EL SINDROME BIOLOGICO DE LA BRUCELLOSIS Y LA IMPORTANCIA DIAGNOSTICA DEL HEMOCULTIVO

FELIPE LLANOS DIEZ

Departamento de Sueros y Vacunas del Instituto Nacional de Higiene y S. P., Lima.

Se sabe que el Diagnóstico de la Fiebre Malta es esencialmente biológico. En efecto, el Diagnóstico se hace sólo "Probable", por el cuadro clínico, hemograma y antecedentes epidemiológicos (Residencia, oficio e ingestión de leche cruda y derivados, etc.) y se hace "Cierto" ante las pruebas biológicas positivas: Hemocultivo, Sero-aglutinación, Intra-dermo-reacción, Índice Oponocitofágico y Desviación del Complemento; constituyendo todas ellas el Síndrome Biológico de la enfermedad. En conjunto, estos exámenes se complementan exhaustivamente, permitiendo sentar o descartar con absoluta seguridad el diagnóstico, pero considerados aisladamente es sólo el hemocultivo, cuando es positivo, el único capaz de señalar la enfermedad con extraordinaria certeza, ya que en él se visualiza microscópicamente el propio agente etiológico del mal, siendo así, además de su precocidad, el examen más específico de todos. Desgraciadamente su importancia es puesta cada vez más al margen, por considerársele un procedimiento moroso, de resultados inconstantes y dignos de poca confianza; a tal punto, que el clínico que sospecha una Brucellosis pide preferentemente una aglutinación antes que un hemocultivo. Y en cierto modo, no faltan razones que explican tal proceder, porque efectivamente la prueba es de tardíos resultados y no es infrecuente que el hemocultivo resulte indefinidamente negativo, o positivo a gérmenes de contaminación, mientras que el enfermo es un maltoso clínica y serológicamente.

Pero estos inconvenientes son obviables. Es sabido que una de las características culturales de las Brucellas, en aislamiento, es su lento desarrollo: 10, 15, 20 días o más. Pero nosotros hemos constatado que tan perezosa proliferación se debe a los medios de cultivo empleados, mu-

chas veces un caldo simple, y a las deficientes técnicas de incubación. Con tal fin hemos ensayado los medios más eugenésicos que se conocen e inclusive damos a conocer algunos modificados por nosotros, con los cuales hemos obtenido excelentes resultados. De la misma manera damos algunos consejos técnicos, frutos de la experiencia, sobre la forma cómo se debe extraer y proteger la muestra de la contaminación. Y finalmente señalamos que para obtener una eficiente incubación debe trabajarse necesariamente tanto en atmósfera corriente como en atmósfera carbónica, por las necesidades de CO₂ que requiere la *Brucella abortus* para su mejor desarrollo; y esto último no es una novedad, pero, sin embargo, raramente se hace.

Pero antes, hagamos una breve crítica y valuación de las pruebas que hemos enumerado, exámenes biológicos que el laboratorio utiliza en el diagnóstico de la Fiebre Malta.

El *hemocultivo*, es la prueba más conspicua e importante. Así, cuando el hemocultivo, al igual que los cultivos de leche, orina, heces, bilis, líquido sinovial y tejidos, resulta positivo basta por sí solo para hacer un correcto y definitivo diagnóstico de la enfermedad. Pero su indiscutible importancia es solamente válida en las formas agudas de la dolencia, pues en las crónicas los resultados son ya inestables. Y efectivamente, en los cuadros de evolución crónica, de más de tres o cuatro meses, hemos podido comprobar un desarrollo manifiestamente más lento que en los agudos y en más de un 50 % de los casos resultaron reiteradamente negativos, a pesar de haberse trabajado con medios comprobadamente eugenésicos y cada vez con mayor cuidado, si esto hubiera sido posible. Parece, y probablemente así sucede, que en las formas clínicas de larga duración en las que se va ya estableciendo una inmunidad más o menos estable, los gérmenes sufren una inhibición en su virulencia y reproducción, la que conservarían aún aislados en los medios culturales; fenómeno que se debería a una modificación regresiva del equipo enzimático bacteriano, lo que no permitiría a los micro-organismos metabolizar las mismas sustancias nutritivas como lo hacían en las formas agudas de la enfermedad. Luego, un hemocultivo negativo en una Brucellosis de larga duración, no descarta la posibilidad de infección, y la interpretación correlativa de las demás pruebas tienen mucho más valor diagnóstico que él.

La *Sero-aglutinación* o Prueba de Wright-Huddleson, debe ser justipreciada con mucha cautela y siempre en correlación con los demás exámenes. En efecto, no es una prueba específica, así puede ser de tardía

aparición o no aparecer en el curso de toda la enfermedad, y contrariamente puede ser positiva en infecciones que no son brucelares, tal como sucede en algunas formas de Tuberculosis, en el Paludismo, Tifoidea, Kala-zaar y especialmente en el Tifus Exantemático. Así NICOLLE y COMPTE han hecho el diagnóstico serológico de Tifus utilizando una cepa pura de *Brucella mellintensis*. Por otra parte, NEGRE, RAYNAUD, MANCEREAUX y otros se refieren a las Aglutinaciones de Grupo, en las que algunas razas de *Brucella mellintensis* son aglutinables por sueros normales. De la misma manera, en los animales, la sero-aglutinación negativa no descarta la enfermedad, ya que se han encontrado lactocultivos positivos en cabras y vacas que persistentemente acusaban sero-aglutinaciones negativas. Finalmente, en la interpretación correcta de esta prueba es imprescindible averiguar si el enfermo padece de una enfermedad alérgica, si fué recientemente vacunado contra la Tifoidea o si fué sometido antes a la intradermo-reacción específica; factores que de hecho restan toda la importancia que el examen de aglutinación pueda tener, y más aún si la tasa de aglutinación es inferior a 1/150.

La Intradermo-reacción, de BURNET, similar a la Prueba de Mantoux en el diagnóstico de la Tuberculosis, se basa como ésta en la alergia o hipersensibilidad que provocan las brucellas en el organismo. La valoración de los resultados es la misma: sea que se trate de una reacción intensa o debilmente positiva. Ambas revelan que el sujeto ha sufrido en alguna época de su vida o sufre la infección brucellar. Pero una reacción dérmica positiva no es suficiente para sentar el diagnóstico de la enfermedad evidente, ni un resultado negativo faculta para descartarla; ya que hay casos en que se obtienen intradermo-reacciones nulas con hemocultivos positivos, y por otra parte son frecuentes los casos en que resulta positiva en sujetos sanos. Vemos así, que la reacción de BURNET no es digna de toda confianza, y que al igual que toda reacción biológica, tiene sus taxativas y limitaciones. En efecto, es cosa conocida que la manera de reaccionar ante una noxa, no es la misma en cada sujeto: unos responden normérgicamente, otros alérgicamente y algunos anérgicamente, según la capacidad particular de cada organismo en el reajuste del complejo mecanismo de defensa general.

El Índice opsonocitofágico, investiga la acción de los anticuerpos opsonicos sobre los gérmenes, a través del grado fagocitario de los leucocitos, estableciendo una relación directa entre la intensidad de fagocitosis y la resistencia del enfermo a la infección, es decir: a mayor fagoci-

tos mayor defensa y a menor fagocitosis menor defensa. Sobre la importancia de este procedimiento diagnóstico hay muchas discrepancias. Pero no hay duda que auxilia en el conocimiento de la enfermedad y permite formarse un justo criterio acerca del pronóstico, ya que gradúa el estado de las defensas del sujeto, durante la evolución de la dolencia; y por ende controla los efectos del tratamiento instaurado, de la vacunación en especial. La prueba no debe interpretarse como positiva o negativa, sino como indicación de una resistencia nula, débil, moderada o alta. Pero esto dentro de las limitaciones de toda prueba biológica; así ROBINSON informó de un enfermo con hemocultivo positivo y un 100 % de glóbulos con marcada fagocitosis y que, sin embargo, murió de brucelosis.

La *Desviación del complemento*, similar a la reacción de Wassermann, es raramente empleada en la práctica. En ella se investiga en el suero del enfermo la presencia de un anticuerpo específico, gracias a la orientación que toma el complemento en presencia del antígeno brucellar. Los resultados son de un 89 % de positividad en los casos activos y de un 64 % en los casos curados. La prueba no es pues del todo segura, lo que sumado a las dificultades técnicas de un delicado examen, la hacen en realidad muy poco usada.

Entre los medios ensayados en el hemocultivo hemos utilizado todos los conocidos, haciendo una serie de modificaciones cualitativas, cuantitativas, de pH, de incubación, etc., etc. Lento y largo trabajo, tendiente a encontrar el medio cultural más eugenésico que haga del examen de sangre, tal como lo hemos expuesto, una prueba pronta y segura y suficiente por sí sola para hacer el diagnóstico de la Fiebre Malta. Nos parece haber logrado tal finalidad. Y es por esto que publicamos el presente trabajo, sin más pretensión que poner en manos del laboratorista un medio de cultivo en el cual el desarrollo de la *Brucella mellitensis* se hace entre los tres y seis días y entre los dos y tres para la *Brucella abortus* en su ambiente carbónico. Todas las muestras que hemos empleado han sido de sangre procedente de pacientes de hospitales, la cual fué sembrada en varios medios a la vez, con el fin de hacer el estudio comparativo de la bondad de cada uno de ellos. En algunos casos hemos repetido el hemocultivo reiteradamente, siendo los resultados bacteriológicos siempre los mismos.

Los *medios culturales*, con los que hemos experimentado son el de Stafseth, Caldo Bacto Tryptose, Leche Tryptose Cristal Violeta, Caldo

Infusión de Hígado Hidroamin, Caldo Infusión de Hígado Acido Nicotínico, Caldo Infusión de Hígado Jugo de Tomate y Zanahoria, Medio de Haupt, Agar Infusión Hígado, Bactotryptose Agar, Agar Infusión Hígado Extracto de papa Glicerinado, Medio de Brucetini, Bacto Tryptose Caseinato de Sodio, y otros muchos más. Entre éstos, realmente el mejor de todos es el de Stanfseth, y nosotros, hemos encontrado sembrando comparativamente, que su rendimiento es óptimo si se glicerina al 2.5 % y se le adiciona extracto de papa preparado en la forma que veremos más adelante. Este medio es el más completo y nutritivo que hemos encontrado en el aislamiento y cultivo de las Brucellas, no sólo para el hemocultivo sino en el diagnóstico diferencial de especie, en cuyo caso se le solidifica con agar al 2.5 %, siendo las pruebas de sulfhidrogénesis y cromobacteriostasis de resultados siempre constantes y francamente visibles. Y al respecto, diremos que en sentido bacteriológico estricto, el hemocultivo es una prueba incompleta si se ignora qué especie de Brucella lo hizo positivo, y esto no tiene sólo una mera curiosidad bacteriológica, sino muy al contrario, su importancia es trascendental en Epidemiología y profilaxis, porque indica cuáles son los posibles reservorios del micro-organismo y cuál es la especie de Brucella más frecuente en el medio infectado. Veamos ahora, cómo preparamos y qué cuidados es necesario tener en la obtención del medio que nos ocupa.

El *Medio de Infusión Hígado Extracto de Papa Glicerinado*, se prepara en la siguiente forma: Triturar bien en un mortero estéril hígado fresco de buey. Tomar 500 grs. de esta papilla y agregarle 500 cc. de agua de pozo artesiano. Agitar convenientemente y dejar en reposo unas tres horas. Hacer hervir lentamente la mezcla por dos horas en el baño maría agitándola constantemente; es mejor aún si no se llega precisamente a la ebullición, manteniéndola a 90-95°C., moviéndola suavemente, pues en esta forma los productos hepáticos conservan mejor su actividad. Filtrar en caliente, primeramente por tamiz y después por algodón, empleando todo el material estéril. En esta forma queda lista la infusión de hígado. Esterilizarla en frío. Hacer control de esterilidad y guardarla en la nevera. Para el extracto de papa glicerinado procedemos así: Escoger dos papas grandes, pelarlas y cortarlas en tirillas delgadas; pesar 60 grs. y ponerlos en 120 cc. de agua destilada, llevarlos al autoclave a media atmósfera por 30 minutos. Enfriar y exprimir a través de un lienzo, completando después el volumen a 500 cc. con agua destinalada. Guardar en la nevera por 24 horas y ajustar el pH a 6.8. Agregar a esta papilla 1.000 cc. de suero fisiológico al 6 por mil. Esterilizar a una atmósfera

por 20 minutos. Enfriar y adicionar 60 cc. de glicerina neutra estéril. Hacer el control de esterilidad y guardar en la nevera hasta el momento de uso. Finalmente se hace la mezcla siguiente:

Infusión de hígado	500	grs.
Agua de pozo	500	..
Bacto peptona	10	..
Cloruro de Sodio	6	..
Extracto de papa glicerinado	100	..

pH: 6.6

Autoclave sin presión durante 20 minutos por tres veces consecutivas. Control de esterilidad. Para el medio sólido basta con agregar agar Difco al 2.5 %. Rectificar cuidadosamente el pH.

Al hacer el hemocultivo tener muy en cuenta las siguientes indicaciones: Utilizar el medio directamente de la estufa donde ha estado por 30 ó 40 minutos. El enfermo en franca pirexia. Aspirar en una jeringuilla de 10 cc., 1 cc. de una solución de citrato de sodio al 10 % para que no haya coagulación parcial de la sangre en el caldo, lo que englobaría a los gérmenes. Extraer a continuación por los procedimientos conocidos 10 cc. de sangre, pero si no se hubiera dado en vena la primera vez, de ningún modo se utilizará nuevamente la misma jeringa para buscar en otro vaso, pues la experiencia nos ha enseñado que entonces la muestra resulta casi siempre contaminada. Sacar con sumo cuidado la aguja antes de inyectar la sangre en el balón de cultivo. La operación se realizará con el auxilio de una lamparilla de alcohol, como es natural, teniendo muy presente que el medio es fácilmente contaminable aún al hablar. De los 10 cc. de sangre extraídos, se sembrarán 5 cc. en dos balones con medio para cultivarlos uno en atmósfera corriente y otro en carbónica, a 37°C. A partir de las 48 horas se comenzará a chequear la muestra al microscopio depositando una gota de cada balón en un mismo porta-objetos y coloreando al Gram. Demás está insistir en la completa esterilidad que debemos guardar al realizar este diario control microscópico de la muestra. Una vez comprobada la existencia de cualquier forma sospechosa, se procederá inmediatamente a sembrar con una pipeta Pasteur, una o dos gotas de la muestra en cuatro tubos de agar-infusión hígado-extracto de papa glicerinado: dos para cultivarlos en atmósfera corriente y dos en carbónica. Comprobar la morfología bacteriana y el Gram, procediendo a sembrar en leche tornasolada, nitritos, gelatina, glucosa y en

tubos para leer sulfohidrogénesis y cromobacteriostasis. Incubar a 37°C. e ir observando las reacciones bioquímicas cada 24 horas. Finalmente, si la muestra resulta contaminada a otros gérmenes, se procederá a su aislamiento utilizando un petri con agar-infusión de hígado-extracto de papa glicerinado.

SUMARIO

a) Se pone de relieve la importancia del hemocultivo en el diagnóstico de la Fiebre Malta, haciendo una breve crítica y valoración comparativa de los diferentes exámenes biológicos utilizados con tal fin, señalando sus ventajas y desventajas.

b) Se hace una enumeración de los diferentes medios de cultivo conocidos y empleados en el hemocultivo brucellar. Y se señala uno, modificado, el más eugenésico y el que permite el más pronto desarrollo del micro-organismo.

c) Se describe la técnica de preparación de tal medio: Infusión Hígado-Extracto de papa glicerinado.

d) Se termina indicando algunos consejos prácticos sobre la forma cómo se debe extraer y proteger la muestra de la contaminación, así como del ulterior control bacteriológico de los resultados del hemocultivo.

SUMMARY

1. The importance of blood cultures in the diagnosis of Undulant Fever is emphasized, while a critical study is made of the different biological tests used in the diagnosis of this disease.

2. After discussing the culture media commonly employed to isolate *Brucella melitensis* and *B. abortus*, a new improved medium is proposed.

3. Some suggestions are made for drawing samples and keeping them free of contamination, as well as to the following bacteriological control of the blood cultures.