

RED DE LABORATORIOS DE RESPUESTA (RLR)

Procedimiento para la Identificación de *Brucella spp* en laboratorios de nivel A.

I. **Generalidades:** Los procedimientos que se describen enseguida, están diseñados para descartar o identificar presuntivamente la presencia de *Brucella spp.* a partir de muestras clínicas o cultivos aislados.

II. Precauciones

A. Estos procedimientos se deben realizar en laboratorios microbiológicos que utilizan prácticas de seguridad biológica de nivel 2 (SBN-2).

B. Si se sospecha de *Brucella spp.*:

1. Todos los trabajos se deben realizar bajo una campana de seguridad microbiológica y con el uso de guantes.
2. Dada a la naturaleza altamente infecciosa de algunas especies de *Brucella spp.* (SBN-3); se recomienda consultar con el laboratorio estatal de salud pública si se sospecha la presencia de *Brucella spp.*
3. Las muestras sospechosas de contener *Brucella spp.*, se deben etiquetar como tales.

C. Refiérase al Procedimiento para la Seguridad y Descontaminación de Laboratorio.

III. Muestra

A. Tipos de muestras aceptables

1. Sangre o médula ósea: *Brucella spp.* se aísla con mayor frecuencia de estas muestras.
2. Suero: Una muestra durante la fase aguda deberá obtenerse tan pronto como sea posible, después de iniciada la enfermedad. Una muestra de la fase convaleciente deberá tomarse después de 14 días de haber tomado la muestra de la fase aguda.
3. Hígado, bazo o abscesos: *Brucella spp.* ocasionalmente se aísla de estas fuentes. Se pueden utilizar medios selectivos de cultivo para aislar *Brucella spp.* a partir de muestras con flora mixta (ver más abajo)

B. Criterio de rechazo

1. Utilice los criterios establecidos en el laboratorio
2. Las muestras secas se deben enviar al laboratorio estatal de salud pública.
3. Las muestras ambientales y no clínicas y aquellas de eventos anunciados no son procesadas por laboratorios de nivel A; quien remita las muestras deberá contactar directamente al laboratorio estatal de salud pública.

C. Transporte y almacenamiento

1. Suero: Siga los protocolos estándares de laboratorio. Preferentemente envíe 1ml refrigerado.
2. Muestras de cultivo: Las muestras deben de inocularse en el medio de cultivo apropiado dentro de las dos primeras horas de su obtención. De no ser esto posible, las muestras se deberán refrigerar de 2-8°C hasta el momento de su inoculación. El tejido se debe mantener húmedo. Añada varias gotas de solución salina si es necesario.

Aviso de No Endoso: Los nombres comerciales o de fabricantes de productos que se mencionan en este protocolo, se proporcionan como ejemplos de fuentes de productos adecuados; su alusión no implica la recomendación de uso, sugerencia o endoso alguno por parte de ninguna de las siguientes instituciones: CDC (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los EE.UU.), el DHHS (Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU.), la Armada de los EE.UU., o el FBI (Buró Federal de Investigaciones).

IV. Materiales

A. Reactivos

1. Reactivos para tinción de Gram
2. Reactivo para oxidasa (tetrametil-p-fenilenediamina al 1%)
3. Agar urea (Christensen's)
4. Requerimientos XV (discos o tiras XV, prueba satélite u otra para diferenciar de *Haemophilus spp.*)

B. Medios de cultivo

1. Agar sangre de cordero al 5% (SBA), agar base de tripticasa de soya (TSA) o su equivalente
2. Agar chocolate (CA)
3. Agar MacConkey (MAC)
4. Agar Thayer-Martin o su equivalente
5. Botellas para cultivo en sangre

C. Materiales y equipo

1. Instrumento para cultivo en sangre (opcional)
2. Microscopio óptico con objetivos de 10X, 40X y 100X y un ocular de 10X.
3. Portaobjetos, asa desechable de inoculación con punta de anillo.

V. **Control de calidad:** Realice y documente todos los esfuerzos de control de calidad de acuerdo al procedimiento y protocolo estándar del laboratorio.

VI. **Procedimiento:** Refiérase a las figs. A1a y A1b.

A. Tinciones y frotis: Tinción de Gram

1. Procedimiento: Realice el procedimiento y el control de calidad de la tinción de Gram de acuerdo al protocolo del laboratorio.
2. Características: *Brucella spp.* Tiene una morfología característica con la tinción de Gram que es extremadamente útil para su diferenciación con otros organismos gram negativos. Las células de *Brucella spp.* aparecen como pequeños cocobacilos gram negativos. Refiérase a la fig. A2.

B. Cultivos:

1. Muestras de cultivo en sangre, médula ósea y tejidos: Procese y subcultive utilizando el protocolo estándar del laboratorio (utilizando medios tales como SBA al 5%, SA, MAC y/o Agar Thayer-Martin). Nota: El crecimiento en MAC será negativo o pobre para la mayoría de las *Brucella spp.* El medio Thayer-Martin se puede utilizar apropiadamente como medio selectivo para *Brucella spp.*
2. Incubación de cultivos:
 - a. Temperatura: 35-37°C
 - b. Atmósfera: Enriquecida con CO₂. La incubadora debe ajustarse a una humedad suficiente para prevenir la desecación de las placas de cultivo tras una incubación prolongada (más de 7 días). La humedad también se puede mantener envolviendo las placas con cinta adhesiva permeable a los gases.
 - c. Duración de la incubación
 - (1) Cultivos de sangre: Para los casos sospechosos de brucelosis por lo menos de 21 días, produciendo subcultivos ciegos cada 7 días. Seguimiento de cultivos negativos de sangre y reteniendo placas selladas por 7 días adicionales. Realice todas las manipulaciones de cultivo (por ejemplo subcultivo y frotis para tinción de Gram) utilizando guantes dentro de una campana de seguridad microbiológica.
 - (2) Cultivos primarios en placa: 7 días, haga lecturas diarias.
3. Características de la colonia: *Brucella spp.* aparecerá en colonias puntiformes después de 48 horas de incubación. Las colonias son no pigmentadas y no hemolíticas. Todas las colonias sospechosas deberán observarse mediante la tinción de Gram, así como realizar las pruebas de oxidasa y urea.

C. Pruebas bioquímicas:

1. Prueba de la oxidasa
 - a. Principio: Usado para determinar la presencia de enzimas oxidasas asociadas con los citocromos de la cadena respiratoria. El reactivo es un colorante que vira en presencia de enzimas oxidasas.
 - b. Muestra: Realizada sobre muestras de colonias en crecimiento activo (18-24 horas) obtenidas de placas de SBA o un medio equivalente
 - c. Reactivos y materiales
 - (1) Tetrametil-p-fenilenediamina (catalogo Sigma: #T7394), Nota: Es importante utilizar el reactivo en base a tetrametil, ya que el reactivo en base a dimetil puede resultar en reacciones falsas negativas.
 - (2) Combine 50 mg de polvo con 10 ml de agua destilada.
 - (3) Almacénese en gotero de frasco ámbar. La solución es estable por una semana a 2-8°C o indefinidamente cuando se congela a -20°C
 - (4) Papel filtro Whatman #1 o equivalente
 - (5) Asa de inoculación desechable con punta de anillo
 - d. Procedimiento (se puede realizar utilizando otro protocolo del laboratorio validado)
 - (1) Coloque una a dos gotas de reactivo oxidasa en un trozo de papel filtro Whatman #1
 - (2) Utilizando una asa plástica de inoculación con punta de anillo mezcle una asa completa de organismos obtenida de una placa de cultivo de 18 a 24 horas con el reactivo en el papel filtro.
 - (3) Observe que se desarrolla un color azul de ligero a oscuro durante los diez primeros segundos tras la inoculación
 - e. Características
 - (1) Resultado positivo: Desarrollo de color azul durante los 10 primeros segundos tras la inoculación.
 - (2) Resultado negativo: No se desarrolla color azul dentro de los 10 primeros segundos tras la inoculación.
 - (3) Precaución: Algunos metales de los que están hechos las asas de inoculación producen reacciones falsas positivas. Las asas hechas con alambre de Indio y platino (85% platino y 15% Indio) proveen resultados satisfactorios. Si otro tipo de asa se utiliza se debe someter a una prueba de exposición con el reactivo oxidasa sobre papel filtro.
 - f. Control de calidad:
 - (1) Cepas de control
 1. Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032 o un equivalente producirá un color azul dentro de 10 segundos.
 2. Control negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922 o equivalente NO producirá un color azul dentro de 10 segundos.
 - (2) Control del método: Realice la prueba con cultivos frescos de las cepas de control utilizando el mismo método que con las muestras problema. Las cepas de control deben de ensayarse cada día de pruebas.
 - (3) Aclarando resultados fuera del control:
Verifique los medios de cultivo, reactivos, controles y equipo; replácelos o corríjalos apropiadamente. Documente las acciones correctivas y repita la prueba.
2. Prueba de la ureasa (método de Christensen's)
 - a. Principio: Usado para determinar la capacidad de un organismo para hidrolizar la urea, formando amoniaco debido a la acción de la enzima ureasa. La presencia y la velocidad de actividad enzimática de la ureasa es útil en la diferenciación de *Brucella spp.*
 - b. Muestra: Cultivos en crecimiento activo del organismo de prueba provenientes de medios no selectivos

- c. Reactivos y materiales
- (1) Tubos prefabricados de agar inclinado de este medio se pueden obtener de fuentes comerciales (BD Bioscience; catálogo. # 221096 o 221097; o Remel; catalog. # 65210-A)
 - (2) Agar urea
 1. Solución A: Bacto-urea agar base 29 g (Difco/BD Bioscience; catálogo # 0140) (compuesto de Bacto-peptona, 1 g.; Bacto-Dextrosa 1g.; Cloruro de sodio, 5 g.; Fosfato monopotásico, 2g.; Urea [Difco/BD Bioscience], 20g.; y Bacto-fenol rojo, 0.012 g.); Agua destilada 100 ml. Mezcle para disolver y esterilícese por microfiltración.
 2. Solución B: Bacto-agar 15 g.; Agua destilada 900 ml. Esterilice la solución B en auto clave a 121°C por 15 minutos y enfríese a 50°C. Añada entonces suavemente la solución A, mezcle y deposite alícuotas de 5 ml en tubos con tapón de rosca de 15 por 125 mm y almacénense inclinados hasta solidificarse a temperatura ambiente. Guarde los tubos inclinados en refrigeración (2-8°C).
 - (3) Reloj alarma para mínimo 15 minutos.
 - (4) Asa estéril para inoculación.
- d. Procedimiento
- (1) Saque los tubos de urea de su almacenamiento en el refrigerador y permita que se equilibren térmicamente con el medio ambiente, por lo menos 30 minutos antes de montar la prueba.
 - (2) Utilizando una asa de incubación con punta de anillo, tome una asada de material bacteriano de prueba y siémbrelo sobre la superficie de los tubos inclinados de urea.
 - (3) Incube de 35-37°C en atmósfera ambiental.
 - (4) Inicie el reloj de alarma pasar 15 minutos
 - (5) Después de 15 minutos de incubación, la superficie inclinada de los tubos para identificar un cambio de color a rosa en el área inoculada. Si no se observa cambio de color alguno, vuelva a colocar el tubo en la incubadora y observe de nuevo en después de 24 horas.
- e. Características
- (1) Resultado positivo: Desarrollo de un color rosa pronunciado en el agar. Todas las *Brucella spp.* Deberá producir una reacción positiva al día siguiente.
 - (2) Resultado negativo: Ausencia de color rosa.
- f. Control de calidad
- (1) Cepas de control
 1. Control positivo: *Proteus vulgaris* ATCC8427 u otro equivalente, producirá un color rosa en 24 horas.
 2. Control negativo: *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 u otro equivalente, NO producirá color rosa en 24 horas.
 - (2) Control del método: Realice las pruebas con los cultivos frescos de las cepas de control, utilizando los mismos métodos que con las muestras problema. Las cepas control deben ensayarse en cada lote de medios de cultivo recibido.
 - (3) Aclarando resultados fuera del control: Verifique los medios de cultivo, reactivos, controles y equipo; replácelos o corríjalos apropiadamente. Documente las acciones correctivas y repita la prueba.
- g. Limitaciones del procedimiento: Otros organismos gram negativos, especialmente los biogrupos de *Bordetella bronchiseptica* y *Haemophilus influenzae*, pueden producir una reacción rápida de ureasa. La tinción Gram, el requerimiento de los factores de crecimiento X y V y la motilidad; son características útiles para descartar la presencia de estas especies. Las *Brucella spp.* son no Móviles.
3. Reactivo de catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%): Esta prueba no se recomienda si se sospecha de la presencia de *Brucella spp.* Debido a la generación de aerosoles. Esta prueba, en caso de realizarse: deberá ser dentro de una campana de seguridad microbiológica.

VII. Interpretación y reportes

A. Criterio de identificación presuntiva (refiérase a la tabla A1)

1. Morfología de las colonia en SBA: Las colonias *Brucella spp.* Son puntiformes y aparecerán a 48 horas de incubación. Las colonias son NO pigmentadas y NO hemolíticas. Todas las colonias sospechosas se deberán observar al Gram así como realizarles la prueba de urea.
2. Morfología en la tinción de Gram: La morfología con la tinción de Gram de las *Brucella spp.* es de extrema utilidad para su diferenciación de otros organismos gram negativos. Las células de *Brucella*, *aparecen como pequeños cocobacilos débilmente teñidos.*
3. Prueba de la oxidasa (modificación de Kovac) positiva.
4. Prueba de la ureasa (método de Christensen) positiva.

B. Reportes y acciones apropiadas

1. Los laboratorios de nivel A, deben consultar con el director del laboratorio estatal de salud pública (o con su representante en funciones) si el médico sospecha de la presencia de *Brucella spp.*
2. Notifique de inmediato al director del laboratorio (o a su representante en funciones) y al epidemiólogo del departamento de salud pública estatal, si no se puede descartar la presencia de *Brucella spp.* Y se sospecha de un evento bioterrorista. El laboratorio o departamento estatal de salud pública notificara a la agencia federal de investigaciones apropiadamente.
3. Inmediatamente notifique al médico y a control de infecciones de acuerdo a las políticas internas si la presencia de *Brucella spp.* no se puede descartar.
4. Conserve la muestra original en apoyo a una potencial investigación criminal y su posible transferencia a un laboratorio apropiado del tipo RLR. La agencia federal de investigaciones y el laboratorio o departamento estatal de salud pública coordinará la transferencia de cultivos aislados o muestras a un laboratorio del tipo RLR de mayor nivel apropiadamente. Inicie la documentación de la cadena de custodia si esto es apropiado.
5. Obtenga la orientación apropiada del laboratorio estatal de salud pública (por ejemplo los requerimientos de la autoridad judicial local así como los de otros oficiales gubernamentales).
6. Si la presencia de *Brucella spp.* se descarta proceda con los esfuerzos para identificarla utilizando los procedimientos establecidos.

VIII. Limitaciones

- A. La identificación de *Brucella spp.* no se debe de intentar realizar con sistemas comerciales de identificación debido a la potencial generación de aerosoles y la falta de precisión en la identificación.
- B. Para diferenciar entre *Brucella spp.* y *Haemophilus spp.* una prueba satélite se deberá realizar sembrando en placa de agar sangre y luego por estría con *Staphylococcus aureus ATTC25923.* Después de 24-48 horas de la inoculación bajo atmósfera enriquecida con CO₂, *Haemophilus spp.* deberá presentar crecimiento satélite alrededor de *S. aureus*, mientras que *Brucella spp.* no presenta este crecimiento satélite. Los discos o tiras XV son alternativas adecuadas para el cultivo de *S. aureus.*
- C. Otros organismos que pueden ser confundidos con *Brucella spp.* debido a que son ureasa positivos, incluyen a la *Oligella ureolytica* (normalmente sólo encontrada en orina) y *Psychrobacter phenylpyruvicus.* *Psychrobacter immobilis,* y *Bordetella bronchiseptica* (que presenta motilidad)

IX. Bibliografía

Bannatyne, R. M., M. C. Jackson, and Z. Memish. 1997. Rapid detection of *Brucella* bacteremia by using the BACTEC 9240 system J. Clin. Microbiol. 35:2673–2674.

Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiology and biomedical laboratories, 4th ed. U.S. Department of Health and Human Services. Stock no. 017-040-00547-4.

Ederer, G. M., J. H. Chu, and D. J. Blazevic. 1971. Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production. *Appl. Microbiol.* 21:545.

Fiori, P. L., S. Mastrandrea, P. Rappelli, and P. Cappuccinelli. 2000. Brucella abortus infection acquired in microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 38:2005–2006.

Schreckenberger, P. C., and A. von Graeventiz. 1999. Acinetobacter, Achromobacter, Alcaligenes, Moraxella, Methylobacterium, and other nonfermentative gram-negative rods. p. 539–560. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Sewell, D. L. 1995. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:389–405.

Shapiro, D. S., and J. D. Wong. 1999. Brucella, p. 625–631. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D.C.

Staszkiwicz, J., C. M. Lewis, J. Colvile, M. Zervos, and J. Band. 1991. Outbreak of Brucella melitensis among microbiology laboratory workers in a community hospital. *J. Clin. Microbiol.* 29:287–290.

Weyant, R. S., C. W. Moss, R. E. Weaver, D. G. Hollis, J. G. Jordan, E. C. Cook, and M. I. Daneshvar. 1995. Identification of unusual pathogenic gram-negative aerobic and facultatively anaerobic bacteria, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Yagupsky, P. 1999. Detection of brucellae in blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 37:3437–3442.

Yagupsky, P., N. Peled, J. Press, O. Abramson, and M. Abu-Rashid. 1997. Comparison of BACTEC 9240 Peds Plus medium and Isolator 1.5 Microbial Tube for the detection of Brucella melitensis from blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 35:1382–1384.

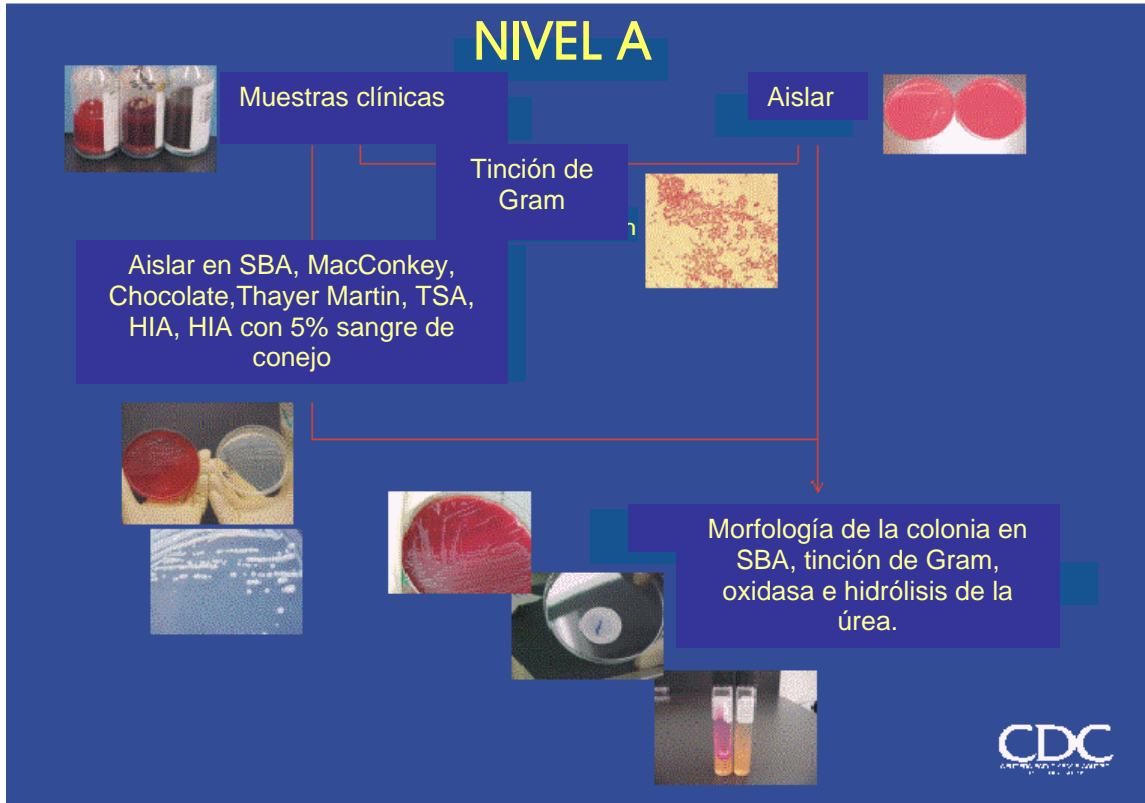


Figura A1a. Diagrama de flujo del procedimiento para aislar e identificar presuntamente a las *Brucella spp.*, en laboratorios de nivel A.

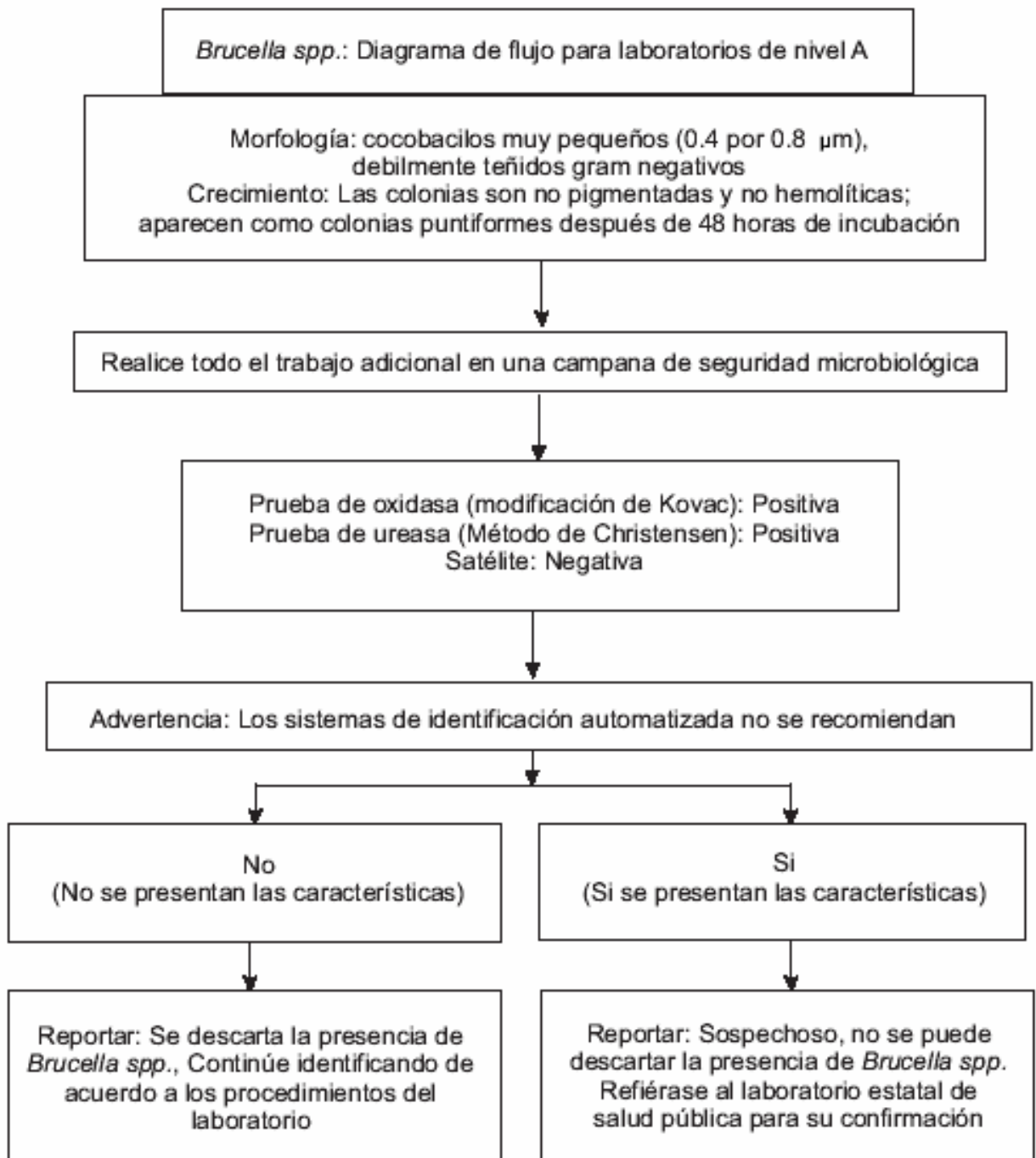


Figura A1b. Flujograma de nivel A para *Brucella spp.*

Figura A2. Tinción de Gram de cultivos puros de *Escherichia coli* (A) y *Brucella abortus* (B)

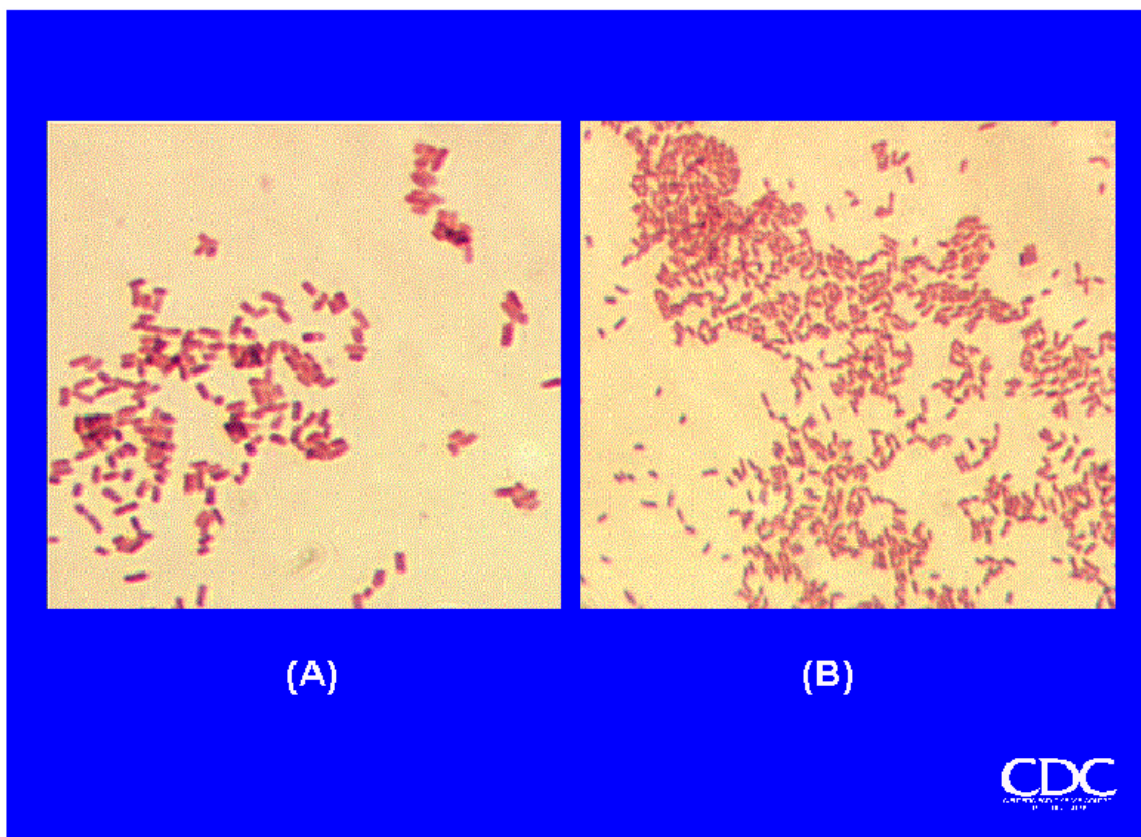


Tabla A1. Identificación presuntiva y diferenciación of *Brucella* spp., con otras bacterias gramnegativas similares.

| PRUEBA | <i>Oligella</i> ^a spp. | <i>Haemophilus influenzae</i> ^b | <i>Francisella tularensis</i> | <i>Brucella</i> spp. | <i>Acinetobacter</i> spp. | <i>Psychrobacter phenylpyruvic us</i> ^c | <i>Pasteurella</i> spp. | <i>Bordetella bronchiseptica</i> ^d |
|---------------------------------|--------------------------------------|--|-------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|--|----------------------------|---|
| Origen de la muestra | Varios | Varios | Sangre y médula ósea | Varios | Varios | Varios | Varios | Varios |
| Morfología con tinción Gram | Cocobacilos muy pequeños | Cocobacilos pequeños | Cocobacilos muy pequeños | Cocobacilos muy pequeños ^e | Cocobacilos amplios | Cocobacilos amplios | Bastones medianos | Bastones chicos a medianos |
| oxidasa | + | V | - | + ^e | - | + | + | + |
| Hidrólisis de urea ^f | + | V | - | + | V | + | V | + |

^a *Oligella* spp. Puede algunas veces ser móvil.

^b *Haemophilus* spp. Requiere de los factores de crecimientos X y/o V, mismos que los distingue de todos los géneros enlistados.

^c Anteriormente *Moraxella phenylpyruvica*

^d *B. bronchiseptica* muestra crecimiento vigoroso a 1 día de incubación; es móvil con flagelos peritricos.

^e Oxidasa: *B. abortus*, *B. melitensis*, y *B. suis* son todas oxidase positiva. Los cultivos aislados de *B. canis* pueden ser oxidase-variable.

^f Hidrólisis de la urea: la mayoría de los cultivos aislados de *Brucella* hidrolizan vigorosamente la urea. Usando la prueba de tubo de Christensen, la hidrólisis se puede observar tan pronto como a los 15 minutos de incubación con cepas de *B. suis* y a 1 día de incubación con la mayoría de las cepas de *B. abortus* y *B. melitensis*.

+ quiere decir mayor o igual a 90% positivo.

- quiere decir menor o igual a 10% positivo.

V quiere decir variable o 11-89% positivo.