DESARROLLO DE UN MEDIO SELECTIVO COMUN PARA *B. abortus*. *B. melitensis* Y *B. ovis*.

C. Mª Marín, J. Alabart, P. Boya, MªP. Jiménez de Bagués, J. Mª Blasco.
Unidad de Sanidad Animal. S.I.A./D.G.A. Apartado 727. 50.080 Zaragoza

Introducción y objetivo.

La mayoría de las cepas de *Brucella* pueden cultivarse en medios basales comunes, pero, la utilización de medios selectivos para el aislamiento de muestras contaminadas, tales como escobillones vaginales, leche o tejidos animales, es casi indispensable (Alton y col. 1988). Los medios selectivos más utilizados son el de Farrell (1974) y Thayer-Martin modificado (Brown y col. 1971). El medio de Farrell fue ideado para el diagnóstico bacteriológico de *B. abortus* (incluso de las cepas más exigentes de la biovariedad 2) y es un medio constituido por agar dextrosa suero como componente basal, un 5 % de suero de ternera estéril y los siguientes antibióticos: 5 mg de Acido Nalidíxico, 25.000 U.I. de Bacitracina, 100 mg de Cicloheximida, 5.000 U.I. de Polymixina B, 20 mg. Vancomicina y 100.000 U.I. de Nistatina . EL medio de Thayer-Martin modificado se desarrolló para el aislamiento de *B. ovis*, y esta constituido por GC (Gonococcus medium base), un 1 % de hemoglobina y los siguientes antibióticos: 3 mg de Vancomicina, 7.5 mg. de Colistina, 12.500 U.I. de Nistatina y 10 mg de Nitrofurantoína. Este último medio realmente es semiselectivo, contaminándose con relativa facilidad, sobre todo con hongos.

Resultados preliminares (Molina y col. 1993) han demostrado que el medio de Farrell es capaz de inhibir el crecimiento de algunas cepas de *B. melitensis*.. En un estudio más reciente (Marín y col. 1993), se ha determinado que el Acido Nalidíxico, a las concentraciones usadas en el medio de Farrell no permite el crecimiento de todas las cepas de *B. abortus*, además, la Bacitracina inhibe el crecimiento de *B. ovis* y reduce significativamente el número de *B. melitensis*..

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un medio selectivo para el diagnóstico bacteriológico común de las infecciones por *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. ovis* .

Material y Metodos.

Experimento 1: Comparación de 14 medios basales.

Trece medios comerciales deshidratados y el medio de Plommet (Plommet 1992) se compararon para el cultivo de 30 cepas de *B. abortus*, 30 *B. melitensis* y 30 *B. ovis* aisladas y tipificadas en nuestro laboratorio. Los 13 medios fueron: 3 Bacto Blood Agar Base (Difco, Difco Nº2 y Biolife), 3 Agar Tripticasa Soja (Difco, Biomerieux y Biokar), 4 Brucella Medium Base (Oxoid, Difco, Biomerieux y Merck), un Agar Triptosa (Difco) y 2 GC medium Base (Difco y Biolife). Estos medios se prepararon según las indicaciones de los fabricantes y para el cultivo de *B. ovis* se adicionó un 5 % de suero a todos los medios.

De todas las cepas, se prepararon espectrofotométricamente suspensiones bacterianas frescas con 10^9 organismos/ml (0,165 de absorbancia a 600 nm) y se realizaron diluciones decimales en PBS, sembrando por triplicado, inóculos de 25 μl de las diluciones 10^{-6} y 10^{-5} en cada medio. Las placas se incubaron a 37 ^{o}C en atmósfera que contenía un 10 % de CO_2 durante 5 dias, contándose el número de colonias crecidas (U.F.C.) por cada inóculo y determinándose el tamaño de las colonias con regla milimetrada.

El efecto del medio de cultivo en el crecimento de las diferentes cepas se estudió mediante un ANOVA usando el procedimiento de VARCOMP (SAS, 1986). Para cada especie, se analizó un modelo fijo que incluyó el efecto medio, el efecto cepa y su interacción. La comparación de medias se realizó por el test de comparación múltiple de Schefte.

Experimento 2: Comparación de 12 medios con diferentes antibióticos.

Para detectar las posibles variaciones en el número de microorganismos viables, se utilizaron los siguientes medios:

1. El medio Farrell comercial (con Brucella medium base, suero de ternera esteril y suplemento selectivo Oxoid para el aislamiento de Brucella).
2. El medio Thayer-Martin modificado comercial (con GC medium base Difco, Hemoglobina, nitrofurantoína Sigma y el suplemento selectivo VCN Biolife).
3. El medio GC de Biolife con un 5 % de suero de ternera estéril (era el medio control con suero y sin antibióticos).
4. El medio GC de Biolife con un 1% de Hemoglobina Difco (era el medio control con hemoglobina y sin antibióticos).

5. El medio 3 con los inhibidores del medio de Farrell.
6. El medio 4 con los inhibidores del medio de Farrell.
7. El medio 3 con los inhibidores del medio de Thayer-Martin modificado.
8. El medio 4 con los inhibidores del medio de Thayer-Martin modificado.
9. El medio 3 con los inhibidores del medio de Farrell menos el Acido Nalidíxico y la Bacitracina.
10. El medio 4 con los inhibidores del medio de Farrell menos el Acido Nalidíxico y la Bacitracina.
11. El medio 3 con los inhibidores del medio de Thayer-Martin modificado y 100 mg. de Cicloheximida por litro de medio.
12. El medio 4 con los inhibidores del medio de Thayer-Martin modificado y 100 mg. de Cicloheximida por litro de medio.

La preparación de los inóculos, la siembra, recuentos y análisis estadísticos se realizaron de igual forma que en el experimento anterior.

Resultados y discusión.

Los resultados del Experimento 1 se exponen en la Tabla 1. En este caso, obtuvimos un efecto cepa ($p<0,001$) muy importante en las tres especies testadas, lo que ha dificultado la elección de un medio ideal. Todos los medios basales comparados permitieron el crecimiento de un número similar de UFC tanto para *B. abortus* como *B. melitensis* ($p>0,1$;NS). Por el contrario, en el caso de *B. ovis*, se encontraron diferencias muy significativas ($p<0,001$) entre los crecimientos obtenidos en los diferentes medios. El medio de Plommet, permitió el aislamiento de un número de UFC de *B. ovis*, significativamente superior al obtenido en los demas medios comparados. Sin embargo, el tamaño de las colonias obtenidas en este medio fue mucho mas pequeño (inferior a 0,5 mm) al que se obtuvo en los restantes medios en el mismo tiempo de incubación (tamaño siempre superior a 1 mm). El segundo mejor medio fue el GC medium base de Biolife, que permitió el aislamiento de un número de UFC significativamente superior al obtenido con esta especie en la mayor parte de medios testados, obteniéndose ademas un tamaño colonial superior al resto (superior a 1,5 mm), por lo que fue seleccionado para el Experimento 2.

Los resultados del Experimento 2 se exponen en la Tabla 2. El análisis de varianza determinó la existencia de diferencias muy significativas ($p<0,001$) entre los crecimientos obtenidos en los diferentes medios en las tres especies estudiadas pero, al igual que en el experimento anterior, se obtuvo un efecto cepa muy importante ($p<0,001$) en las tres especies testadas, lo que imposibilita la elección de un determinado medio como ideal. Esta gran variabilidad en el comportamiento de las cepas de *Brucella* fue puesta en evidencia hace mucho tiempo en estudios similares (Rode y col. 1950), limitando extraordinariamente la selección de los medios basales para *Brucella*. Teniendo presentes los resultados de ambos experimentos, para el eventual desarrollo de un medio de aislamiento común para las tres especies, recomendariamos el uso de los medios 8 y 10 del experimento 2. En consecuencia, corroboramos la idea de otros (Painter y col. 1966, Farrell y Robertson, 1972) en el sentido que para el diagnóstico bacteriológico de *Brucella* es aconsejable el uso combinado de al menos dos medios selectivos.

Referencias:

Alton G.G., Jones L.M., Angus R.D. , Verger J.M. 1988 En: *Techniques for the brucellosis laboratory.* INRA.ISBN 2-7380-0042-8.

Brown G.M., Ranger C.R., Kelley D.J. 1971. *The Cornell Vet.*, 61, 2, 265-280.

Farrell I.D. 1974. *Res. Vet. Sci.* 16, 280-286

Farrell I.D. y Robertson L. 1972. J. App. Bact. 35, 625-630.

Marín C.M., Albizu, I., Blasco J.M. 1993. *Proceedings of Third International Sheep Veterinary Conference. 27th June-1st July 1993.Edinburgh.* 114

Molina L. Hernandez A., Marín C.M., Jimenez de Bagüés M.P., Barberan M., Blasco J.M. 1993. *ITEA.* Vol. Extra 12- Tomo II, 539-541.

Painter G.M., Deyoe B.J., Lambert G.1966. *Can. J. Com. Med. Vet. Sci.* 30, 218-223.

Plommet M. 1992. *Zbl. Bakt.* 275, 436-450.

Rode L.J., Oglesby G., Schuhardt V.T. 1950. *J. Bact.* 60, 660-668.

Sas Institute Inc. 1988. SAS/STAT. En: *User's Guide, Release 6.03 Edition.Cary, NC, USA,* 1028pp.

Tabla 1. Medias y desviaciones stándard del número de colonias obtenido con 30 cepas de *B. abortus*, 30 cepas de *B. melitensis* y 30 de *B. ovis* en los 14 medios basales estudiados.

Medio	Media ± desv. std. *B. abortus*	*B. melitensis*	*B. ovis**
BAB-D1	18.61 ± 5.18	24.29 ± 9.23	8.79 ±5.90
BAB-D2	18.15 ± 5.88	23.94 ± 8.92	9.60 ± 5.63
BAB-B	17.93 ± 6.18	22.76 ± 8.62	9.26 ± 4.75
TSA-D	19.10 ± 5.60	22.82 ± 8.20	9.68 ± 4.72
TSA-M	18.43 ± 5.63	24.32 ± 9.13	10.20 ± 5.29
TSA-BK	17.56 ± 5.73	24.60 ± 9.25	10.48 ± 3.68
Br-O	18.03 ± 5.41	24.33 ± 9.92	7.34 ± 4.93
Br-D	18.50 ± 5.78	23.52 ± 9.61	9.08 ± 4.23
Br-M	18.46 ± 6.70	23.34 ± 9.48	9.60 ± 5.36
Br-Mk	18.09 ± 5.29	23.37 ± 9.05	8.46 ± 5.50
AT-D	17.69 ± 6.07	24.50 ± 8.57	6.29 ± 4.54
GC-B	17.88 ± 5.04	24.53 ± 8.93	10.78 ± 5.16
GC-D	17.78 ± 5.93	21.13 ± 8.72	9.68 ± 5.31
Plommet	17.48 ± 5.65	24.87 ± 10.31	12.92 ± 4.62

* Los medios usados para *B. ovis* estaban adicionados con un 5% de suero.

Tabla 2. Medias y desviaciones estándard del número de colonias obtenidas con 30 cepas de *Brucella abortus*, 30 de *Brucella melitensis* y 30 de *Brucella ovis*. en 12 medios con diferentes antibióticos.

Medio	Media ± desv. std. *B. abortus*	*B. melitensis*	*B. ovis*
1	18.46 ± 6.69	25.20 ± 8.06	NC
2	18.08 ± 7.07	26.71 ± 9.29	13.11 ± 8.80
3	17.84 ± 6.10	25.09 ± 7.18	11.23 ± 6.63
4	18.36 ± 6.03	26.00 ± 8.23	12.67 ± 9.53
5	17.85 ± 6.18	19.87 ±11.05[b]	NC
6	17.31 ± 6.03	26.30 ± 9.16	NC
7	14.54 ± 8.64[a]	24.66 ± 8.86	11.36 ± 6.65
8	16.47 ± 8.53	27.50 ± 8.67	11.60 ± 6.88
9	18.14 ± 6.46	26.37 ± 7.25	11.42 ± 7.14
10	18.52 ± 6.80	26.78 ± 8.81	11.28 ± 6.69
11	14.38 ± 7.54[a]	23. 83 ± 9.91	11.20 ± 7.09
12	14.90 ± 7.31[a]	26.03 ± 7.84	11.76 ± 7.25

a = medios proporcionando resultados significativamente inferiores al resto, para *B. abortus*. ;
b = medio proporcionando resultados significativamente inferiores al resto, para *B. melitensis*.;
NC= no crecimiento de *B. ovis* en los correspondientes medios.