilizando una batería bioquímica tradicional para no fomentadores, sistema API 20E y API 20NE utilizada para enterobacterias y para no enterobacterias respectivamente.

Prueba del Anillo en Leche: Esta prueba detectó la presencia de anticuerpos contra *BRUCELLA* en la leche. Los anticuerpos reaccionan con el antígeno, formando con él un complejo adherido a la superficie de los glóbulos de grasa de la leche y que asciende con ellos para formar una capa de leche coloreada o anillo, la metodología y lectura empleada fue la descrita por Alton (12).

Pruebas Bioquímicas Clásicas. Para la identificación del género *Brucella* se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas especiales a partir de las colonias repicadas en agar TSA inclinado en tubo, así como también a las cepas controles de *B. abortus*, *B. canis* y *B. suis*. Se sembraron en medio Kigler, Citrato de Simona, medio Indol-Motilidad-Ornitina, urea de Christensen (13).

Pruebas especiales para Brucella sp. :Se efectuaron técnicas específicas para *Brucella* sp., como producción de acetato de plomo (tiras impregnadas), crecimiento en fucsina (0.7 mg/ml), aglutinación con acriflavina al 1% y aglutinación con suero polivalente para *Brucella* sp. (MICSA) (14).

Sistema API 20 NE y 20 E :El sistema de ensayo API-20 NE, es un sistema estandarizado y un método rápido para la identificación de bacterias gran negativas no enterobacterias, y API-20 E, es empleado para enterobacterias, permitiendo determinar a nivel de género y especie. Incorpora reactivos disecados en cavidades plásticas dentro de las cuales se coloca una suspensión del organismo en estudio. Consiste en un dispositivo plástico con 20 mini-tubos se inoculan con la suspensión bacteriana que reconstituyen las pruebas. Las reacciones producidas durante el período de incubación se traducen en cambios de colores espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos que permitirán la identificación del microorganismo, de acuerdo con su actividad metabólica, como por ejemplo fermentación de carbohidratos, producción de H₂S, hidrólisis de

gelatina (15). Una vez obtenidos los resultados se procedieron a evaluar por medio del sistema computarizado Api-web.

Resultados y Discusión

Para conocer la situación de la brucelosis en la zona de estudio se realizó en primer lugar la detección de los anticuerpos contra *Brucella* sp., mediante la aplicación de la prueba tamiz anillo en leche a un total de 15 muestras de leche cruda, procedentes de cantaras de ordeño que abarcaban un total de 109 animales. Se utilizaron dos antígenos comerciales, un antígeno de producción venezolana donde el resultado fue de 40% (n=2) resulto positivo, el 6.66% (n=1) resultaron ser sospechosos (++) mientras que el resto (n=8) que representan el 53.33% resultaron ser negativos (ver Tabla 1). Sin embargo el antígeno mexicano arrojó 60% (n=9) muestras positivas, el 26.66% (n=4) resultaron ser sospechosas y un 13.33% (n=2) resultaron ser negativas (ver Tabla 2). Esto nos indica que la sensibilidad del antígeno mexicano es mayor; que el venezolano, ya que detecta los casos sospechosos según los diferentes criterios (16,17).

Tabla 1. Porcentaje de positividad según la PAL con antígeno venezolano aplicado a muestras de leche procedentes de fincas del sector el Dos de Socopó Estado Barinas.

Muestra de Leche Cruda	No.	%
Negativas	8	53.33
Sospechosas	1	6.66
Positivas	6	40
Totales	15	100

Tabla 2. Porcentaje de positividad según la PAL con antígeno mexicano aplicado a muestras de leche procedentes de fincas del sector el Dos de Socopó Estado Barinas.

Muestra de Leche Cruda	No.	%
Negativas	2	13.33
Sospechosas	4	26.66
Positivas	9	60
Totales	15	100

En relación al aislamiento e identificación del género *Brucella* sp. se realizó a partir de las muestras que resultaron positivas (n=9), y sospechosas (n=4) a la prueba del anillo en leche mexicano, las cuales se sembraron en agar *Brucella* con atmósfera modificada en CO₂. De las trece muestras procesadas, 5 arrojaron una caracterización de cocobacilos y bacilos gran negativos al ser sometidos a la tinción de gram y una pureza de cultivo del 100% (a partir del TSA) ya que las características de las colonias resultaron ser presuntivas al género *Brucella*.

Tabla 3. Resultado de las pruebas bioquímicas convencionales de las colonias aisladas y purificadas en el medio de cultivo del TSA, provenientes de muestras positivas para *Brucella* sp.

ID DE COLONIAS	GRAM	OXIDASA	CATALASA	O/F	KLIGER	UREA	CITRATO	MIO
2	Cocobacilos gram negativos	+	+	-/-	K/K,-	-	+	+,- ,+
7	Bacilos gram negativos	+	+	+/-	K/K,-	-	+	+,- ,+
7TS	Cocobacilos gram negativos	-	+	+/	K/A,-	-	+	+,- ,+

12TS	Bacilos gram negativos	-	+	+/	K/K-,	-	-	-, -, +
14D	Bacilos gram negativos	+	+	+/	K/K--	+	-	-, -, +
CEPA CONTROL	Cocobacilos gram negativos	+	+	+/	K/K--	+	-	-, -, +

CRITERIOS: O/F: oxidación/fermentación; +: positivo; -: negativo; KligerA/Gas, H2S; A: ácido; K: alcalino; MIO: motilidad, indol, ornitina

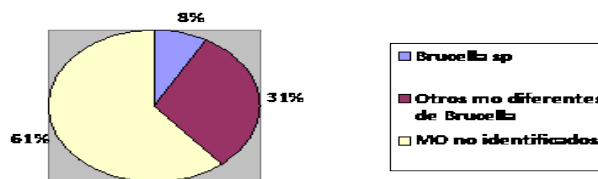
A partir de aquí se llevó a cabo la identificación de la bacteria con las pruebas bioquímicas convencionales, específicas y sistema API 20NE y 20 E, logrando de tal forma aislar e identificar para el género *Brucella* en un 8% (n=1), (Figura 1). A las pruebas específicas se evidenció que esta cepa no crece en medio con Fucsina, no aglutina en solución de acriflavina al 1%, aglutina en suero polivalente de *Brucella* sp y oxida rápidamente las tiras de acetato de plomo, características asociadas estrechamente a este género bacteriano. Hecho que no se considera extraño debido a que proviene de una zona endémica (18), Jozic y Mosquera, encontraron un 18% de prevalencia de *Brucella* sp. En animales de la sala de matanza del Municipio Antonio José de Sucre, Socopó Estado Barinas. Así mismo, Rujano (19) determinó un 12.82 % de prevalencia en el personal de matanzas y carnicerías del mismo Municipio. Lo cual pone en evidencia que existe un gran problema sanitario que está afectando al sector ganadero y la salud de las personas que habitan en la región.

Respecto a los resultados obtenidos con el sistema API 20E se logró la identificación de una de las muestras para el género *Brucella* sp., representando un 8 % (n=1), sin embargo también se identificaron otras bacterias como: *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila* y *Erwinia* sp., con un 31 % (n=4) (ver Tabla 4) (ver Figura 1), esto nos indica la deficiencia en la calidad sanitaria de la leche cruda bovina en este sector; tal vez se debió a la limpieza inadecuada del equipo de ordeño, mal lavado de tanques de almacenamiento y cantaras, utilización de aguas contaminadas, condiciones higiénicas inadecuadas y el mal estado en que se encuentran los animales. En un 61 % (n=8) destinamos la posibilidad de encontrar otros agentes patógenos que pudieran estar presentes, si consideramos realizar las pruebas bioquímicas a colonias bacterianas que no fueron incluidas por descarte (ver Figura 1).

Tabla 4. Resultado de las pruebas bioquímicas del sistema API 20NE aplicado a colonias aisladas de muestras positivas *Brucella* sp.

ID DE COLONIAS	MICROORGANISMO IDENTIFICADO	% IDENTIFICACIÓN
2	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.9
7	<i>Aeromonas hydrophila</i>	65.2
7TS	<i>Enterobacter colacae</i>	59.2
12TS	<i>Erwinia</i> sp	78
14D	<i>Brucella</i> sp	90
CEPA CONTROL	<i>Brucella</i> sp	99.2

Figura 1. Porcentaje de aislamiento e identificación de *Brucella* sp, en muestras de leche positivas



En México desarrollaron un estudio bacteriológico y sexológico de un brote de epididimitis por *Brucella ovis* sobre un rebaño de 162 borregos logrando aislar e identificar la bacteria en 6 de ellos utilizando el sistema de identificación API 20E, concordando de igual manera en la totalidad de las pruebas bioquímicas

con este sistema (20), esto nos permite afirmar que este sistema puede ser confiable siempre y cuando se tenga un buen aislamiento de colonias puras y aplicación de pruebas adicionales necesarias.

Conclusiones

Se evidenció la presencia de anticuerpos anti *Brucella* sp. En muestras de leche cruda, en los rebaños lecheros del sector E I Dos de Socopó estado de Barinas. Se logró determinar la presencia de *Brucella* sp. A partir del aislamiento e identificación por pruebas convencionales, el cual representó un 8 % (n=1) de un total de 13 muestras de leche cruda consideradas positivas y sospechosas a la prueba del anillo en leche. La aplicación del sistema de identificación API 20E, arrojó la identificación de una colonia que pertenece al género *Brucella*. Se logró identificar en leche cruda otras bacterias como: *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Aeromonas hydrophila* y *Erwinia* sp. Lo que nos indica que existe una baja calidad sanitaria en la leche cruda proveniente de este sector.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al CDCHT_ULA por el apoyo financiero recibido para la realización de esta investigación a través del proyecto bajo el código FA 447 09 03 F Venezuela.

Resumen

La brucelosis es una enfermedad transmitida al ser humano; a través del contacto con los animales o consumo de productos lácteos sin pasteurizar. Es producida por una bacteria que pertenece al género *Brucella*. En el hombre la enfermedad causa problemas de salud y socioeconómicos; el riesgo de infección es mayor cuando existen deficientes hábitos sanitarios en la fabricación de productos lácteos y sus derivados provenientes de sitios que no cuentan con los debidos permisos sanitarios. Es por ello; que el presente trabajo de investigación tuvo como finalidad determinar la presencia de *Brucella* sp.; en leche cruda proveniente de rebaños lecheros ubicados en el sector El Dos de Socopó; Estado Barinas; mediante el aislamiento en agar *Brucella*. La identificación de las colonias aisladas se llevó a cabo por medio de pruebas bioquímicas estandarizadas para género *Brucella* y comparado con el sistema API 20 NE. Los resultados arrojaron el aislamiento e identificación de una cepa del género *Brucella* sp.; en una de las colonias representando el 8% de los aislamientos bacterianos. Esto nos permite concluir que la bacteria está presente en las fincas lecheras de esta región. Se sugiere a las autoridades competentes tomar medidas adecuadas de prevención y control en esta zoonosis.

Palabras claves: Brucella; aislamiento; rebaño lechero.

Abstract

Brucellosis is an important disease transmitted to human; through no pasteurized dairy products. This pathology is caused by the genus *Brucella*. In humans, causes health and socioeconomic problems; the infection risk is high when sanitary status in the dairy industry is low; usually in crafts factories without sanitary license. For this reason; the present investigation; has how initial objective to found antibodies against *Brucella* sp.; in raw milk samples from El Dos town in Socopo County of Barinas State; by isolation in *Brucella* medium. Then; we were identifying by bacteriological methods described for *Brucella* and the API 20 NE system. The final results found a *Brucella* strain; it has been 8% of the isolates colonies. We has concluded that *Brucella* has been present in the dairy farms in this area; and recommend to official authorities that is necessary a efficient control and eradication plan in this zoonosis.

Key words: Brucella; isolation; dairy farms.

Referencias

1. Baldwin, C, 2002. Immune response overview. *Veterinary Microbiology*. 90:365-366
2. Gorvel, J and E Moreno 2002. *Brucella* intracellular life: from invasion to intracellular replication. *Veterinary Microbiology*. 90:281-297

3. Clavijo, M 1992. Efectos de las políticas gubernamentales sobre la calidad de la leche. 1er Seminario sobre Producción de Leche de Calidad. Estación Experimental San Nicolás Guanare. Universidad Central de Venezuela-Fundación INLACA 26 pp
4. Vargas, T 2000. Calidad de leche: visión de la industria láctea. X Congreso Venezolano de Zootecnia. Guanare. Volumen de Memorias de Conferencias. 297-302 pp
5. *Idem.*
6. Schuring, G 1999. Erradicación de la brucelosis y características principales de la vacuna *Brucella abortus* cepa RB51. Memorias de Simposio Internacional de Brucelosis. Maracay, Venezuela. 27-42 pp
7. Servicio Autónomo de Sanidad Animal (SASA) 2007. Resultados del programa de control de brucelosis bovina. 2006. Caracas, Venezuela.
8. Oficina Internacional de Epizootias 2006. Brucelosis Bovina. En Manual de Normas para Pruebas de Diagnóstico y Vacunas. Enfermedades de la lista B. OIE, Paris, Francia.
9. *Idem.*
10. Gobierno en Línea 2009. Estado de Barinas. http://www.gobiernoenlinea.ve/.../perfil_barinas.html
11. Málaga, H 1990. Epidemiología veterinaria. Universidad del Zulia. Editorial de la Universidad del Zulia. 159-186.
12. Alton, G., L. Jones, R. Angus and J. Verger 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. INRA París. 65 pp
13. *Idem.*
14. *Idem.*
15. Hernández, S. 1995. Avances de la bacteriología médica el sistema API. Rev Med Hondureña 63(2): 79-80
16. García, C. 1982. Pruebas suplementarias para el diagnostico de la brucelosis. OPS 60-69 pp
17. Alton, G., *et al*, *Op. cit*
18. Jozic, B y O Mozquera 2004. Prevalencia de Brucelosis Humana en el personal de riesgo y Brucelosis Bovina en la sala de matanza Ticoporo del Municipio Antonio de José de Sucre, Barinas, Venezuela. Tesis de grado. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto. Estado de Lara, Venezuela
19. Rujano, N 2007. Determinación de *Brucella* sp en el personal de la sala de matanza y carnicerías del Municipio de Antonio de José de Sucre, Barinas, Venezuela. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Barinas Venezuela. Tesis de grado. Facultad de Ciencias, ULA.
20. Hernández, L, E Herrera y F Aguilar 2002. Estudio bacteriológico y serológico de un brote de epididimitis por *Brucella ovis*. CENID-Microbiología INIFAP-SAGARPA. Laboratorio de Bacteriología, México.