

11261



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**ESTUDIOS SOBRE UN ANTIGENO POLISACARIDO
DE BRUCELLA Y ASPECTOS EPIZOOTIOLÓGICOS
DE BRUCELOSIS EN EL CHIGUIRE** (Hydrochoerus
hydrochaeris)

FALLA DE ORIGEN

**TESIS PRESENTADA
PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

Sofia Herónica Rodríguez de Ford

ASESOR: M.V.Z., Ph.D. RICARDO FLORES CASTRO

Octubre 1981

1
121
1981



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Se realizó un estudio, en dos fases, usando un antígeno polisacárido (Poli B) extraído de Brucella melitensis, cepa B115. En la primera fase el antígeno Poli B se usó en pruebas de Inmunodifusión en gel, observándose más sensibilidad en la prueba de Inmunodifusión Radial, los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos en las pruebas serológicas convencionales. Fueron probados un total de 1,369 sueros, correspondientes a 198 bovinos Holstein, de los cuales 149 eran animales vacunados adultos, con cepa 19, a dosis reducida, y 49 eran reactores positivos (testigos). Todos los bovinos fueron sangrados 9 veces, durante 7 meses. Los resultados claramente indicaron la gran utilidad del Poli B, al detectar los animales infectados de ambos grupos estudiados.

En la segunda fase, el Poli B fué utilizado en un estudio epizootiológico de brucelosis, en 201 Chigüires (Hydrochoerus hydrochaeris), de los Llanos de Apure, Venezuela. Nuevamente demostró su capacidad en detectar reactores (116). En esta fase, se aislaron 23 cepas de Brucella, 8 de Br. abortus y 15 de Br. suis, todas las cuales fueron biotipificadas, mediante las pruebas de susceptibilidad a colorantes y metabolismo oxidativo. La relación entre la distribución de edad de los Chigüires y, los resultados serológicos y bacteriológicos indicaron que esta especie es un importante reservorio de brucelosis en Venezuela.

CONTENIDO

d

PAGINA

Agradecimientos	a
Datos Biográficos	b
RESUMEN	c
Lista de Cuadros y Figuras	d
INTRODUCCION	1
I) Definición de la enfermedad	2
II) Antecedentes históricos	2
III) Importancia económica	3
IV) Características del agente etiológico	4
a) Propiedades morfológicas y de cultivo.....	4
b) Características bioquímicas	6
c) Aspectos metabólicos	9
d) Sensibilidad al bacteriófago	10
e) Homología del DNA	12
f) Características antigénicas	12
g) Variación de la pared celular	15
h) Importancia de las pruebas para la biotipificación de Brucella	15
V) Especies susceptibles	18
a) Animales domésticos	18
b) Animales silvestres	19
b.1) La infección en Chiguire	25
c) El hombre	26
VI) Patogénesis	26

	PAGINA
VII) Diagnóstico serológico	28
a) Pruebas rutinarias	32
Aglutinación en Placa	32
Aglutinación en Tubo	32
b) Pruebas complementarias	32
Mercaptoetanol	32
Rivanol	33
Tarjeta	33
Fijación de Complemento	34
Ouchterlony	34
c) Técnicas de reciente desarrollo	35
ELISA - ELA	35
Hemólisis indirecta	35
Inmunodifusión Radial con antígeno polisacárido B	35
d) Diagnóstico de inmunidad celular	36
VIII) Características del antígeno polisacárido B	39
IX) Mecanismo de inmunidad y prevención	41
OBJETIVOS	47
MATERIAL Y METODOS	49
Proyecto N°1	49
a) Producción del antígeno polisacárido B (Poli B).....	49
b) Determinación de la concentración de antígeno Poli B.....	50
c) Sueros de bovinos	51
d) Pruebas serológicas	52

	PAGINA
Proyecto N°2	53
a) Animales	53
b) Colección de muestras	53
c) Pruebas serológicas	54
d) Exámenes bacteriológicos	54
e) Determinación de la edad de los Chiguíres	67
RESULTADOS	68
Proyecto N°1	68
Proyecto N°2	72
DISCUSION	93
Proyecto N°1	93
Proyecto N°2	96
CONCLUSIONES	99
RECOMENDACIONES	100
REFERENCIAS	101

LISTA DE CUADROS

8

CUADRO	PAGINA
1. Comportamiento de tres especies del género <i>Brucella</i> en las pruebas de metabolismo oxidativo.....	11
2. Resultados de los exámenes serológicos practicados en bovinos Holstein infectados en forma natural.....	70
3. Resultados de los estudios practicados con sueros de 149 animales vacunados con 3×10^9 de <i>Br. abortus</i> cepa 19.....	73
4. Evaluación de la prueba de inmunodifusión radial y el antígeno polisacárido (Poli B) de B115 en sueros de bovinos vacunados con dosis reducida (3×10^7) de <i>Br. abortus</i> cepa 19.....	74
5. Reactores bovinos vacunados en relación a pruebas serológicas ...	75
6. Resultados de los estudios serológicos y bacteriológicos obtenidos en 201 chiguïres capturados en Apure, Venezuela.....	76
7. Características morfológicas, tintoreales y bioquímicas de las 23 cepas aisladas de chiguïres: identificadas como <i>Brucella</i>	79
8. Características de las 23 cepas de <i>Brucella</i> aisladas de chiguïre (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>).....	80
9. Caracterización metabólica de cepas de <i>Brucella</i> de identidad conflictiva con métodos bioquímicos y serológicos.....	82
10. Resultados de las pruebas realizadas para determinar las características metabólicas oxidativas de 10 cepas de <i>Brucella</i> y sus biotipos.....	85
11. Tasas oxidativas $QO_2(N)$ de 10 cepas aisladas de chiguïre sobre cuatro -minoácidos y cuatro carbohidratos.....	86
12. Distribución por edad de los chiguïres en relación al número de aislamientos de <i>Brucella</i>	88
13. Distribución por edad de reactores serológicos a <i>Brucella</i> en chiguïres.....	89
14. Distribución por especie de <i>Brucella</i> aisladas de chiguïres.....	90
15. Distribución de la población de chiguïres por resultados serológicos de Tubo, Mercaptoetanol, Rivanol e inmunodifusión en gel.....	91
16. Resumen general de los títulos serológicos en las pruebas de Tubo, Mercaptoetanol y Rivanol en la población de chiguïres.....	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Aparato de Warburg	62
2. Prueba de Ouchterlony	69
3. Prueba de Ouchterlony	69
4. El chiguire (<u>Hydrocoerus hydrochaeris</u>)	78
5. Prueba de sensibilidad a colorantes	83
6. Prueba a sensibilidad a colorantes	83

INTRODUCCION

La Brucelosis es una enfermedad ampliamente distribuida en países en desarrollo, mientras que en numerosos países desarrollados se ha logrado su erradicación o control. Uno de los principales problemas que ofrece la eliminación de esta infección en especies domésticas, es la dificultad de establecer un diagnóstico oportuno y adecuado en animales recientemente infectados, así como en aquellos que se vacunaron con cepas de Brucella - capaces de estimular la producción de anticuerpos, lo que interfiere con las pruebas serológicas de rutina.

Por otra parte se ha demostrado ampliamente, como se discute en otra sección de esta tesis, que numerosas especies de animales silvestres son susceptibles a la infección por diferentes microorganismos del género Brucella, lo que abre la posibilidad de que algunos de ellos funcionen como foco para infectar nuevos hatos de animales domésticos susceptibles.

La presente tesis se realizó en dos etapas, tendientes a obtener información sobre: a) el uso del antígeno polisacárido B, para diagnosticar brucelosis en animales mediante pruebas de inmunodifusión en gel; b) estudiar la enfermedad en los Chigüires, los cuales representan una especie silvestre sumamente difundida en Venezuela.

I) Definición

La Brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa, de curso crónico, cuyo agente causal es una bacteria perteneciente al género Brucella. Las brucelas son pequeños cocobacilos Gram negativos, aerobios, inmóviles, no esporulados. Son parásitos obligados de los animales y el hombre, siendo característica su localización intracelular (Jawetz et. al. 1979).

Todas las brucelas son capaces de originar procesos agudos y crónicos, y también una infección inaparente. La cronicidad depende de su capacidad para multiplicarse en el interior de las células fagocíticas, a la que se opone el desarrollo de procesos de inmunidad celular (Morgan, 1970).

La enfermedad en el hombre llamada Brucelosis (Fiebre ondulante, - Fiebre de Malta) está caracterizada por una fase septicémica aguda, seguida por un estadio crónico que puede prolongarse muchos años y llegar a afectar diversos tejidos (Cunningham, 1977). En sus reservorios animales domésticos y silvestres, las brucelas muestran gran tendencia a localizarse en el útero grávido (dando lugar a abortos) y en la glándula mamaria. La predilección por el tejido placentario es debido a la presencia en la placenta de un factor de crecimiento que es un poliol (Eritritol). El género comprende 6 especies patógenas para los animales y el hombre - (Davis et al, 1978 ; Stanier et al, 1977).

II) Antecedentes Históricos

Las brucelas fueron aisladas por primera vez en 1887 por Bruce a partir del bazo de humanos afectados de una enfermedad que se denominó Fiebre de Malta. Pero no fué hasta 1904 que se descubrió la fuente infectiva, en

que el germen fué cultivado a partir de leche y orina de cabras aparentemente sanas (Davis, et al, 1978). El segundo microorganismo de este grupo fué aislado en Dinamarca por Bang en 1897, a partir de ganado bovino - afectado por abortos infecciosos (enfermedad de Bang) mientras que el tercero fué cultivado en USA en 1914, a partir del feto prematuro de una hembra de cerdo (Davis, et al, 1978), y fué en 1920 que Evans llegó a la conclusión de que los tres microorganismos se hallaban estrechamente relacionados, por lo que se clasificó en un género aparte denominado Brucella (Cunningham, 1977).

Actualmente el grupo de organismos incluye: Br. abortus, Br. meli-tensis, Br. suis, Br. canis, Br. ovis y Br. neotomae, siendo una importante causa de enfermedad en animales y el hombre en todo el mundo (Alton, et al, 1975).

III) Importancia Económica

Puede considerarse que el aspecto más importante de la Brucelosis en los animales domésticos, es la repercusión económica de la misma, lo cual es válido para cualquier país que mantenga esta zoonosis. Así es que la Brucelosis ocasiona cuantiosas pérdidas a la industria pecuaria por diversos motivos: abortos, problemas reproductivos, reemplazos, disminución de la producción láctea, muertes de terneros e inclusive alteración en las líneas genéticas.

Algunos investigadores han clasificado las pérdidas que causa la Brucelosis de la siguiente manera: primero, pérdidas directas aparentes, segundo, pérdidas directas no-aparentes, y el tercero, pérdidas indirectas o consecutivas. Las primeras se refieren a las pérdidas de crías ya sean

abortos y/o mortalidad, problemas reproductivos (infertilidad), reemplazo, disminución de la producción cárnica y láctea, gastos de asistencia médico veterinario.

Las pérdidas no-aparentes involucran la depreciación de los animales enfermos, retardos en crecimiento, decremento del peso, recuperación del peso perdido, depreciación en el mercado interno y pérdidas de líneas genéticas.

Las indirectas consecutivas repercuten sobre la salud humana, por ausentismo, gastos médicos, disminución de la capacidad, y hasta mortalidad (Calcedo, 1968; Campaire y Gracia, 1968).

Todo esta trae como consecuencia repercusiones al nivel del mercado nacional e internacional.

IV) Características del Agente Etiológico

a) Propiedades morfológicas y de cultivo

Los miembros del género Brucella son organismos pequeños, cocobacilares, los cuales muestran algunas variaciones en su tamaño, que oscilan entre 0.6-2.0 micrómetros de largo y cerca de 0.3-0.5 micrómetros de diámetro. En los tejidos los organismos frecuentemente se encuentran agrupados o solos, en el laboratorio generalmente se desarrollan como cortas cadenas.

Las brucelas no son móviles, no forman esporas, y una cápsula muy pobre en variantes lisas y mucoides, ha sido descrita en cepas frescas recién aisladas (Buxton y Frasser, 1977) lo cual puede demostrarse mediante coloraciones especiales.

Los organismos se tienen como Gram negativos de color rosado y aunque no son ácido resistentes, son capaces de resistir la decoloración con ácidos débiles incluyendo ácido acético al 0.5%. Tal característica es tomada en cuenta en las técnicas de tinción diferencial en diagnósticos. Con la tinción de Köster modificada se observan las brucelas de color naranja con un fondo azul.

Algunos autores (Davis et al, 1973) señalan que las brucelas presentan cierto pleomorfismo y en algunos casos coloración bipolar.

Sobre los medios de cultivos en el laboratorio, su crecimiento es lento, especialmente al iniciarse el cultivo, por lo que las colonias no son visibles hasta 48 horas o más, incubadas a 37°C. En general las brucelas aisladas de los tejidos son del tipo liso (S), aunque Br. canis y Br. ovis solo se conocen en forma rugosa (R). Las típicas colonias lisas miden 0.5 mm de diámetro, son pequeñas, redondeadas, convexas y translúcidas, de aspecto húmedo en su superficie.

La disociación puede ocurrir particularmente sobre medios húmedos, con un pH y temperatura no óptima, observándose entonces colonias rugosas, de mayor tamaño, de color amarillento, de aspecto granular, y secas en la superficie; en medios líquidos desarrollan una ligera turbidez con un fino depósito granular, el cual se hace viscoso después de incubación prolongada. Existe una tendencia por algunas cepas a disociarse más fácilmente en medios líquidos que en sólidos.

Estos organismos se desarrollan en aerobiosis aunque, cultivos primarios de Br. abortus y Br. ovis crecen particularmente pobres y requieren una atmósfera conteniendo 5-10% de CO₂, mientras que las especies restantes, crecen bajo condiciones atmosféricas normales (Buxton y Frasser 1977).

Las brucelas están adaptadas a un habitat intracelular y sus requerimientos nutritivos son muy complejos. Algunas cepas han sido cultivadas en medios sintéticos compuestos por 18 aminoácidos, vitaminas, sales y glucosa.

Para una tasa de crecimiento óptima y para cultivos primarios son recomendados una variedad de medios sólidos: albimi, triptosa, tripticasa soya, agar papa, con adición o no de un 5% de suero (que no contenga anticuerpos a brucelas) y los medios selectivos o especiales, adicionados de antibióticos (Kuzdas-Morse, Thayer Martin) son empleados con éxito cuando se pretende aislar brucelas de muestras contaminadas.

b) Características bioquímicas.

Todas aquellas pruebas que tienden a identificar y biotipificar la Brucella merecen nuestra atención. Existen pruebas bioquímicas que son claves (Anderson y Smith, 1965; U.S. Dept. Ag. 1965; Pacheco y Thiago de Mello, 1950; Williams et al, 1964; Wilson y Dasinger, 1965; Sanders y Warner, 1953).

Así mismo las pruebas de sensibilidad a colorantes en diferentes concentraciones son de gran valor en biotipificación (Huddleson, 1931; Pickett et al, 1953, Morgan, 1961).

Aunque la mayoría de los organismos utilizan varios carbohidratos, las cantidades de ácido y gas producidas son demasiado pequeñas para ser utilizadas en el diagnóstico para identificar especies, pero es una característica de valor en la identificación del género Brucella (Buxton y Frasser, 1977). Algunas cepas producen catalasa y esto puede tener correlación con la virulencia. Son oxidasa positiva. Los nitratos son reduci-

dos a nitritos (Jawetz et al, 1979).

Muchas cepas producen ácido sulfídrico (H_2S). La producción de H_2S por Br. suis cepa americana es intensa, mientras que Br. suis cepa danesa no produce H_2S ; Br. abortus tiene una producción de H_2S poco marcada, y Br. melitensis es usualmente negativa pero algunas cepas pueden llegar a producir trazas. Así que, esta prueba sumada a otras bioquímicas es útil para la diferenciación de especies del género Brucella.

La capacidad que tienen las brucelas para hidrolizar la úrea y producir NH_3 es una importante característica para diferenciar especies. La actividad ureásica es alta con Br. suis tanto la cepa danesa como la americana (Pacheco y Thiago de Mello, 1950), pero baja en Br. abortus. Sin embargo en Br. melitensis, los resultados son variables (Renoux y - Quatrefages, 1951; Sanders y Warner, 1953; Buxton y Frasser, 1977).

La tolerancia a la penicilina es otra útil para diferenciar cepas - vacunales y virulentas (Kraft, 1956). Otra prueba es la susceptibilidad a sufrir lisis por el fago Tbilisi (Tb) (Parnas et al, 1967; Corbel et al, 1972).

La prueba de Eritritol es importante para detectar virulencia en brucelas; muchos investigadores han informado que el crecimiento de las brucelas es estimulado por este compuesto (Anderson y Smith, 1965), lo cual constituiría un factor de gran importancia en la patogenia de los abortos infecciosos. Este alcohol de cuatro carbonos ($HOCH_2CHOHCHOHCH_2OH$) fué cristalizado a partir de líquido amniótico y alantoideo de bovinos.

Dichas bacterias tienden a multiplicarse y a localizarse en tejidos en los que abunda este poliol, ya sea en membranas placentarias y tejidos

fetales, en donde las brucelas proliferan notablemente causando la muerte y expulsión fetal (W.H.O. Fifth Report, 1971).

En machos existe abundancia de Eritritol a nivel de epidídimo, tejido testicular, y vesículos seminales, en todos estos sitios se localizan las brucelas. Según Keppie, et al, (1965) los niveles de Eritritol en placenta de animales que sufren placentitis por infección a Brucella son más elevados que en aquellas especies donde no ocurre placentitis.

Sin embargo las investigaciones realizadas por Meyer en 1967 revelaron que no hay relación entre virulencia y presencia de Eritritol. Por otro lado los estudios de Crouch et al, (1967), demostraron que la cepa Rev-1 de Br. melitensis que es de relativa baja virulencia, es estimulada por el Eritritol.

La sensibilidad de Brucella a varios colorantes es una técnica usada para diferenciar varias especies del género (Huddleson, 1931). Los colorantes usualmente usados son: Tionina, Fucsina básica y Violeta de Metilo los cuales se incorporan a medios que contengan suero. Según Moreira-Jacob, (1963), el uso de Safranina en dilución 1:5,000, inhibe el crecimiento de todos los biotipos de Br. suis.

Existen técnicas de sensibilidad a colorantes modificadas. Una de ellas consiste en colocar un papel de filtro embebido en el colorante respectivo sobre el medio de cultivo (infusión de hígado agar) sobre el cual se siembra. Otra técnica es utilizando tabletas de colorantes las cuales son embebidas en el medio de cultivo. (Buxton y Frasser, 1977; Stanier , 1979).

De cualquier forma algunos biotipos de Br. abortus son inhibidos por

la Tionina, pero solo uno por Fucsina básica. Br. suis biotipo 1 y 2 son inhibidos por la Fucsina básica pero no por Tionina, usualmente los biotipos de Br. melitensis son resistentes a ambos colorantes. Sin embargo se han encontrado variaciones en cuanto a sensibilidad entre ciertos biotipos de las diferentes especies (Alton, et al, 1975; U.S. Dept. Ag., 1965; - W.H.O. Fifth Report, 1971).

c) Aspectos metabólicos.

Las brucelas son aerobias, pero pueden utilizar el nitrato de forma anaerobia como aceptor de electrones.

Sus necesidades nutritivas son relativamente complejas, para fines especiales pueden utilizarse medios sintéticos que contienen una serie de aminoácidos y vitaminas. Br. abortus se diferencia de otras especies del género, ya que al ser aislada precisa de una atmósfera que contenga 5 a - 10% de dióxido de carbono. Case todos estos microorganismos producen catalasa y descomponen la úrea. Muy raramente se produce la fermentación de azúcares (Sanders y Warner, 1953; Pickett et al, 1955).

Los estudios comparativos del género Brucella y sus biotipos sobre los aminoácidos del ciclo de la úrea y otros aminoácidos (Cameron y Meyer 1953 y 1955), así como la utilización de carbohidratos, pueden ser considerados como una guía confiable para la identificación de especies y biotipos del género Brucella (McCullough y Beal, 1951).

Así mismo los importantes estudios de evaluación estadística, de las tasas de consumo de oxígeno, como también las investigaciones para definir patrones de metabolismo oxidativo para la caracterización del género Brucella y sus biotipos, han sido descritos por Meyer y Cameron, (1959, 1961a y 1961b).

Las investigaciones realizadas por Meyer y Cameron, (1961b) han demostrado de forma convincente que cada especie del género Brucella tiene un consumo característico y definido de oxígeno en determinados substratos de aminoácidos e hidratos de carbono. Es útil e importante distribuir los substratos en tres grupos (Alton, et al, 1975); en el Cuadro 1, se presentan los diferentes grupos y el comportamiento de cada especie (incluyendo los biotipos de Br. suis por su variabilidad).

d) Sensibilidad al bacteriófago.

Es una prueba de gran importancia en la biotipificación de brucelas. El fago más empleado, es el fago Tbilisi o Tb, aislado inicialmente en la U.R.S.S. y que ha sido designado fago de referencia. Usualmente en las pruebas de lisotipia se emplean dos concentraciones de fago: la dilución habitual de prueba (DHP) y una suspensión más concentrada, la 10,000xDHP. Como cepas huéspedes para el cultivo de los fagos se han recomendado la cepa de referencia 544-2 (Br. abortus) o un cultivo de cepa 19, acompañante del fago Tb aislado en la U.R.S.S.

Las colonias lisas o lisas intermedias de Br. abortus presentan una lisis completa en las zonas donde se han depositado gotas de cualquiera de las dos diluciones, mientras que las colonias rugosas no sufren lisis. La mayoría de los cultivos de Br. suis son lisados parcialmente con la 10,000 x DHP, pero no se alteran con la DHP. La mayor parte de los cultivos de Br. melitensis no les afecta ninguna de las dos diluciones, aunque a veces algunos cultivos muestran lisis parcial con 10,000 x DHP, los cultivos de Br. canis y Br. ovis no son lisados con ninguna de las dos diluciones. Mientras que la Br. neotomae se lisa completamente con ambas diluciones del fago.

CUADRO 1

Comportamiento de Tres Especies del Género *Brucella*
en las Pruebas de Metabolismo Oxidativo *

Grupo	Substrato	<u>Br. melitensis</u>	<u>Br. abortus</u>	<u>Br. suis</u> biotipo			
				1	2	3	4
I	L-Alanina	+	+	±	-	±	-
	L-Asparagina	+	+	-	±	-	-
	L-Acido Glutámico	+	+	-	±	±	±
II	D,L-Ornitina	-	-	+	+	+	+
	D,L-Citrulina	-	-	+	+	+	+
	L-Arginina	-	-	+	+	+	+
	L-Lisina	-	-	+	±	+	+
III	L-Arabinosa	-	+	+	+	-	-
	D-Galactosa	-	+	+	+	-	-
	D-Ribosa	-	+	+	+	+	+
	D-Glucosa	+	+	+	+	+	+
	I-Eritritol	+	+	+	+	+	+

* (Meyer y Cameron, 1961a y 1961b).

La norma lítica que siguen diversas especies de Brucella, coincide con las investigaciones que muestran que Br. abortus absorbe los fagos y recorre un ciclo lítico, Br. suis absorbe los fagos y es sensible a la lisis desde el exterior, pero no recorre un ciclo lítico, mientras que Br. melitensis, y las cepas rugosas de Br. abortus no absorben los fagos (Meyer, 1962; U. S. Dept. Ag., 1965; Parnas, et al, 1967; Corbel y Phillip, 1972; Alton, et al, 1975).

e) Homología del DNA.

A partir de los estudios de homología del DNA, puede concluirse que este género es considerablemente homogéneo. Las investigaciones realizadas por Hoyer y McCullough, (1960), demostraron que la cantidad de Guanina más Citosina (G + C) del ácido deoxiribonucleico (DNA) de las brucelas, varía entre 56-58 moles por ciento. Dichas investigaciones demostraron que la homología de los polinucleótidos de las diferentes especies de Brucella son iguales y recíprocas, excepto para Br. ovis cuya reciprocidad es menor. Sin embargo, los estudios sugieren que Br. ovis es una bacteria que sufrió la depleción de algunos pares de bases, ya que carece de segmentos de DNA los que están presentes en las otras brucelas. De esta manera, las investigaciones de Hoyer y McCullough, (1968), fueron determinantes para la aceptación de Br. neotomae, Br. canis, y Br. ovis dentro del género Brucella.

f) Características antigénicas.

Las diferentes especies del género Brucella no pueden ser diferenciadas por reacciones de aglutinación, pero pueden distinguirse por absorción de aglutininas. Existen dos antígenos denominados A y M que se encuentran en diferentes proporciones en Br. abortus, Br. suis y Br. melitensis.

Además ha sido demostrada la presencia de un antígeno S superficial semejante al antígeno Vi de Salmonella.

Los antisueros obtenidos de animales inmunizados con una cepa lisa aglutinan las tres principales especies del género de Brucella. Se supone que estas reacciones cruzadas se deben a la existencia de dos determinantes antigénicos comunes (Davis et al, 1978).

El antígeno A o abortus es el principal determinante de superficie tanto en Br. abortus como en Br. suis, y es un determinante secundario (a) en Br. melitensis y sería un determinante secundario (m) en las otras especies. Fueron Wilson y Miles (1932 y Miles (1939) quienes demostraron la presencia de los antígenos primordiales en la superficie de las brucelas lisas, identificandolos como A y M. Estos son lipopolisacáridos asociados con cantidades variables de polipéptidos, que poseen características endotóxicas similares a las endotoxinas de las enterobacterias (Baker y Wilson 1965; Leong y Wilson, 1968; Leong et al, 1970).

El fragmento lipídico denominado lípido A, es el responsable de la toxicidad, el polipéptido parece ser esencial en la inducción de hipersensibilidad retardada en animales sensibles. El componente polisacárido - posee la mayor actividad antigénica, y es responsable de la especificidad serológica (Jones y Berman, 1976), siendo la proporción de antígeno A:M en Br. abortus de 20:1 respectivamente, mientras que en Br. melitensis es de 1:20 (A:M).

Los estudios iniciales sobre la relación antigénica entre especies rugosas y lisas de Brucella, señalan que las cepas rugosas no poseen la - endotoxina de tipo lipopolisacárido asociada con la actividad aglutinogénica de las colonias lisas (Díaz et al, 1968). Así mismo, fué demostra-

do que las colonias rugosas de Bruceella poseen características antigénicas similares entre si, pero diferentes a las cepas lisas (Díaz et al, 1968; Meyers et al, 1972).

Las investigaciones realizadas por Díaz y Bosseray (1973) demostraron la presencia de antígenos conteniendo polisacáridos en la superficie de brucelas rugosas, las cuales forman líneas de precipitación solamente con sueros obtenidos despues de la inmunización con brucelas en forma "R", pero no precipitan con sueros preparados con brucelas en fase "S". Tales resultados señalan que, el antígeno de brucelas rugosas (antígeno R) es específico para brucelas en fase "R". Sin embargo, se conocen otras cepas que poseen determinantes antigénicos específicos en sus antígenos "R".

Se ha demostrado que los antígenos extraídos de la pared celular de cepas rugosas, como Br. canis, producen una reacción que sugiere efecto endotóxico, cuando son inoculados a perros por vía subcutánea (Flores Castro, 1978).

Mediante la absorción de anticuerpos anti-Am (abortus o suis) con una dosis de microorganismos de Br. melitensis (aM) eliminando así la aglutinina secundaria (m) y una fracción de la aglutinina principal (A), se hace posible preparar sueros monoespecíficos frente al antígeno A. Los antisueros monoespecíficos anti-M se preparan de forma similar. Tales sueros resultan útiles en el diagnóstico.

La imposibilidad del suero monoespecífico para producir aglutinación reaccionando con el antígeno menor, se explica por el supuesto de que tales determinantes antigénicos menores están distribuidos de modo tan disperso sobre la superficie celular, que no pueden interactuar con un número suficiente de moléculas de anticuerpos, para producir aglutinación (Davis et al, 1978).

g) Variación de la pared celular.

Según investigaciones de Moreira-Jacob (1970) el proceso de disociación forma cuatro tipos de colonias diferentes: lisa, intermedia, mucoides y rugosa. Tales cambios ocurren a través de modificaciones del contenido de lípidos y polisacáridos de la superficie de la célula y parecen estar asociados con cambios en las propiedades de antigenicidad y virulencia. Los organismos virulentos típicos forman colonias lisas y transparentes. Estos tienden a mutar a la forma rugosa que es avirulenta, con excepción de Br. ovis y Br. canis, las cuales no se conocen en forma lisa. Las células avirulentas (rugosas) aglutinan en la solución de acriflavina es una solución de 1:1000 en tanto que las virulentas (lisas) no lo hacen.

A consecuencia de la disociación, las generaciones hidrofílicas se tornan hidrofóbicas, es un proceso aunado a cambios en susceptibilidad a electrolitos y otros agentes.

La selección de mutantes en vivo parece estar influenciada por sustancias del medio ambiente. Así, el suero de animales susceptibles contiene una globulina y una lipoproteína que impiden el crecimiento de los tipos no lisos avirulentos, y favorece el crecimiento de los tipos virulentos. Aquellas especies animales resistentes a la infección, carecen de estos factores, de modo que puede presentarse una mutación rápida a las formas avirulentas. Ha sido demostrado in vitro que la D-alanina tiene un efecto selectivo similar (Fitzgeorge y Smith, 1966; Williams, 1973).

h) Importancia de las pruebas para la biotipificación de Brucella.

Los organismos del género Brucella son ordinariamente identificados como miembros de una determinada especie por los métodos bioquímicos con-

vencionales de Huddleson (1931) y Meyer y Zobell (1932), y menos por pruebas serológicas con el uso de sueros monoespecíficos (Wilson y Miles, 1932 Wilson, 1933).

Los investigadores que han intentado correlacionar la identificación serológica con pruebas bioquímicas de tipificación mediante la sensibilidad a diferentes concentraciones de colorantes, han encontrado que sus resultados son contradictorios. Así que, varios investigadores concluyeron que estas pruebas practicadas aisladamente para los propósitos de identificación, no eran de valor Spink (1956) señalaban que el uso de procedimientos serológicos no era satisfactorio; sin embargo Jones (1958) no ha encontrado problemas como los antes señalados, así que existen opiniones diversas en la identificación de especies del género Brucella.

Esto es porque existen organismo del género que no han podido ser clasificados específicamente y se han reportado como Br. melitensis bioquímicamente, y Br. abortus serológicamente (Taylor et al, 1932; Wilson, 1933; Renoux, 1952; Cruickshank, 1954; Pickett y Nelson, 1955), o bien como Br. melitensis bioquímicamente, pero con más antígeno de Br. abortus que lo usual (Stableforth, 1959).

Otros investigadores han encontrado Br. melitensis bioquímicamente, pero con iguales cantidades de antígeno de Br. abortus y Br. melitensis (Gargani et al, 1957). Por otro lado se han detectado Br. melitensis que requieren CO₂ (Stableforth, 1959). Otros han encontrado Br. abortus bioquímicamente y Br. melitensis serológicamente (Wilson, 1933; Cruickshank, 1954; Pickett y Nelson, 1955). Es conocido desde el reporte original de Wilson y Miles, (1932), que Br. abortus y Br. melitensis contienen antígenos cualitativamente similares, los cuales varían en su distribución cuantitativa.

La evidencia presentada en los estudios de metabolismo oxidativo, - muestran que la distribución cuantitativa de antígeno varía no solamente de especie a especie, sino también dentro de especies y que la distribución de este antígeno frecuentemente no esta relacionado a otras especies características (Meyer y Morgan, 1962).

Diversos estudios han demostrado que existen cepas de Br. abortus que no producen ácido sulfídrico (H_2S), no requieren CO_2 son Tionina resistentes, duplicando características de Br. melitensis. De tal manera que a veces resultan indistinguibles Br. abortus de Br. melitensis, por los usuales métodos bioquímicos, y en otros casos, Br. abortus es serológicamente indistinguible de Br. melitensis. Ambos tipos de Br. abortus, - pueden ser diferenciados mediante el uso de pruebas metabólicas y por la susceptibilidad del fago Tb (Meyer, 1962; Clark, 1969).

Hay estudios en los que se señala el aislamiento de cepas originalmente identificadas como Br. melitensis mediante estudios bioquímicos y serológicos a partir de muestras de bovinos, pero que epidemiológicamente y en características patogénicas eran anormales; utilizando pruebas metabólicas y bacteriófagos, se demostró que se trataba en realidad de Br. abortus (Meyer, 1962). Por lo tanto las pruebas bioquímicas y métodos serológicos por si solos no son confiables para la identificación de especies de Brucella y sus biotipos (Meyer y Morgan, 1962).

Las pruebas verdaderamente precisas para la biotipificación de Brucella, son las de metabolismo oxidativo en el aparato de Warburg (McCullough y Beal, 1951; Meyer y ZoBell, 1952; Cameron y Meyer, 1953, 1955; Meyer y Cameron, 1959, 1961a, 1961b; Meyer y Morgan, 1962; Clark, 1969).

Meyer y Cameron, (1961a) han mostrado evidencias de que es posible identificar correctamente cepas conflictivas del género Brucella, mediante el uso de técnicas manométricas (Umbreit, et al, 1957), utilizando substratos (aminoácidos y carbohidratos) como patrones en pruebas metabólicas. Se encontró que estos patrones eran consistentes y definitivos para cada especie y sus biotipos (Meyer y Cameron, 1961b), y de variantes que mostraban características anormales de una especie (Meyer y Cameron, 1961a Meyer, 1962).

Los estudios posteriores revelaron que todas las cepas que fueron - metabólicamente clasificadas como Br. abortus, eran susceptibles al bacteriófago de Brucella y, todas las que mostraron un patrón característico de otras cepas, no fueron lisadas con el fago Tb con la dosis habitual de - prueba (DHP) (Meyer, 1962; Parnas et al, 1967; Corbel y Phillip, 1972).

La distribución de los antígenos puede ser medido por aglutinación con sueros monoespecíficos (anti-A y/o anti-M).

Otras pruebas de importancia útiles en la identificación son las - pruebas de tolerancia a la penicilina, y el uso de sensibilidad a Tionina azul, para detectar virulencia o no, en cepas recién aisladas o cepas vacunales (Kraft, 1955; Morgan, 1961).

V) Especies susceptibles

a) Animales domésticos.

Las especies de animales más frecuentemente afectadas son los bovinos, cerdos, cabras y ovejas. La enfermedad causada por las cepas lisas de Br. abortus, Br. melitensis y Br. suis producen manifestaciones clínicas muy similares, en las diferentes especies animales afectadas.

Mientras que la enfermedad producida por cepas naturalmente rugosas como son Br. canis y Br. ovis producen manifestaciones clínicas ligeramente diferentes, así que los métodos de diagnóstico presentan algunas variaciones.

Las tres especies principales de Brucella son patógenas para una amplia variedad de mamíferos, aunque cada una de ellas tiene un huésped de elección del tracto reproductor, abortos y epididimitis. En perros infecciones similares menos frecuentes ocurren; los caballos son ocasionalmente infectados y desarrollan una bursitis supurativa (Buxton et al, 1977).

b) Animales silvestres.

Esta enfermedad también ocurre en una amplia gama de animales silvestres, los cuales pueden actuar como reservorios, representando un foco potencial de diseminación. Existen muchos involucrados en la transmisión de la enfermedad, incluyendo diversos roedores, venados, camellos, búfalos, liebres y marsupiales (W.H.O. Fifth Report, 1971).

A esta importante zoonosis se han dedicado numerosos estudios desde tiempos remotos, pero es en los últimos años, cuando muchos investigadores han comenzado a mostrar preocupación, acerca del posible e importante papel como reservorio que pudieran jugar animales silvestres y por lo tanto, diseminar la Brucelosis particularmente aquellas especies que conviven de alguna forma con animales de importancia económica, susceptibles a Brucelosis.

Esta corriente investigativa en los animales silvestres posiblemente involucrados en importantes enfermedades, ha despertado el interés de investigadores preocupados por encontrar una respuesta a muchas zoonosis de importancia mundial.

Los estudios realizados en numerosos países europeos: Alemania - (Guthenke y Kokles, 1972; Stoll, 1972; Fenske y Pulst, 1973; Schonherr et al, 1973; Weber, 1978); Suiza (Roux y Bouvier, 1946); Dinamarca - (Christiansen y Thomse, 1957); Checoeslovaquia (Nosek, 1971; Vitovec et al, 1976); Rumania (Predoiu y Cristescu, 1972); Rusia (Rementsova, 1962; Sofranov, 1971; Taran y Zamakhaeva, 1971; Zenkova, 1971; Belikov, et al, 1973; Topor, 1973; Zenkova, 1975; Gorban, 1977; Gorban y Grekova, 1978); y otros países europeos (Bendtsen et al, 1956; Thomsen, 1959), muestran los resultados serológicos y de aislamientos de Brucella en animales silvestres. Bosworth (1937) informa acerca de la susceptibilidad de ratas silvestres a la infección con Br. abortus. Por otro lado las investigaciones realizadas en Zambia por Bell et al (1977), muestran la posibilidad de que los animales silvestres sean evidentes reservorios de Br. melitensis.

Otras investigaciones relevantes son las realizadas en chigüires de Venezuela, donde se logró aislar Br. abortus (Bello et al, 1976). Muchos investigadores en Estados Unidos han estado particularmente interesados en la posible relación de animales silvestres como reservorios de brucela. Ya en 1937 existían estudios acerca de la susceptibilidad de roedores a brucela (Bosworth, 1937; Fitch y Bishop, 1938).

Los estudios serológicos y bacteriológicos realizados en Estados Unidos, demuestran que se han detectado anticuerpos y se han aislado brucelas en diferentes especies de animales silvestres. Así mismo, se han realizado inoculaciones experimentales, a fin de detectar la susceptibilidad de ciertas especies animales a la Brucelosis (Tunnicliff y Marsh, 1935; -- Youatt y Fay, 1959; Wodd et al, 1968; Witter et al, 1970; Wood et al, 1976

Stauber et al, 1977; Thorne et al, 1978a 1978b; Swann et al, 1980; Vana, 1980).

Br. suis fué aislada en Alaska a partir de renos silvestres (Rangifer tarandus) lobos (Canis lupus) y zorros (Vulpes fulva, Alopex lagopus) (Neiland et al, 1968; Neiland, 1970; Rausch, 1972; Neiland, 1975).

Otros estudios, realizados en visón (Mustela vison), resultaron en la detección de anticuerpos a Brucella (Bisping y Loliger, 1963; Pritchard et al, 1971). Con el mismo fin se han realizado encuestas en venado de cola blanca (Odocoileus virginianus) (Fay et al, 1980).

Las encuestas serológicas y bacteriológicas en alces americanos -- (Alces americanus), coyotes (Canis latrans) y osos negros (Ursus americanus), demostraron la prevalencia de Brucelosis (Jellison et al, 1953; -- Davis et al, 1979; Thorne et al, 1979; Binninger et al, 1980; Davis, 1980).

Estudios serológicos y epidemiológicos realizados en Canadá en bovinos y animales silvestres, demostraron la presencia de Brucella (Corner y Connel, 1958; Hudson, 1978; Zarnke, 1978; Hudson et al, 1980).

En Brasil se han realizado importantes investigaciones en vampiros (Desmodus rotundus) y monos (Callithrix penicillata), detectandose anticuerpos a Brucella (Ricciardi et al, 1976).

Hay publicaciones realizadas en Argentina, que describen aislamientos de Br. suis en la liebre europea (Lepus europeus), zorros (Dusicyon gymnocercus, D. griseus), comadreja (Didelphis marsupialis= D. albiventris) y de Br. abortus en hurón (Galictis furax=Grison cuja) (Szyfres y Tomé, 1966; Gamarra y Szyfres, 1963; Szyfres et al, 1968; De la Vega et al 1979)

Un muestreo serológico y epidemiológico realizado en la India resultó

con importante información acerca de la presencia de anticuerpos contra *Brucella* en aves silvestres y serpientes (Sambyal y Sharma, 1972; Sharma et al, 1979).

En Rusia se efectuó un estudio epidemiológico para definir la susceptibilidad de diferentes especies de animales silvestres a la inoculación de *Brucella*. Se encontraron altos títulos de anticuerpos en tortugas (*Testudo horsfieldi*), ranas (*Rana ridibunda*) y puerco-espín (*Erinaceus auritus*) manteniéndose dichos títulos hasta por 9 meses.

En Turquía se han realizado investigaciones seroepidemiológicas, a fin de estudiar más profundamente ciertas zoonosis de importancia. Ozan, (1976), realizó estudios de brucelosis en animales silvestres.

Los estudios serológicos y bacteriológicos tendientes a detectar acarreadores de *Brucella* en Egipto, resultaron en aislamientos de *Br. abortus* biotipo 3 y *Br. melitensis* biotipo 1 en ratas y perros (Salem et al, 1974).

En Checoslovaquia se realizaron importantes aislamientos de *Br. suis* en animales silvestres (Vitovec et al, 1976). Pero es de gran interés e importancia la investigación realizada en garrapatas (*Haemaphysalis punctata*), conocidas por fungir como reservorios y vector de *Rickettsia sibirica* y *Coxiella burnetii*. Según este estudio, se involucra a *H. punctata* como vector de *Br. melitensis* (Nosek, 1971).

En Kenia, Uganda, Tanzania, Botswana, Zambia, en el este de Africa, Rodesia y otros países africanos, se hicieron estudios serológicos y bacteriológicos, lo que permitió identificar anticuerpos contra *Brucella*, en bovinos y animales silvestres, así como, aislamientos de *Br. abortus* en casos de orquitis, en búfalo africano (*Syncerus caffer*) y *Br. melitensis*

a partir de Impala (Aepyceros melampus) (Essoungou, 1970; Schieman y Staak 1971; Thim, 1971, 1972; Kaliner y Staak, 1973; Cooper y Garmichael, 1974; Condy y Vickers, 1976; Regamy et al, 1976).

En Suiza los dos primeros casos de Brucelosis en liebre (Lepus europeus), fueron detectados por Roux y Bouvier (1946).

En Venezuela investigaciones realizadas en 734 chiguire durante los años 1974 a 1979, resultaron en aislamientos de Br. abortus biotipo 1, 2 y 6, así como en la detección de anticuerpos contra Brucella, en gran número de animales (Bello et al, 1980).

Podemos decir que todas las investigaciones tendientes a controlar, y mejor aún, a erradicar la Brucelosis, serían deficientes si no se prestara interés al estudio del papel que pueden tener en esta zoonosis los animales silvestres. De hecho como se puede observar por todo lo antes expuesto, en todo el mundo se ha despertado un gran interés por dichas investigaciones, a fin de clarificar su significancia en la cadena de transmisión.

En Estados Unidos, el primer diagnóstico de Brucelosis en animales silvestres, fué en 1917 en bisontes (Bison bison) del Parque Nacional de Yellowstone (Tunnicliff y Marsh, 1935; Katz, 1941).

Así mismo los estudios serológicos y bacteriológicos en coyotes de Texas, resultaron en la determinación de anticuerpos contra Brucella y aislamiento de Br. abortus (Davis et al, 1979). Otro estudio en venados de cola blanca, reveló la posibilidad de que sean reservorios de Brucella - (Boeer et al, 1980). Por otro lado dos diferentes investigaciones se realizaron en alces, con el fin de significar los efectos clínicos y vías de

transmisión a través de infección artificial en estos animales. Otro estudio se refería a una evaluación serológica con resultados que muestran la posibilidad de que los alces sean reservorios de brucela (Thorne et al, 1978; Morton y Thorne, 1981).

Evidencias serológicas de Br. canis han sido reportadas en coyotes, gatos monteses (Lynx rufus), mapaches (Procyon lotor), y marsupiales -- (Didelphis virginianus = D. marsupialis) en el sur de Texas (Hoff, 1974; Randhawa et al, 1977).

Br. suis fué encontrada ocurriendo naturalmente en zorros (Vulpes vulpes) en Bulgaria y en Rusia (Rementsova, 1960).

Hay evidencias serológicas de Br. abortus en la hiena (Crocuta crocuta), perros silvestres (Lycaon pictus), y chacal (Canis mesomelas) en Tanzania (Sachs et al, 1968).

Dos especies de zorros, Dusicyon gymnocercus y D. griseus, muestreados serológicamente y bacteriológicamente, resultaron naturalmente infectados con Br. abortus biotipo 1 (Szyfres y Tome, 1966).

En Irlanda del Norte se realizaron encuestas serológicas en zorros (Vulpes vulpes), que mostraron la positividad a Br. abortus (McCaughey, 1950), Br. suis biotipo 4 fué aislada de perros de Alaska (Neiland,1970).

Un importante estudio fué realizado en 5 estados de Estados Unidos, en 7 especies de carnívoros silvestres, en los cuales se detectaron anticuerpos contra Brucella (Hoff et al, 1974).

Fueron encontradas evidencias serológicas, en infecciones naturales en lobos (Canis lupus) en Alaska, osos pardos (Ursus arctos) y zorros rojos (Vulpes fulva) (Neiland, 1975). Estudios experimentales con Br. suis -

biotipo 4 en carnívoros silvestres, roedores, y lagomorfos son de particular interés, conociendo que Br. suis biotipo 4 es enzoótica en renos, carnívoros y humanos en Alaska (Nieland, 1980; Neiland y Miller, 1981).

b.1) La infección por brucelas en chigüires.

Es conocido el déficit de proteína es un problema mundial por esto toda investigación tendiente a la búsqueda de nuevos productos que satisfagan las necesidades alimenticias de una población creciente, son más justificadas. El chigüire, el roedor más grande del mundo, es un animal semi acuático que puede coexistir perfectamente bien con los animales domésticos del hombre, dados a la actividad pecuaria. Esta especie animal se encuentra distribuída desde Panamá hasta el norte de Argentina; los chigüires de los Llanos de Apure en Venezuela, alcanzan pesos que oscilan entre 48.9 a 65.5 kgs. en adultos (Ojasti, 1971).

El chigüire constituye una importante fuente de proteína animal, además de poseer una piel de gran valor, lo que le sitúa dentro de las explotaciones comerciales complementarias de la ganadería (Velasco, 1981).

En este afán de utilizar el chigüire como suplemento en la dieta - proteica tradicionalmente bovina, muchos investigadores se han interesado en realizar estudios más profundos en diferentes aspectos, incluyendo la cría intensiva hasta su domesticación (Ojasti, 1968, 1970, 1973, 1978; Ojasti y Medina, 1972; González y Escobar, 1975; Cordero, 1977; González, 1977, 1978; Cordero y Ojasti, 1981).

Por otro lado, un aspecto de vital importancia es el papel que pudie ra tener el chigüire en la transmisión de la Brucelosis. Es conocido que la Organización Mundial de la Salud ha llamado la atención sobre la necesidad de investigar los reservorios de enfermedades del hombre y animales,

para así planificar con mayor acierto las campañas de sanidad. Fué así - como en Venezuela se iniciaron estudios con este propósito. En 1973, Plata estudió serológicamente 257 chigüires, conociendo que este animal silvestre tiene una estrecha convivencia con los bovinos en ciertas zonas del país, especialmente en los Llanos de Apure donde se encuentra una importante población bovina y de chigüires.

c) El hombre.

El hombre es también afectado por la Brucelosis, siendo las principales fuentes de contaminación la ingestión de productos lácteos no pasteurizados, o mediante inoculación a través de la piel no intacta, aspiración, y conjuntiva ocular.

Una de las importantes manifestaciones es la Fiebre de Malta, caracterizada por una fase septicémica aguda, seguida de una fase crónica la cual puede extenderse por años (Buxton et al, 1977).

VI) Patogénesis

Las infecciones experimentales se producen con facilidad, tanto en cobayos, ratones, conejos y monos. En la Brucelosis natural, los microorganismos penetran en el cuerpo a través de heridas cutáneas, de la conjuntiva o del conducto gastrointestinal. También se han producido infecciones por aerosoles.

En el punto de penetración cutáneo o mucoso, se concentran células polimorfonucleares, que ingieren a los microorganismos los cuales se multiplican en su interior. Las bacterias intracelulares serán transportadas por los linfáticos a los ganglios regionales. A este nivel las bacterias penetran en las células mononucleares y se multiplican en su interior.

Algunas de estas células son destruidas liberando bacterias y restos celulares que van a estimular la activación local de las células mononucleares así como su proliferación. El resultado de tal enfrentamiento es el que determina si la infección invasora va a ser reprimida o no.

En caso de no ser detenida, las bacterias que se encuentran en el interior de células polimorfonucleares y mononucleares, serán transportadas al torrente sanguíneo. Posteriormente pueden ser observados numerosos leucocitos parasitados en los sinusoides hepáticos (Smith et al, 1964).

Las acumulaciones focales de células de Kupffer contienen gran cantidad de bacterias, formandose granulomas típicos a los pocos días. Lesiones semejantes pueden aparecer en bazo, médula ósea y riñón; pueden encontrarse acumulaciones bacterianas en glándula mamaria y en útero (gestante) provocando abortos.

Las bacterias se concentran en la zona placentofetal, líquido amniótico y el corion. Este viscerotropismo se debe según Smith et al (1964) a la presencia de Eritritol, el cual constituye un factor de gran importancia en la patogénesis de abortos infecciosos. Este alcohol polihídrico tiene la capacidad de estimular el crecimiento de Br. abortus.

Esta sustancia se encuentra en cantidades apreciables tan solo a nivel del corion, cotiledones y de los líquidos fetales de especies animales predispuestas al aborto infeccioso (Anderson et al, 1964 y 1965; Williams et al, 1964; Smith et al, 1964).

No han sido detectados (en *Brucella*) factores virulentos específicos como son las exotoxinas o los constituyentes antifagocíticos de la cápsula de la pared celular. En cambio, las características y el curso de la enfermedad vienen dados por una serie de fenómenos intracelulares. Así, la

Brucella de tipo liso se multiplica con facilidad en el interior de monocitos no inmunes, mientras que las rugosas que carecen de virulencias, son incapaces de hacerlo. Debe existir un factor de virulencia que aumente la supervivencia intracelular.

Ha sido probado que la *Br. abortus* virulenta, procedente de cultivos de monocitos o de placenta bovina infectada sobrevive con mayor facilidad en las células mononucleares que las bacterias de la misma cepa cultivadas en medios artificiales. Por otro lado, la pared celular de *Brucella* virulenta, obtenida de placenta bovina inhibe la destrucción intracelular de cepas avirulentas (R), por parte de las células mononucleares, lo cual no ocurre con las mismas bacterias cultivadas en medios artificiales. Así que aparentemente este factor de virulencia solo se produce en vivo (Keppie et al, 1969; Kellerman et al, 1970).

VII) Diagnóstico serológico

Entre las bases generales para el control y prevención de la Brucelosis en bovinos se encuentran la identificación y eliminación de animales infectados, aunado a los programas de vacunación. Así que existe una urgente necesidad por contar con una prueba diagnóstica sencilla, sensible y específica y esta necesidad se hace más aguda en zonas donde la prevalencia de infección es alta y la vacunación de animales adultos es permitida (Nicoletti et al, 1978; Díaz et al, 1979; Jones et al, 1980).

La investigación orientada al desarrollo de nuevos procedimientos diagnósticos continúa activamente. Las dificultades técnicas que ofrece el diagnóstico de esta enfermedad, han creado la necesidad de desarrollar investigaciones con el fin de incrementar, la eficiencia de las pruebas de laboratorio. El procedimiento ideal para el eficiente diagnóstico de --

cualquier enfermedad debe tener por lo menos las siguientes características: fácil ejecución, identificación de todos los animales reactivos, y capaz de diferenciar entre animales vacunados y animales infectados (Díaz, et al, 1979; Jones, et al, 1980).

Existen una serie de problemas involucrados en el diagnóstico de la Brucelosis como son: períodos de incubación, existencia de infecciones latentes, reacciones falsas positivas causadas por la vacunación así como - por antígenos heteroespecíficos, reacciones falsas negativas y procedimientos complejos. Y aunque se cuenta con una variedad de pruebas, estas presentan ventajas y desventajas; las pruebas cualitativas de identificación de anticuerpos son superiores (Corbel y Day, 1973; Alton et al, 1975; - Carrol, et al, 1980; Raybould y Chantler, 1980; Berman et al, 1980), mientras que las pruebas cuantitativas son menos sensibles y específicas -- (Lamb, et al 1979).

Díaz y Dorronsoro (1970) han utilizado pruebas de inmunodifusión en gel como una contribución al diagnóstico serológico de Brucelosis y Yersiniosis, resultando de gran utilidad para diagnósticos rápidos. Por otro lado Jones, et al (1980) han realizado estudios evaluando la prueba de inmunodifusión radial, utilizando un polisacárido antigénico para el diagnóstico de la brucelosis.

En la actualidad, una combinación de las pruebas de Rivanol y Fijación de Complemento en sueros, junto con exámenes bacteriológicos en leche han sido utilizados como un diagnóstico agudo en hatos infectados y vacunados. En este sentido existen estudios de Crawford, et al (1978) vacunando adultos con cepa 19 de Br. abortus. Un importante aporte en el campo de la Brucelosis, son las investigaciones de Nicolletti, et al (1978a y 1978b)

utilizando vacuna cepa 19 de Br. abortus, por diferentes vías y en dosis reducida, aplicada en animales adultos.

Jones et al, (1980) realizaron estudios en bovinos, con vacunación controlada y desafiados experimentalmente, analizando los sueros colectados a diversos intervalos con las pruebas convencionales, inmunodifusión radial y hemólisis indirecta, método este reportado por Plackett et al - (1976) de tener ventajas sobre la Fijación de Complemento. La prueba de Inmunodifusión radial fué evaluada en sueros de bovinos adultos vacunados, los cuales también se examinaron bacteriológicamente, resultando en una gran sensibilidad.

Son importantes los trabajos de Chappel et al (1978a y 1978b) comparando resultados de algunas pruebas serológicas y la búsqueda de diagnósticos eficientes para la Brucelosis.

Predoiu et al, (1972, 1980) entre sus investigaciones han evaluado los efectos de la política de erradicación de Brucelosis en Rumania, dando significancia a la prueba de hemaglutinación rápida, la cual evaluó con resultados favorables. Otros investigadores han dedicado su aporte en el campo de la Brucelosis, dirigiendo sus estudios a un mejor conocimiento de las diferentes clases de inmunoglobulinas y de la respuesta inmunitaria, ya sea en animales vacunados y/o infectados. Beh (1964), ha estudiado la distribución cuantitativa de las diferentes clases de inmunoglobulinas en animales vacunados e infectados, utilizando la prueba de inmunodifusión radial. Este autor encontró que en animales vacunados la gran mayoría de los anticuerpos producidos fueron IgG₁ e IgM, con cantidades similares en el suero de vacas y becerras, y el pico de la respuesta era un 23% para - IgG y 37% IgM; en el calostro y leche positivos a la prueba de aglutinación

los animales presentaron 24-54% de IgA y 36-46% de IgG.

Es conocido que los anticuerpos a *Brucella* en suero de bovinos, están distribuidos entre las clases de inmunoglobulinas IgG (IgG₁ e IgG₂) -- e IgM. La distribución proporcional es usualmente diferentes en animales con infecciones crónicas y vacunados (Beh, et al, 1973). También ha sido demostrado que las varias pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de Brucelosis varían considerablemente en su habilidad para detectar anticuerpos de una clase particular de inmunoglobulinas (Beh, 1974).

Kaneene et al (1979), estudiaron la respuesta inmune mediada por células, en bovinos vacunados con Br. abortus cepa 19 y animales testigos de la misma edad. Los estudios mostraron que la persistencia o declinación de títulos de anticuerpos depende de la dosis y edad en que se vacunaron las becerras.

Las investigaciones de Wood y Corbel (1973), han proporcionado una importante información en lo que se refiere a la relación de clases de proteínas del suero de bovinos y su reactividad a las pruebas serológicas para Brucelosis. Investigaron la relación entre concentraciones de proteína total y específica y las reacciones a pruebas serológicas para anticuerpos contra Br. abortus. Se notó en sueros que reaccionaron positivamente un significativo incremento en proteínas totales del suero, debido mayormente al aumento de gamma globulina. Se observó una correlación entre el aumento de proteínas totales del suero y concentraciones de gamma globulina y la prueba de la tarjeta. Se demostró ampliamente la importancia de evaluar los efectos de edad y raza intentando relacionar concentraciones de proteínas del suero a un estado de enfermedad particular o respuesta serológica.

a) Pruebas rutinarias de diagnóstico serológico.

Aglutinación en Placa: Es una prueba de seroaglutinación rápida, sencilla, pero no identifica ciertos anticuerpos aglutinantes. Cuando se aplica sola, los sueros sospechosos y positivos se deben someter a la prueba lenta en tubo, y otras pruebas complementarias. Es utilizada como prueba preliminar, para conocer la prevalencia de la enfermedad.

Es una prueba poco influida por la presencia de anticuerpos incompletos, fenómenos de prozona, y hemólisis de los sueros. Pero es menos sensibles que la prueba de tubo y con tendencia a presentar aglutinaciones inespecíficas. Es una técnica útil en zonas libres de Brucelosis. La mayor desventaja radica en que siendo una prueba cuantitativa, se producen reacciones en ciertos niveles que dificultan la interpretación (Alton et al, 1975).

Aglutinación en Tubo: Es una prueba de seroaglutinación que permite identificar las inmunoglobulinas IgM e IgG₂, la cual puede ser útil como prueba diagnóstica básica y para corroborar los resultados de otras pruebas serológicas. Sin embargo presenta el problema de que los sueros hemolizados no son adecuados, por la interferencia del fenol con la hemoglobina libre, que puede ocasionar "pseudoaglutinaciones". Al igual que la anterior, es de carácter cuantitativo y surge el problema de que algunos sueros caen en el nivel de "sospechosos". Ambas fueron las primeras pruebas empleadas para diagnosticar Brucelosis. (Alton et al 1975).

b) Pruebas complementarias.

Aglutinación con 2-Mercaptoetanol: Es una prueba selectiva y cuantitativa que detecta solamente la presencia de IgG. Se fundamenta en que los

anticuerpos IgM se degradan en 5 unidades semejantes, por la reducción de los enlaces disulfuro, debido a la acción de ciertos compuestos que contienen el radical tiol, tales como 2-Mercaptoetanol y la Cisteína. Las subunidades de IgM poseen constantes de sedimentación 7S y un peso molecular de 180,000, conservando sus características de antigenicidad, pero perdiendo la actividad de anticuerpos plurivalente, comportandose como anticuerpo univalente que al combinarse con el antígeno, no origina complejos suficientemente grandes como para precipitar o aglutinar. Esta prueba es útil para detectar portadores crónicos. (Anderson et al, 1964).

Prueba de Rivanol: Cuando es agregado a un suero el Rivanol (2-etoxi-6,9 diaminolactato de acridina) precipita las proteínas del mismo excepto las globulinas de la clase IgG. Por lo tanto, el uso de Rivanol sirve para separar las globulinas de migración rápida como las IgM en animales vacunados, hay una marcada caída del título del suero tratado con Rivanol; mientras que en animales infectados hay una ligera disminución se mantiene igual, o es más alto que en el suero no tratado.

El Rivanol puede causar cierta precipitación de las IgG, provocando una ligera disminución del título real del suero para esa inmunoglobulina. Es una de la técnica más recomendadas en la actualidad, por su elevada especificidad y por ser de fácil realización e interpretación (Anderson, - 1964).

Prueba de Tarjeta: La prueba de tarjeta o del antígeno tamponado, llamada también la técnica del Rosa de Bengala, es una prueba de aglutinación macroscópica, rápida, que se efectúa con una sola dilución y es selectiva ya que detecta solamente las globulinas IgG.

Es una prueba útil como método de vigilancia en zonas libres de infección, donde no se emplea vacunación. (Rose y Roepke, 1957,1964; Lambert y Amerault, 1962; Morgan et al, 1969; Pilet et al, 1972).

Las IgG se producen ligeramente despues de la aparición de las IgM, tanto en animales infectados como vacunados. En estos casos hay niveles adecuados de IgG para reaccionar con el antígeno tamponado, antes que los anticuerpos combinados IgM hayan alcanzado títulos diagnósticos en las pruebas convencionales. Se ha demostrado que es poco sensible, originando reacciones falsas negativas hasta en un 10% de muestras. Se recomienda su uso como prueba de rutina preliminar, complementandose con otros métodos. (Rose y Roepke, 1964; Allan et al, 1976).

Prueba de Fijación de Complemento: Es una excelente prueba para el diagnóstico de Brucelosis; es un procedimiento sensible y específico para descubrir anticuerpos a Brucella.

El método con 50% de hemólisis es el más exacto y ofrece excelentes resultados, pero requiere de mucho tiempo. Tanto la IgG₁ como las IgM bovinas, fijan el complemento de cobayos. Mediante esta prueba se ha demostrado que la correlación entre la infección y la reacción positiva, es más estrecha y coincidente que en la aglutinación, y causa menos interferencia con anticuerpos heterospecíficos. La Fijación de Complemento a menudo resulta positiva en infecciones crónicas, cuando ya la aglutinación tiende a desaparecer y revela títulos bajos o se ha hecho negativa. (Alton et al, 1975).

Prueba de Ouchterlony: Es una prueba de inmonodifusión en gel, también denominada de doble difusión. Consiste en depositar el antígeno y el

anticuerpo en pocillos cortados en un gel de agar, donde difundirán uno - hacia el otro y precipitan, formando una línea opaca en la región donde - se encuentran en proporciones óptimas. Es una prueba sencilla, sensible y de gran utilidad en el diagnóstico de Brucelosis. (Ouchterlony, 1973).

c) Técnicas de reciente desarrollo.

Prueba de ELISA - ELA: La prueba de ELISA es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas. ELA son anticuerpos ligados a enzimas. Usualmente se conjuga una enzima (peroxidasa) con el anticuerpo dirigido contra el antígeno, este se fija a una superficie y se incuba con el suero problema, posteriormente se incuba con antiglobulina marcada con una enzima.

La actividad enzimática se relaciona a la cantidad de anticuerpo fijado, y resulta en un cambio de color que se puede medir por colorimetría (Lamb et al, 1979).

Prueba de Hemólisis Indirecta: La prueba hemolítica indirecta consiste en que un antígeno soluble (lipopolisacárido) se fija a eritrocitos, de manera que cuando se añade complemento este lisará a los glóbulos rojos si hay anticuerpo específico contra el antígeno soluble (Corbel y Day, 1973; Plackett, et al, 1976).

Prueba de Inmunodifusión Radial con Antígeno Poli B: Es una prueba de inmunodifusión en gel, basada en el uso de un agar impregnado de antígeno, en el cual se cortan dos o más pozos redondos de un diámetro de 3 a 4 mm, que nos permitirá la medición de anticuerpos. (Mancini et al, 1965; Becker, 1969; Vaesman, 1969; Heremans, 1971).

El uso de las técnicas de inmunodifusión en gel, junto con antígenos solubles (polisacáridos) vienen a constituir una gran contribución en el diagnóstico serológico de Brucelosis, ya que son sencillas, rápidas, sensibles y específicas y además permiten diferenciar animales vacunados de infectados. Sin embargo Alton (1977), sugiere 3 métodos de evaluación de pruebas serológicas, en la Brucelosis bovina: 1. Comparar una nueva -- prueba con una ya establecida, utilizando un gran número de sueros sin co nocer el "estatus" de infección de los animales individuales. 2. Tratar de establecer bacteriologicamente el "estatus" de infección de los animales cuyos sueros están siendo probados, al muestrear el animal vivo o al cultivar tejidos colectados al momento de la necropsia. 3. Evaluar la eficacia de una campaña de prueba y sacrificio, con un cierto número de hatos utilizando la nueva prueba y comparando los resultados con una prueba ya establecida, en un número igual de hatos similares.

Jones et al, (1980) sugieren que el tercer método debe ser la próxima etapa en evaluar la prueba de inmunodifusión radial.

d) Diagnóstico de inmunidad celular.

En la respuesta inmune ocurren interacciones de células, en general estas células son linfocitos los que además de interactuar con otros linfocitos lo hacen con macrófagos que han fijado antígenos (Roitt, 19779). Existen varias pruebas diagnósticas de inmunidad celular, tales como: -- Prueba de Inhibición de la Migración de Leucocitos (LIF) circulantes; cuando ocurre el contacto entre un antígeno específico y su linfocito sensibilizado, provoca que este se active iniciándose una serie de cambios metabólicos. Como resultado de esta activación se producen y liberan linfo-

cinas, responsables de varias actividades biológicas que se pueden detectar in vitro.

Los linfocitos T son capaces de producir el factor de inhibición de la migración normal de células móviles como son macrófagos y leucocitos polimorfonucleares, de tal manera que la linfocina producida por el linfocito T evitará que los leucocitos continúen migrando, acumulando una población de leucocitos en el área cercana al linfocito T productor.

El factor inhibitorio de los leucocitos (LIF) es muy similar al factor inhibitorio de los macrófagos (MIF), pero en realidad se trata de factores diferentes. El LIF no inhibe la migración de monocitos o macrófagos mientras que el MIF inhibe macrófagos y monocitos pero no granulocitos. La producción y detección in vitro de este factor se acepta como una correlación de hipersensibilidad retardada. Así que cuando un antígeno se pone en contacto con los linfocitos de un animal y estos sintetizan LIF, se acepta que el animal tuvo un contacto previo con el antígeno usado y que desarrolló una respuesta inmune celular. Este es un método in vitro, útil para evaluar la respuesta celular (Rocklin, 1974; Clausen, 1976).

Determinación de linfocitos T y B; las células T entran en la circulación después de diferenciarse en el timo, como células, mientras que los linfocitos B se encargarán de la inmunidad humoral en la producción de anticuerpos.

Las técnicas de detección de las células T y B han sido ampliamente utilizadas en diferentes especies animales, con aplicación diagnóstica - clínica principalmente. La determinación del porcentaje de linfocitos T y B en la sangre, proporciona una valiosa información respecto al funcionamiento del estado inmune del animal.

La formación de rosetas espontáneas para linfocitos T que presenta al colocar linfocitos sanguíneos frente a eritrocitos de carnero, ocurre como resultado de la afinidad configurativa por parte de los linfocitos T hacia la estructura de los eritrocitos; mientras que los linfocitos B presentan receptores para el fragmento C₃b por lo que, si los eritrocitos de carnero cubiertos de anticuerpos específicos de la clase IgM y con C₃b, se ponen en contacto con dichos linfocitos, son capaces de formar rosetas indirectas; como presentan cantidades apreciables de inmunoglobulinas en la superficie de su membrana, pueden dar resultados positivos a la prueba de inmunofluorescencia, si utilizamos un conjugado de anti-inmunoglobulinas. La fluorescencia específica se hará visible, ya sea en forma de anillo alrededor de la célula o como puntos sobre la superficie (Fudenberg, 1980)

Algunas bacterias como las brucelas son capaces de vivir y continuar su crecimiento en el citoplasma de los macrófagos, después de haber sido fagocitadas. Los macrófagos, según su estado de maduración, varían en su capacidad para destruir esas bacterias después de haberlas ingerido.

La inmunidad (específica y no específica) se puede transferir a un receptor normal con linfocitos, pero no con macrófagos o suero de un animal inmune, lo cual sugiere que la inmunidad específica es mediada por células T. Así, la especificidad está a nivel de la reacción inicial de la Célula T con su antígeno; mientras que inmunidad específica procede de la capacidad que adquieren los macrófagos, para destruir cualquier organismo que haya sido fagocitado.

Prueba de Transformación Blástica: La proliferación de células sensibles, después del contacto con el antígeno específico y su cambio de morfología, apareciendo grandes células blásticas con núcleo pálido y cito-

plasma basófilo ha sido utilizado como una prueba in vitro, para medir hipersensibilidad celular. Según los estudios, existe correlación con los resultados in vivo. El grado de estimulación se aprecia mediante el porcentaje de blastos presentes en el cultivo; tiene el inconveniente de que los linfocitos B también pueden ser transformados y además los linfocitos no sensibilizados pueden entrar en división (Roitt, 1979).

Pruebas de Alergia: En algunos países se emplean estas pruebas para la detección de Brucelosis en ovinos, caprinos y cerdos. Las pruebas de alergia son útiles en poblaciones no vacunados, en encuestas epidemiológicas en zonas de baja incidencia donde existe un bajo número de animales serológicamente positivos.

Se han empleado varios procedimientos para inocular alérgenos de brucelas por vía intradérmica o subcutánea; los alérgenos de brucelas generalmente son una mezcla de proteínas y polisacáridos o lipopolisacáridos antigenicos, los cuales en su composición desde células enteras hasta extractos (Alton et al, 1975).

VIII) Características del Antígeno Polisacárido B.

El polisacárido (Poli B) se encuentra presente en la superficie celular de cepas de brucelas lisas, pero solamente en el citoplasma de cepas rugosas de Br. melitensis (B115) según las investigaciones realizadas por Díaz et al, (1978) con experimentos de absorción de cepas de Bruccella spp. (rugosas y lisas) y extractos sonicados de las mismas células.

Dichos resultados fueron confirmados por Moreno et al, (1979), cuando las fracciones solubles del citoplasma y de la membrana celular fueron extraídas con ácido tricloroacético. El Poli B pudo ser aislado solamente de la fracción citoplásmica.

En general las diferentes investigaciones que han analizado químicamente al Poli B, revelan diferentes concentraciones en sus componentes químicos, lo cual puede estar relacionado con la pureza del antígeno o bien por el método de análisis utilizado para determinar su concentración.

Sin embargo, las preparaciones de Poli B usualmente contienen: proteínas, 2 keto 3 - deoxioctonato (KDO) y heptosas.

Pero los resultados de análisis recientes y más definidos revelaron que el Poli B contenía: 83% de carbohidratos, 5% de ácidos nucleicos, 5% de proteínas y no contenía heptosas, KDO, ni lípidos, como previamente había sido determinado (Moreno et al, 1979,1981; Carroll, 1980).

Las investigaciones químicas realizadas por Lacave y Asselineau -- (1969), muestran los resultados de un importante estudio comparativo entre una fracción polisacárido (PS) y una fracción lipopolisacárido (LPS) aisladas de Br. melitensis, y concluyeron que en ambos casos había presencia de ácidos nucleicos, los cuales fueron eliminados por precipitación en alcohol. Este tratamiento también retiró un polisacárido ácido que contenía principalmente ácido galactosaminurónico, el cual pudiera ser el antígeno Vi.

La principal diferencia entre el LPS y PS es la presencia de pequeñas cantidades de lípido A (1%) en el LPS. El lípido A, ya se ha aislado de enterobacterias o brucelas, contenía glucosamina y ácidos grasos, pero el ácido Beta hidroximiriístico no pudo ser detectado.

El comportamiento de fracciones de LPS y PS sobre columnas de DEAE-celulosa es muy similar y las pequeñas diferencias observadas pueden ser explicadas por cambios debidos a la solubilidad del lípido presente en el LPS.

Ambas fracciones (LPS y PS) contienen ácido 2 keto-3hidroxi-octulosónico, una mezcla de D y L-glicero-Dmanoheptosas, una gran cantidad de glucosa, galactosa, 3,6-dideoxihexosa (colitosa o abequesa) y un azúcar metilada comportandose como un derivado metilado de dideoxihexosas. Pequeñas cantidades de ramnosa en PS y de arabinosa en LPS pueden ser debidas a contaminantes.

Mediante estudios de Díaz et al (1968) y Díaz y Levieux (1972) demostraron que el complejo LPS es el mayor componente antigénico involucrado en las pruebas serológicas, utilizadas de rutina para diagnóstico de la brucelosis, así mismo que el LPS tiene la especificidad de superficie de las especies lisas de brucela. Por otro lado, el Ps evidentemente no juega ningún papel en las pruebas de aglutinación porque los anticuerpos contra el PS presentes en animales infectados no interfieren con los títulos de aglutininas al ser removidos por absorción.

IX) Mecanismos de inmunidad y prevención.

En esta enfermedad, los fenómenos de inmunidad celular poseen una extraordinaria importancia. Las brucelas presentan mayor supervivencia en células mononucleares procedentes de animales no inmunes que en células procedentes de animales inmunizados de forma activa (Kaneene, et al 1979).

Ha sido observado que este cambio a nivel celular, coincide con la aparición de una hipersensibilidad retardada. Estos fenómenos de inmunidad celular son relativamente inespecífico y afectan también a bacterias intracelulares heterólogas.

En la Brucelosis juegan un papel importante tres sistemas de defensa, los cuales actúan coordinadamente, interactuando entre ellos a fin de com-

batir la infección. Tales sistemas son: 1. Sistema inespecífico no inducido, quiere decir que son independientes de previo contacto con el antígeno. También es denominado ^Aresistencia y comprende barreras anatomofisiológicas, bioquímicas, y celulares. 2. Inmunidad humoral la cual es demostrable por los elevados títulos de anticuerpos producidos, representados por inmunoglobulinas IgG e IgM. 3. Inmunidad celular, la cual está centrada en la actividad de los linfocitos T y los macrófagos (Tizard, 1979).

Desde hace muchos años, se han hecho intentos a fin de desarrollar una vacuna que sea segura y suficientemente inmunogénica para el control de la enfermedad natural. Los estudios continuaron hasta encontrar cepas no virulentas y dos cepas fueron estudiadas minuciosamente. La primera - conocida como cepa 19 de Br. abortus, la cual fué originalmente aislada de leche y mostró ser: lisa, no virulenta, pero muy inmunógena.

La cepa 19 es ahora usada extensivamente como vacuna viva y tiene la ventaja de que cuando es inoculada a terneras de 3 a 4 meses de edad, estimula el desarrollo de alta inmunidad y una transitoria producción de aglutininas, que desaparecen hacia la madurez sexual de la ternera.

La segunda vacuna recibió una amplia atención, fué preparada de una cepa avirulenta conocida como 45/20. Esta cepa es rugosa y tenía la ventaja de que no estimulaba la producción de aglutininas contra antígenos de cepas lisas de Br. abortus, así que no interfería con la detección serológica de la infección natural. Pero desgraciadamente se descubrió que la cepa no era estable, y que podía dar origen a mutantes lisas y virulentas. Por eso, ha sido desarrollada una vacuna muerta 45/20 con adyuvante utilizada para el control de la enfermedad.

Después de la vacunación con 45/20 la prueba de Tarjeta da resulta-

dos negativos más temprano que la Fijación de Complemento en un animal no infectado. El título de la prueba de aglutinación en tubo no se elevará significativamente y pronto es negativo (Buxton y Frasser, 1977).

- a) Importancia de la Vacunación con Dosis Reducida de Br. abortus cepa 19 en bovinos adultos.

El control de las enfermedades debe realizarse con dos objetivos fundamentales: obtener mayor eficiencia en la producción de alimentos de origen animal y prevenir las enfermedades transmisibles al hombre. Los métodos de control se basan por lo general en la aplicación de vacunas, eliminación de animales infectados, y medidas orientadas a reducir los riesgos de infección.

En la actualidad los métodos de inmunización recomendados con mayor frecuencia son: la vacuna de cepa 19 y la bacterina 45/20 de Br. abortus, cada una con una serie de ventajas y desventajas. Así mismo, en cuanto a vacunar animales adultos y becerras, también existen ventajas y desventajas.

En la vacunación de adultos, la inmunidad en el hato es rápida, relativamente económica y fácil, pero existen más problemas de diagnóstico - pos-vacunal. Mientras que la vacunación de becerras trae consigo inmunidad lenta del hato pero es relativamente costosa, puede ser complicada y tiene un mínimo de problemas en el diagnóstico vacunal.

De tal manera que tomando en cuenta que existen diferentes ventajas con respecto a la vacunación de todo el hato en un mismo día, se hace necesario una conciente elección del producto y método a emplear. Sin embargo es evidente que en hatos con numerosos animales, donde la prevalencia de infección es alta, sería recomendable vacunar adultos, previa iden-

tificación de reactores (Nicoletti, 1976).

El éxito para eliminar la Brucelosis, está inversamente relacionada con el número de animales del hato, ya que el porcentaje de infectados - tiende a incrementarse, por lo que medidas tendientes a contrarrestar este problema pueden considerarse de significativa importancia. Berman et al (1960), han concluido que los hatos grandes de ganado lechero presentan con frecuencia serios problemas para establecer con éxito programas para el control de brucelosis.

En 1975 se iniciaron estudios en Florida para determinar si vacunando bovinos adultos con cepa 19 de Br. abortus y evaluando diferentes vías de aplicación y diferentes dosis, resultaban útiles para eliminar la Brucelosis en hatos seleccionados (Nicoletti, 1976). Los efectos de la vacunación fueron evaluados por cinco métodos serológicos, además se hicieron estudios bacteriológicos. Las observaciones estaban dirigidas a establecer si había persistencia de cepa 19, posibles pérdidas en la producción de leche, así como problemas abortivos.

Los resultados revelaron una gran reducción en los porcentajes de infección en los hatos, independientemente de la dosis vacunal o vía de vaacunación empleada. Sin embargo con la inoculación conjuntival, se observó menor reacción post vacunal y la prueba de Fijación de Complemento fué menos sensible. Por otro lado se observó que en menos del 1% de los animales vacunados se presentaron abortos o infecciones persistentes en ubre, a consecuencia de la vacunación. Así mismo se observó que los problemas de interferencia en el diagnóstico serológico, causados por la vacunación en adultos con cepa 19, disminuyeron mediante el uso de la dosis reducida y pruebas serológicas suplementarias.

La vacunación en el ganado adulto resultó ser un método aceptable desde el punto de vista económico, eficiente, y práctico, para desarrollar la inmunidad de los hatos, con una gran reducción de pérdidas causadas por la Brucelosis (Nicoletti, 1976). Estas investigaciones revelaron que no es recomendable vacunar al final de la lactación ya que hay menos protección y esta es menos efectiva.

Las investigaciones posteriores trataron de evaluar más profundamente la experiencia anterior. Asi Plommet y Fensterbank (1976) realizaron estudios de vacunación con dosis reducida de cepa 19 Br. abortus administrada por vía conjuntival, y los resultados revelaron que es confiable, - cuando es aplicada a bovinos adultos pero que deben hacerse evaluaciones bajo condiciones de campo.

Los estudios de Nicoletti et al (1978a y 1978b), comparando las vías subcutánea y conjuntival con dosis estandar y reducida además probando los bovinos por serología y bacteriología, confirmaron los estudios de Plommet y Fensterbank (1976).

Las investigaciones recientes sugieren que los hatos vacunados con cepa 19 con dosis reducida, han logrado disminuir en un significativo porcentaje el número de vacas infectadas, en comparación con métodos de pruebas prevacunales y sacrificio de reactivos. La cepa 19 se aisló de secreciones en menos del 1% de vacas vacunadas durante la primera prueba despues de la vacunación, y más tarde todas resultaron negativas, tanto en serología como en bacteriología. Asi mismo, la prueba de la tarjeta resultó sumamente sensible, para emplearse como método único en la identificación de reactivos. Mientras que la prueba de Fijación de Complemente es menos sensible (Nicoletti, 1981), por lo que se recomienda como método de prueba

en animales vacunados en edad adulta con dosis reducida.

La vacunación prácticamente elimina la enfermedad clínica y reduce la exposición a la infección de los bovinos susceptibles, encontrándose una reducción de la infección en el 80% del hato, 6 meses postvacunación (McDiarmid, 1954, 1957; Berman et al, 1960). Estas consideraciones confirman la conclusión de Manthei (1952), de que la administración de cepa 19 no altera el curso de la enfermedad en bovinos en etapa de incubación.

OBJETIVOS

Esta tesis se realizó con el fin de alcanzar dos objetivos principales, cada uno de ellos con diferentes metas:

1. Comparar pruebas usadas rutinariamente en el diagnóstico de Brucelosis con la técnica de inmunodifusión radial (IDR), empleando el antígeno "polisacárido B" y sueros de bovinos vacunados con dosis reducida de Br. abortus cepa 19. Para llegar a este objetivo, fué necesario primero cubrir las siguientes metas:

- a) Extracción de antígeno polisacárido B (Poli B), a partir de una cepa rugosa de Br. melitensis.
- b) Determinar la concentración del Poli B.
- c) Titulación del antígeno Poli B.
- d) Implementación de las técnicas de IDR, Ouchterlony, aglutinación en tarjeta, aglutinación en tubo, prueba de Mercaptoetanol, aglutinación con Rivanol y Fijación de Complemento.
- e) Estudiar el comportamiento de las diferentes pruebas, con sueros colectados de animales infectados en forma natural con Br. abortus y sueros colectados a diferentes períodos posteriores a la vacunación con dosis reducida de vacuan cepa 19.

2. Obtener información epizootiológica sobre la infección de chiguires de Venezuela con diferentes especies y biotipos de microorganismos del género Brucella. Las metas consideradas para el logro de este objetivo son las siguientes:

- a) Aislar e identificar cepas de Brucella, a partir de muestras de tejidos de chiguire, colectadas en Venezuela
- b) Obtener la biotipificación de las cepas aisladas.
- c) Determinar se los biotipos aislados en chiguire son equivalentes a los aislados en bovinos de los Llanos de Apure, Venezuela.
- d) Determinar el posible papel del chiguire como reservorio de Brucella relacionando las tasas de anticuerpos e infección con la edad de estos animales.

MATERIAL Y METODOS

Para poder alcanzar los objetivos fijados para esta tesis, fué necesario realizar dos proyectos diferentes, los cuales se describen a continuación en forma independiente:

Proyecto N° 1. Esta investigación se enfocó al estudio de diferentes procedimientos para diagnosticar la Brucelosis en bovinos adultos, vacunados con cepa 19. Los procedimientos empleados fueron los siguientes:

a) Producción de Antígeno Polisacárido B (Poli B).

Se utilizó una cepa de *Br. melitensis* (115)*, la cual consiste en un cultivo rugoso del microorganismo. Esta bacteria fué cultivada en frascos de Roux, conteniendo medio sólido de Tripticasa Soya Agar, o en fermentadores automáticos con medio líquido, siguiendo las técnicas recomendadas por Alton et al (1975). A las 48 horas de incubación se procedió a la cosecha del crecimiento, utilizando una solución 0.15M de NaCl con estas células cosechadas fueron lavadas en dos ocasiones, centrifugando a 5,000 g durante 30 minutos cada vez. Después de la segunda lavada se centrifugaron nuevamente y el paquete celular se pesó con el objeto de determinar la cantidad de agua deionizada que se debería agregar para obtener una suspensión adecuada. Se recomienda en la literatura resuspenderlas en 5 veces su peso en el agua a 4°C (1g-1ml). A continuación se agregó un volumen igual de ácido Tricloroacético, 0.5 N y se mantuvo la suspensión a 4°C bajo constante agitación magnética durante 18 horas. La suspensión fué nuevamente centrifugada durante 30 minutos a 5,000 g, manteniéndose a 4°C; el sedimento fué eliminado, mientras que el sobrenadante fué sometido

* Proporcionada por la Dr. Lois M. Jones, de la Universidad de Wisconsin, U.S.A.

a nuevos procedimientos. El primer paso fué ajustar el pH a 6.5, usando para esto NaOH (primero al 1M y despues al 0.1M). El siguiente paso fué agregar 5 volúmenes de etanol al 95% (frío) con el fin de propiciar un proceso de precipitación; la mezcla se dejó reposar durante la noche a -4°C. Posteriormente se centrifugó a 5,000 g durante 10 minutos, lo que permitió formar un paquete con el precipitado de aspecto blanquecino. El sobrenadante se eliminó, mientras que el sedimento se resuspendió en proporción 1:10 del volúmen original utilizando agua deionizada; el pH se ajustó a 7.0 con NaOH al 0.1M.

El producto se sometió a un proceso de diálisis durante 5 días, en agua deionizada a 4°C, cambiando cada 5 horas.

Finalmente se procedió a un nuevo ciclo de centrifugación, esta vez a 10,000 g durante 30 minutos, eliminandose el sedimento. El sobrenadante fué considerado como antígeno Poli B. Esta técnica fué originalmente descrita por Díaz et al (1979).

b) Determinación de la Concentración de Antígeno Poli B.

Para conocer la cantidad de polisacárido contenido en cada ml de solución del antígeno, se utilizó la técnica descrita por Dubois et al, - (1956), la cual consistió en lo siguiente:

Se usó ácido sulfúrico a 95.5% con una densidad de 1.84; Fenol al 5% en agua destilada solución Glucosada (conteniendo 10,20,30,40,50,60 y 70 microgramos de Glucosa) y solución de Poli B. Se utilizaron una serie de tubos de ensayo con un diámetro entre 16 y 20 mm, pipetas volumétricas de 1 y 2 ml y matraces aforados de 5, 10, y 100 ml.

En cada uno de los tubos se colocaron 2 ml de una solución de azúcar

y 1 ml de Fenol al 5%, luego se dejó caer rápidamente 5 ml de ácido sulfúrico.

En los tubos problema se colocaron 2 ml de Poli B, 1 ml de Fenol al 5% y 5 ml de ácido sulfúrico. Los tubos controles (blanco) contenían agua destilada. Se dejaron en reposo 10 minutos; después se mantuvieron en agitación en baño maría a 25-30°C durante 15 minutos. La lectura se hizo en el espectrofotómetro de Beckman a 490 mm de absorbancia.

Las cantidades de azúcar del polisacárido se determinaron por referencia a una curva estandar de glucosa.

Este antígeno fué utilizado en las pruebas de IDR y Ouchterlony (en gel de agar al 0.8%) para identificar la presencia de anticuerpos contra Brucella en sueros de bovinos. Previamente se le determinó al Poli B la concentración y fué evaluado a diferentes diluciones con amortiguador de pH 8.6, contra sueros estandar. Posteriormente se sometió a pruebas de inmunoelectroforesis y contrainmunoelectroforesis.

c) Sueros de Bovinos

Se examinaron 1,369 sueros* de animales correspondientes a 198 bovinos Holstein, colectados como parte de un estudio previo de vacunación en bovinos con dosis reducida de cepa 19 (Flores Castro et al, 1979).

Cuarenta y nueve sueros eran procedentes de animales infectados en forma natural con Br. abortus, en los cuales se había demostrado previamente la presencia del microorganismo. El resto de los sueros fueron colectados de 149 vacas vacunadas siendo adultas, con una dosis reducida de 3×10^9 de la cepa 19 aplicada por vía subcutánea; cada animal fué sangra-

* Proporcionados por el Departamento de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, México.

do antes de la vacunación y posteriormente a los 5, 20 y 42 días, así como a los 2,3,4,5,6 y 7 meses siguientes a la aplicación de la vacuna.

Es importante señalar que en el estudio original de Flores Castro et al (1979), se encontró que 15 de las 149 hembras vacunadas abortaron, entre los 2-3 meses siguientes a la vacunación, mientras que en un lote de 49 vacas no vacunadas que se incluyeron en el estudio, habían abortado 20, lográndose el aislamiento de Br. abortus en 2 fetos de estos animales. Todos los sueros se sometieron a pruebas inmunológicas, para demostrar la presencia de anticuerpos contra Br. abortus.

d) Pruebas Serológicas

Las técnicas serológicas incluidas en el experimento fueron: Prueba de Tarjeta con antígeno acidificado, tamponado. Prueba de Aglutinación en Tubo, prueba de Aglutinación en Tubo con Mercaptoetanol, prueba de Aglutinación con Rivanol, prueba de Fijación de Complemento* y las pruebas de Inmunodifusión en Gel (IDR y Ouchterlony). Los procedimientos utilizados en cada prueba son los descritos por Alton et al (1975,1977 y 1978); Nicoletti (1978a y 1978b); Díaz et al (1979) Jones et al, (1980).

* Mediante la prueba de Fijación de Complemento fueron probadas las sangre correspondientes al 5° 6° y 7° mes post-vacunación y solo 11 de las 49 infectadas en forma natural por no tener suficiente suero para la prueba.

Proyecto N° 2.

Este estudio se realizó con el fin de obtener información epizootiológica sobre la infección por brucelosis en Chigüires de Venezuela.

a) Animales.

Se estudiaron 201 chigüires, 101 machos y 100 hembras, los cuales fueron muestreados en 3 hatos: el primero (Hato El Frío) con una extensión de 78,000 hectáreas, con una población bovina de 36,000 y una población estimada de chigüires de 40,000. Las muestras fueron tomadas en dos diferentes sitios, suficientemente separados (10 Kms) para ser considerados aparte, uno llamado El Frío Norte y el otro El Frío Sur. El segundo hato - (Centro de Recría) perteneciente al Ministerio de Agricultura y Cría (MAC), con una extensión de 6,000 hectáreas, una población bovina de 3,600 y un estimado de 3,000 chigüires. El tercer hato (Turagua), en realidad dos hatos bajo una misma administración, con una extensión de 65,600 hectáreas, una población bovina de 22,000 y un estimado de 15,000 chigüires. Estos dos hatos fueron considerados separadamente (7 Kms entre uno y otro) y llamados Turagua Este y Turagua Oeste.

b) Colección de Muestras.

En este estudio se aprovechó la cosecha anual de los chigüires por los rancheros (para el consumo de la carne y la venta de las pieles). Típicamente los animales son reunidos por hombres a caballo, y llevados a un determinado sitio en el hato, donde son sacrificados por contusión craneal por otro grupo de rancheros.

Las muestras de sangre se obtuvieron al hacer un corte en la vena

yugular, colectándose dos tubos de ensayo, cada uno con 15 ml de sangre. Los tejidos tomados para intentos de aislamiento (de Brucella) fueron bazo ganglios mesentéricos y retrofaríngeos (conservados en bolsas de plástico).

Las muestras de sangre y tejidos fueron llevadas a un laboratorio de campo, donde se centrifugó la sangre a fin de obtener el suero. Todo fue mantenido en refrigeración y luego transportadas en una cava con hielo común hasta el laboratorio (Laboratorio de Brucelosis del Instituto de Investigaciones Veterinarias, Maracay, Venezuela) donde fueron procesados por serología y bacteriología.

c) Pruebas Serológicas.

Al igual que en el Proyecto N° 1, los sueros de los chigüires - - fueron sometidos a las mismas pruebas serológicas antes descritas, excepto fijación de complemento, ya que se ha demostrado mediante estudios serológicos en esta especie animal (realizados por Bello et al 1976) que los sueros siempre resultaron anticomplementarios.

d) Exámenes Bacteriológicos.

Las porciones de bazo y ganglios linfáticos (mesentéricos y retrofaríngeos) de cada chigüire fueron procesados de la siguiente forma: se lavaron en solución al 0.85% de NaCl, se cubrieron con alcohol al 95% y se flamearon. Se colocó una espátula caliente en la muestra de bazo, se tomó un trozo de un cm³ aproximadamente y se sembró deslizando sobre la superficie de medios de cultivos sólidos, adicionados con 5% de suero fetal bovino (GIBCO) en placas de Petri. Los medios utilizados fueron Tripticasa Soya Agar, Albimi, y Kuzdas Morse; los ganglios se maceraron y homogeneizaron en un homogenizador Ten Broeck, con solución al 0.85% de NaCl pH 6.8

se sembraron con asa de platino en los mismos medios de cultivos.

i) Cultivo de las muestras.

Las muestras fueron incubadas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 10% durante 9 días, con revisiones a partir de las 48 horas de sembradas.

ii) Identificación de los Aislamientos.

La morfología de las colonias fué observada en el microscopio estereoscópico según el método de Henry (1933). Se consideraron como posibles brucelas todas las colonias observadas que eran translúcidas, redondas, de bordes lisos, convexas y con un diámetro aproximado de 2-2.5 mm ligeramente opacas y de un color gris azulado. Muy pequeñas dependiendo de la población de brucelas, y/o contaminantes en la placa, observandose variaciones de color de acuerdo al tamaño.

Las características morfológicas fueron observadas en cada uno de los medios utilizados.

Se prepararon frotis sobre portaobjetos y se tiñeron mediante la tinción de Gram (1884) y Köster modificado (Christofferson y Ottensen, 1941).

Se registraron como posibles brucelas, aquellas colonias que con la tinción de Gram permitieron observar cocobacilos muy pequeños, de color rosado Gram negativos. Mientras que, con la tinción de Koster cuando se observaron cocobacilos de color naranja, sobre un fondo azul.

iii) Selección de Colonias.

Varias colonias representativas con características coloniales de Brucella, se sembraron en tubos de ensayo con agar inclinado (agar papa y Tripticasa Soya Agar) y en placas de Petri (Tripticasa Soya Agar). Los

tubos se incubaron a 37°C con y sin CO₂; con y sin suero.

Las placas se sembraron por agotamiento para observar áreas densas de colonias y colonias bien aisladas, las cuales se observaron en el microscopio estereoscópico.

Prueba de Acriflavina: Se utilizó una solución de 1:1000 de Acriflavina, se colocó una gota en un portaobjeto, se tomó con asa de platino una muestra del cultivo en estudio y se emulsionó a fin de observar en el microscopio estereoscópico si se producía o no aglutinación.

Prueba de Inundación en Cristal Violeta: Para ello se utilizó una solución madre de Cristal Violeta, la cual se preparó disolviendo 2 g de Cristal Violeta en 20 ml de alcohol al 95% y 0.8 g de oxalato amónico en 80 ml de agua destilada; a partir de esta solución, se preparó una solución 1:40 en agua destilada; se tomaron 5 ml de esta solución para cubrir una placa de Petri durante 30 segundos. Se eliminó el sobrenadante con el fin de observar si las colonias aisladas habían tomado o no el colorante y para determinar si eran colonias lisas o disociadas.

iv) Prueba de Motilidad.

Se utilizó un medio de cultivo semisólido, se sembró por punción con aguja de platino y se incubó a 37°C durante 72 horas a fin de observar si había o no crecimiento bacteriano.

v) Pruebas Bioquímicas.

Prueba de la Catalasa: Mediante el uso de las técnicas de rutina (agua oxigenada al 30%), se colocó una gota en un portaobjetos y con un asa de platino se tomó una pequeña cantidad del cultivo en estudio para - así mezclar y observar la formación o no de burbujas y detectar la presen-

cia de la enzima catalasa al producirse el oxígeno libre.

Prueba de la Oxidasa: Se utilizó el método indirecto de Kovacs, - (1956) colocando una gota de reactivo sobre un papel de filtro Watman N° 1 con asa de platino (autentica) se tomó una parte de la colonia en estudio y se extendió sobre la mancha húmeda del reactivo para determinar la presencia de enzimas oxidasas por la presencia de un color rosado al producirse una semi-quinona.

Prueba de la Ureasa: Se utilizaron 2 técnicas, Stuart (1945) y - Christensen (1946) para determinar si los organismos aislados tenían o no la capacidad de hidrolizar la úrea, formando amoníaco por acción de la enzima ureasa, lo cual se hace evidente en caso de positividad por la producción de un color rosa-violáceo.

Prueba de Producción de Acido Sulfídrico (H_2S): Se utilizó la prueba de la tira de papel de filtro con acetato de plomo (Laboratorio Merck) en un tubo de ensayo con medio de cultivo de Trypticase soya agar inclinado; el cual previamente se sembró con la cepa aislada a fin de determinar si la bacteria en estudio liberaba H_2S por acción enzimática sobre los amácidos que contienen azufre, lo cual se hace visible por una reacción de color negro sobre el papel de filtro. Este se cambió cada 24 hora, durante 5 días, si había producción de H_2S .

Prueba de reducción de Nitratos: Para determinar la capacidad de - los organismos aislados de reducir el nitrato a nitrito o en nitrógeno libre, se utilizaron los reactivos A (Alfanaftilamina al 0.5%) y B (ácido Sulfanílico al 0.8%) y el método de reducción de zinc.

Prueba del Citrato: Se utilizó el medio de Citrato de Simmons en tubos de ensayo inclinados, para determinar si los organismos aislados te-

nían o no la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su metabolismo, mediante la presencia o no de crecimiento por cambios de color en el medio de cultivo.

Prueba de Sensibilidad a Diferentes Colorantes:

Con el fin de biotipificar las 23 cepas de *Brucella* aisladas se utilizaron los siguientes colorantes y reactivos los cuales se adicionaron al medio de Tripticasa soya agar en la siguiente proporción: Fucsina básica al 0.1% haciendose 3 diluciones; 1:25,000, 1:50,000 y 1:100,000; Tionina al 0.1% realizando las mismas diluciones; Violeta de Metilo al 0.1% - utilizando una dilución de 1:100,000; Safranina al 1% con una dilución de 1:5,000. Todos los colorantes se esterilizaron a 100°C durante 1 hora.

Eritritol 1mg por ml de medio cultivo; Penicilina 5 U1 por ml de medio de cultivo; ambos esterilizados por filtración.

Los medios de cultivos así preparados, se repartieron en placas de Petri colocando 20 ml en cada una de ellas. Se dejaron solidificar, se llevaron a estufa a 37°C durante 48 horas para control de esterilidad; posteriormente se sembraron las cepas en estudio y se incubaron a 37°C durante 72 horas con 10% de CO₂, las cepas que así lo requieren. Las placas fueron sembradas con suspensiones bacterinas preparadas en solución al 0.85% de cloruro de sodio estéril, manteniendo una densidad sensiblemente igual, tanto en las cepas en estudio como en las cepas de referencia - - (544-2 *Br. abortus*, 16M *Br. melitensis* y 1330 *Br. suis*). Se utilizó un asa de platino calibrada; la placa de Petri fué dividida en 4 cuartos para sembrar en cada uno de ellos la cepa de referencia correspondiente y en el cuarto restante la cepa en estudio. Al observar el crecimiento bacteriano se hicieron comparaciones de la cepa en estudio con respecto a las cepas

de referencia, en los diferentes colorantes y en las diferentes diluciones, con el fin de determinar la especie y biotipo de la cepa en estudio.

vi) Prueba de Aglutinación con Sueros Monoespecíficos.

Para determinar cual de los aglutinógenos (A o M) predominaban en los cultivos aislados, se utilizaron sueros monoespecíficos anti-A y/o anti-M. Se preparó una suspensión bacteriana densa (a partir de un cultivo de 48 horas) en 1 ml de solución al 0.85% de NaCl pH 6.8, se calentó la suspensión a 65°C en baño maría durante una hora. Los sueros se diluyeron de tal forma que los cultivos controles de las cepas de referencia (544-2 y 16M) aglutinaron en un minuto con su suero homólogo y no se observaron aglutinaciones perceptibles con otros sueros en el mismo tiempo.

En un portaobjeto se colocó una dilución del suero A o M y en cada una de ellas se agregó una gota de la suspensión bacteriana en estudio, se mezcló con el asa de platino a fin de observar si se producía o no aglutinación en un minuto.

vii) Prueba de Sensibilidad al Fago Tb.

Para las pruebas de lisotipia, se emplearon dos concentraciones del fago Tb* la dosis habitual de prueba (DHP) y una suspensión de 10^4 x DHP. El material de prueba se cultivó en tubos de agar inclinados de Tripticasa soya agar, posteriormente se lavaron con 6 ml de solución al 0.85% de NaCl pH 6.8, estéril, para producir una suspensión que contenía aproximadamente 10^9 bacterias por ml. Utilizando un hisopo de algodón estéril impregnado en la suspensión bacteriana, se sembraron placas de agar Tripticasa soya adicionado de 5% de suero. En una misma placa se sembraron dos cepas diferentes, incluyendo siempre la cepa testigo 544-2.

* Proporcionado por el Dr. G. Brown del U.S. Dept. Ag. Ames Iowa.

Utilizando una pipeta Pasteur estéril, previamente calibrado a 50 gotas por ml, se depositó una gota de la dilución del fago sobre los trazos sembrado de cada cultivo, evitando tocar el agar con la pipeta Pasteur. Las placas se dejaron en reposo durante 10 minutos hasta que las gotas del fago se secaron. Luego se incubaron a 37°C durante 48 horas, observandolas a partir de 24 horas de incubación hasta las 48 horas. Los cultivos que requería CO₂ se incubaron en una atmósfera al 10%.

Esta prueba se realizó con el fin de determinar la norma litica que siguen diversas especies de *Brucella*, lo cual se hace evidente al observar lisis en el sitio donde se colocó la gota de fago.

Las técnicas y procedimientos empleados en el punto d) son los descritos por U.S. Dept. Ag. (1965) Alton et al, (1975) Cowan, (1979) Stanier et al (1979) MacFaddin (1980).

viii) Biotipificación con Pruebas de Metabolismo Oxidativo:

Para las pruebas metabólicas se utilizaron los siguientes sustratos: Grupo I, se usó L-Alanina y L-ácido Glutámico, Grupo II, se usaron los siguientes amoníacos del ciclo de la úrea: D, L Ornitina y L-Lisina; Grupo III se usaron los siguientes carbohidratos: L-Arabinosa, D-Galactosa, D-Ribosa y D-Glucosa (Meyer y Morgan, 1962).

a) Preparación y conservación de los sustratos.

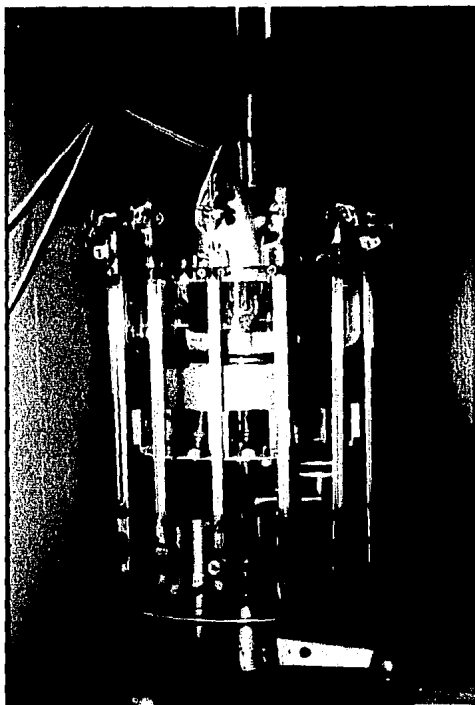
De cada uno de los sustratos se prepararon soluciones al 1%, mezclando 500 mg del sustrato en 50 ml de solución de Sorensen amortiguada con fosfatos. Se ajustó a 7.0 el pH de cada solución de sustrato y se conservaron a -20°C (Cameron y Meyer, 1953 y 1955; Meyer y Cameron 1959).

b) Preparación y normalización de las suspensiones celulares de Brucella

1. Se sembró el cultivo en tubo de ensayo con agar TSA inclinado, se incubó a 37°C durante 48 horas con 10% de CO₂ las cepas que así lo requerían.
2. Se lavó el cultivo del tubo con 8 ml de solución estéril al 0.85% de NaCl.
3. La suspensión bacteriana se sembró en frascos de Roux con agar Triptosa; se incubaron a 37°C durante 48 horas.
4. El cultivo del frasco de Roux, se cosechó con 25 ml de solución estéril de Sorensen, con un pH de 7.0.
5. Las células así cosechadas se sedimentaron mediante centrifugación a 5,000 g durante 20 minutos.
6. Las células se suspendieron en 25 ml de solución de Sorensen y centrifugadas dos veces más.
7. El paquete celular resultante se resuspendió en solución de Sorensen ajustando la concentración hasta alcanzar una turbidez en la que una dilución 1:40 corresponda a una suspensión normalizada de brucelas en reposo, según describen Cameron y Meyer (1953,1955). La densidad se correlacionó con las medidas de turbidez, efectuadas en un espectrofotómetro, empleando una longitud de onda de 420 nm. Esta suspensión normalizada contiene aproximadamente 0.8 mg de nitrógeno por ml.

En este estudio, las determinaciones manométricas se realizaron mediante el uso del aparato Warburg. (Fig. 1).

FIG. 1



Aparato de Warburg

c) Calibración de matraces Warburg y manómetros.

Es indispensable antes de iniciar cualquier experimento en el aparato de Warburg calibrar los matraces y sus respectivos manómetros, a fin de establecer constantes para estandarizar el sistema (matraz Warburg, tapón del matraz y manómetro) y evitar errores durante el experimento - (Clark, 1969).

d) Evaluación de la constante (K) del matraz Warburg.

La constante del matraz se determinó al hacer una evaluación de V_G el volúmen de la fase de gas, ya que los otros términos eran conocidos. El volúmen de la fase de gas es igual a la diferencia entre el volúmen del sistema (incluyendo el volúmen de la parte por encima de 150 mm en el brazo interior del manómetro) y el volúmen del fluido en el matraz (VI). Un método simple es encontrar H (es el cambio en mm del fluido en el brazo exterior) cuando una cantidad conocida de gas (x) es producido. Una vez conocidas H y x, tanto como T y V_x entonces se puede calcular V_G .

En este experimento la oxidación de Hidrazina a través de Ferrocianuro de Potasio se utilizó para determinar V_G y por ende K.



Ya que esto es una conversión cuantitativa la cantidad de nitrógeno producida (x) en la presencia de un exceso de Hidrazina, se calculó a partir de la cantidad de Ferrocianuro que se agregó a la mezcla de reactivos. En esta oportunidad los matraces Warburg se calibraron determinando la producción de nitrógeno, según experimentos de Clark (1969).

Para la calibración del respirómetro Warburg; se colocaron 2 ml de Ferrocianuro de Potasio (8.23 g/l) y 0.6 ml de agua destilada en el receptáculo principal del matraz, 0.5 ml de Hidrazina en el compartimiento lateral; previa lubricación del tapón de cada compartimiento lateral, se cerró herméticamente, se lubricaron los dispositivos de acoplamiento del manómetro y se acoplaron los matraces a sus respectivos manómetros. Se unió cada manómetro al aparato de Warburg para someter cada matraz al baño maría a 37°C. Se mantuvieron abiertas las llaves de los manómetros, se agitó durante 10 minutos para establecer un equilibrio entre los matraces y los manómetros, manteniendo las llaves abiertas se ajustó el líquido de Brodie (contenido en el brazo cerrado de cada manómetro) hasta el punto de referencia (150 mm). Se registró la lectura del extremo abierto de cada manómetro y se cerró la llave del extremo cerrado.

Para mezclar los reactivos del compartimiento lateral y receptáculo principal, se inclinó cuidadosamente cada manómetro. Se puso en marcha el aparato durante 5 minutos y se leyó cada 5 minutos hasta que los registros se mantuvieron sin variación; en este momento se consideró que la producción de nitrógeno era total. Utilizando todas las lecturas registradas a través de todo el experimento, se calculó V_G y K según la fórmula establecida:

$$V_G = \left(\frac{V_x P_o}{H} - V_l \right) \frac{T}{T_o}$$

V_x = 28 microlitros de N_2 (volumen teórico del gas en estudio)

P_o = 10,000 mm (presión estandar a 1 atmósfera del líquido de Brodie)

V_l = 3.1 ml (volumen contenido en el matraz Warburg)

$\infty = 0.0123$ (constante de solubilidad del gas (N_2) en el agua a $37^\circ C$)

$H = 18.5$ mm (ejemplo del matraz Warburg n°1, significa la altura de la fase gaseosa desde el matraz hasta el punto de referencia en el manómetro (150 mm).

$T = 310^\circ$ (en grados Kelvin)

$T_o = 273^\circ$ (en grados Fahrenheit)

$$V_G = \left(\frac{28 \times 10,000}{18.5} - 3.1 \times 0.0123 \right) \frac{310}{273}$$

$$V_G = 17.136 \text{ mm}$$

La constante K del sistema se determinó según la siguiente fórmula:

$$K = \frac{\frac{V_G}{T} \frac{T_o}{P_o} + v_1}{P_o} = \frac{\frac{17.136}{310} \times \frac{273}{10,000} + 0.037}{10,000}$$

$K = 1.51$ (para el matraz n°1 cuando se calibró con N_2). Así que -
 $18.5 \text{ mm} \times K = 28$ microlitros de N_2 .

La constante K se calculó para cada sistema y siempre debe ser idéntica en los experimentos sucesivos durante el uso del respirómetro. Por ello el experimento se repitió varias veces hasta que obtuvieron valores constantes.

Fué importante mantener la temperatura a $37^\circ C$, ya que las variaciones de la temperatura alteraron los registros y por ende los resultados. Por ello cuando la temperatura subió se restó este valor a la lectura registrada (porque de lo contrario se estaba registrando un aumento de presión, el cual no era debido al experimento sino a variaciones de temperatura).

e) Determinación del consumo de oxígeno de cepas de Brucella

Para cada cultivo se utilizaron 10 matraces Warburg, uno para cada uno de los 8 sustratos, uno para el control endógeno y uno para el control termobarométrico.

Cada matraz Warburg consta de tres compartimientos: el receptáculo principal donde se colocó 1.4 ml de suero de Sorensen, 1 ml de suspensión celular normalizada. En el compartimiento lateral se puso 0.5 ml de solución al 1% del sustrato respectivo; en el depósito central se colocó 0.1 ml de solución de KOH al 20% y un papel filtro de 2 cm de diámetro, doblado en tres partes. Esto corresponde a un matraz de prueba.

En el matraz de control endógeno se colocaron 1.9 ml de suero de Sorensen, 1 m. de suspensión normalizada en el receptáculo principal; 0.1 ml de solución al 20% de KOH más el papel de filtro, en el depósito central. En el matraz de control termobarométrico se colocó en el receptáculo principal 3 m. de suero de Sorensen.

Después de establecer el equilibrio entre los matraces Warburg y manómetros (como fué descrito en calibración), se puso en marcha el aparato Warburg durante 20 minutos y luego se ajustó el líquido contenido en el brazo abierto del manómetro pasó a un nivel en que rebasara los 150 mm al repetirse el procedimiento, se registró el resultado se abrió la llave del brazo cerrado y se reajustó el nivel del líquido al punto de referencia. Se cerró la llave, se efectuó dos veces más el procedimiento antes descrito y se efectuaron 3 lecturas cada una a los 20 minutos; el experimento duró 60 minutos para cada cepa en estudio, registrando lecturas y reajustando según fué necesario.

Las lecturas obtenidas fueron utilizados para obtener el valor QO_2 (N) de cada sustrato.

Determinación de los valores QO_2 (N) de cada sustrato.

1. Se calculó el total de registros manométricos observados durante 60 minutos.
2. Según indicara el control barométrico se sumó o se restó la lectura.
3. Se multiplicó el registro neto por la constante del matraz (Umbreit, et al, 1972)
4. Se dividió entre 0.8 para compensar los 0.8 mg de nitrógeno por ml.
5. Se restó la lectura del control endógeno. La cifra resultante se consideró como el valor QO_2 (N) (microlitros de consumo de oxígeno por mg de nitrógeno durante 60 minutos). Se consideró que un sustrato había sido oxidado cuando el valor QO_2 (N) es igual o superior a 50 microlitros. (Meyer y Cameron, 1961a y 1961b).

e) Determinación de la Edad de los chiguires.

Para estimar la edad de los chiguires se utilizó la técnica del cristalino (Lord, 1959 y 1963). Se extrajeron los ojos enteros del animal, utilizando un bisturí, se colocaron en formol al 10% previa identificación con el número del animal y se mantuvieron durante una semana en formol para su fijación.

Posteriormente de los glóbulos oculares se extrajeron los cristalinos se colocaron en viales de vidrio, se llevaron a un horno a una temperatura de 80°C, donde se mantuvieron durante 8 días. Se pesaron (balanza Metler) repetidamente (cada 2 días), hasta que los pesos se estabilizaron lo que indicó que ya no tenían humedad.

La edad fué estimada por el peso del cristalino, con referencia a pesos de cristalinos de animales de edad conocida informado por Ojasti (1978)

RESULTADOS

Proyecto N°1.

a) Producción del antígeno Poli B: Se logró obtener 156 ml de antígeno Polisacárido B, a partir de la cepa rugosa B115, de Br. melitensis.

b) Concentración del Poli B: El antígeno extraído fué sometido a pruebas de colorimetría para determinar su concentración de azúcares; se encontró que esta era de 73-292 microgramos por ml de antígeno expresado en relación a un estandar de glucosa.

El antígeno se evaluó además mediante pruebas de inmunodifusión doble (Ouchterlony), inmunodifusión radial, inmunolectroforesis y contra-inmunolectroforesis.

Se hicieron varias diluciones de antígeno en amortiguador de glicina al 0.1 M, en pH de 8.6. Se encontró que a la dilución 1:1 (vol/vol), se producía una línea de precipitación nítida, al compararlas con un antisueero conocido. Se demostró mediante las pruebas de inmunolectroforesis y contra-inmunolectroforesis que el antígeno tiene movilidad catódica (Fig. 1, 2).

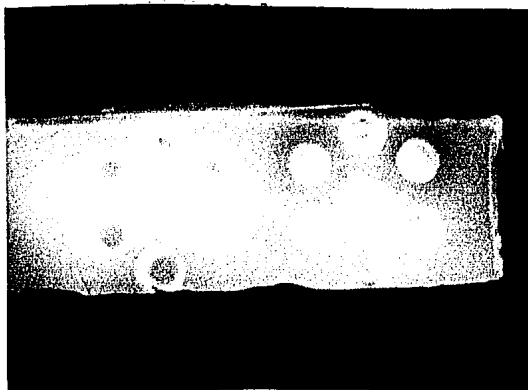
c) Exámenes Serológicos: Las pruebas de Fijación de Complemento, Inmunodifusión Doble, y la Inmunodifusión Radial, se practicaron solo en 11 de los 49 animales infectados; examinando con estos métodos a todos los animales vacunados.

Los resultados referentes al comportamiento de las pruebas en animales infectados, se presenta en el Cuadro 2. Las pruebas de aglutinación detectaron reacciones positivas en los 49 animales probados, mientras que Fijación de Complemento, Inmunodifusión Doble e Inmunodifusión Radial, identi-

FIG. 2



Prueba de Ouchterlony



Prueba de Ouchterlony

CUADRO 2

Resultados de los Exámenes Serológicos Practicados
 en Bovinos Holstein Infeccionados en forma natural
 con Br. abortus

Técnica Empleada	Número de Animales Estudiados	Número de Reactores
Prueba de Tarjeta	49	49
Prueba de Aglutinación en Tubo	49	49
Mercaptoetanol	49	49
Rivanol	49	49
Fijación de Complemento *	11	10
Ouchterlony *	11	10
Inmunodifusión Radial *	11	10

* Solo 11 sueros de los 49 sueros correspondientes a animales infectados se probaron con estas pruebas por no tener suero suficiente. Por Fijación de Complemento un suero resultó anticomplementario, el mismo resultado negativo en las pruebas de inmunodifusión en gel.

ficaron como reactivos a 10 de los 11 sueros examinados.

En el Cuadro 3 se presenta la información correspondiente al comportamiento de 149 bovinos, al ser examinados serológicamente después de la vacunación.

Las diferentes pruebas de aglutinación alcanzaron el mayor número de reactivos en las muestras colectadas 20 días después de la vacunación; posteriormente se redujo en forma gradual el número de sueros positivos. La prueba de tarjeta presentó la mayor sensibilidad, de manera que 68 de los bovinos permanecieron positivos aún a los 7 meses siguientes. La prueba de aglutinación en tubo alcanzó a identificar hasta 140 animales reactivos a los 20 días, mientras que a los 2 meses el número se redujo a 31 y finalmente permanecieron 22 animales con títulos de 1:100 o superiores aún después de los 7 meses siguientes a la vacunación. Al utilizarse la técnica de 2-Mercaptoetanol se encontró un menor número de reactivos en todos los muestreos; en los sueros colectados 20 días postvacunación se obtuvieron 59 reactivos. Este número fué reduciéndose en forma gradual, hasta el 5° mes en que solamente se encontraron 12 reactivos, los que persistieron positivos en los siguientes muestreos.

Los estudios realizados con la prueba de Rivanol solo se efectuaron en sueros colectados a los 20 y 42 días, así como a los 2, 6, y 7 meses. Los sueros de 12 animales siguieron positivos a los 6 y 7 meses postvacunación. Estos animales eran los mismos que reaccionaron positivos a Mercaptoetanol y se encontraban incluidos entre los que persistieron como reactivos a las pruebas de aglutinación en tarjeta y tubo. Siete de estos animales abortaron los 3 a 7 meses postvacunación.

La prueba de Fijación de Complemento se practicó solamente en los -

muestreos del 5°, 6° y 7° mes. En los otros muestreos solo se seleccionaron los sueros que habían resultado positivos a las pruebas de Difusión en Gel con un antígeno Poli B. Se encontraron 7 sueros que permanecieron como reactores hasta el final del estudio.

En el caso de las pruebas de inmunodifusión, se encontró que únicamente 10 animales presentaron en sus sueros líneas de precipitación a lo largo del experimento; los 128 restantes resultaron negativos en todos los muestreos.

En los Cuadros 3, 4, y 5 se presentan los resultados de los 10 sueros positivos a IDR, en comparación con los resultados obtenidos con las otras pruebas.

Todos coincidieron positivamente con la prueba de Ouchterlony, no así con los otros procedimientos. En 7 muestras se encontró correlación positiva con la prueba de tubo y Mercaptoetanol, pero solo 4 de ellos fueron positivos también a Fijación de Complemento. Por su parte, la prueba de Fijación de Complemento reaccionó positivamente con 7 sueros positivos a IDR. A pesar de que la prueba de Tarjeta es muy sensible, solamente 6 de estos sueros presentaron reacción positiva.

Los exámenes bacteriológicos practicados en muestras de leche y a partir de algunos productos de fetos de los animales vacunado, resultaron siempre negativos al aislamiento de Br. abortus. Estos exámenes fueron parte de un estudio previo, no incluido en esta tesis.

Proyecto N° 2

En el Cuadro 6 se presentan en forma resumida, los resultados de los estudios serológicos y bacteriológicos practicados en 201 chigüires captu-

CUADRO 3

Resultados de los Estudios Practicados con Sueros de 149 Animales
Vacunados con 3×10^9 de Br. abortus cepa 19 *

Técnicas Serológicas Utilizadas	Número de Reactores Positivos en los Diferentes Muestreros Post-vacunación								
	Días			Meses					
	5	20	42	2	3	4	5	6	7
Prueba de Tarjeta	39	149	133	133	133	123	102	91	68
Aglutinación en Tubo	14	140	89	31	31	29	23	22	22
Mercaptoetanol	8	59	36	28	15	15	12	12	12
Prueba de Rivanol	NP	58	34	23	NP	NP	NP	12	12
Fijación de Complemento	NP	NP	NP	NP	NP	NP	7	7	7
Ouchterlony	11	10	10	10	10	10	10	10	10
Inmunodifusión Radial	11	10	10	10	10	10	10	10	10

* Todos los animales eran serológicamente negativos al momento de la vacunación.
NP= No se probaron por no tener suero suficiente.

CUADRO 4

Evaluación de la prueba de Inmunodifusión Radial y al Antígeno Polisacárido (Poli B) de B115 en sueros de bovinos vacunados con dosis reducida (3×10^9) de Br. abortus cepa 19

Pruebas Serológicas						
Animal N°	IDR	Ouchterlony	Tubo	ME	PT	F de C
16	+	+	+	+	+	+
47	+	+	-	-	-	-
73	+	+	-	-	+	+
74	+	+	-	-	+	+
104	+	+	+	+	+	+
119	+	+	+	+	+	-
121	-	-	+	+	-	AC
151	+	+	+	+	-	-
171	+	+	-	-	-	+
177	+	+	+	+	+	+
189	+	+	+	+	-	+
Total = 11	P = 10 N = 1	P = 10 N = 1	P = 7 N = 4	P = 7 N = 4	P = 6 N = 5	AC = 1 P = 7 N = 3

Total: 10 animales positivos postvacunación. IDR: Inmunodifusión Radial
 ME: Mercaptoetanol. F de C: Fijación de Complemento. PT: Prueba de Tarjeta
 AC: Anticomplementario. P: Positivo N: Negativo.

CUADRO 5

Reactores bovinos Vacunados en relación a
pruebas serológicas

Pruebas Serológicas	Animales			
	Positivos (%)		Negativos (%)	
Inmunodifusión Radial	10/149	6.71	139/149	93.29
Ouchterlony	10/149	6.71	139/149	93.29
Tubo	7/149	4.70	142/149	95.30
Mercaptoetanol	7/149	4.70	142/149	95.30
Fijación de Complemento	7/149	4.70	142/149	95.30
Tarjeta	6/149	4.03	143/149	95.97

El numerador se refiere al número de animales positivos o negativos mientras que el denominador corresponde al número de animales estudiados.

CUADRO 6

Resultados de los Estudios Serológicos y Bacteriológicos Obtenidos en 201
Chiguires Capturados en Apure, Venezuela

Sitio Muestreados	Serología *			Bacteriología *		
	Machos (X)	Hembras (X)	Total (X)	Machos (X)	Hembras (X)	Total (X)
El Frío Norte	21/32 (66)	16/36 (44)	37/68 (54)	2/32 (6)	1/36 (3)	3/68 (4)
El Frío Sur	9/11 (82)	13/26 (50)	22/36 (60)	3/11 (27)	5/26 (19)	8/37 (22)
MAC	11/21 (52)	4/17 (24)	15/38 (40)	0/21 (0)	0/17 (0)	0/38 (0)
Turagua Este	14/18 (78)	7/8 (88)	21/26 (81)	4/18 (22)	1/8 (13)	5/26 (19)
Turagua Oeste	14/19 (74)	7/13 (54)	21/32 (66)	4/19 (21)	3/13 (23)	7/32 (22)
Total	69/101 (68)	47/100 (47)	116/201 (58)	13/101 (13)	10/100 (10)	23/201(11)

* El numerador se refiere al número de animales positivos, mientras que el denominador corresponde al número de animales estudiados.

rados en 5 sitios diferentes, pertenecientes a 3 explotaciones de ganado bovino en Apure, Venezuela. (Fig. 4).

Se estudiaron 101 machos y 100 hembras. Serológicamente se encontró que 69 machos (68%) reaccionaron positivamente a las diferentes pruebas empleadas, mientras que en el caso de las hembras 47 de ellas fueron serológicamente positivas (diferencia significativa, $\chi^2 = 9.19$). Esto hace un total de 116 (58%) animales reactivos.

En lo referente a los cultivos bacteriológicos el mismo cuadro señala que fué posible el aislamiento de cepas de Brucella a partir de 13 machos y 10 hembras (12.87 y 10% respectivamente) diferencia no significativa, $\chi^2 = 0.90$. Los aislamientos se lograron en animales capturados en 4 de los 5 sitios muestreados, resultando negativos los chiguirees del Centro de Recría del MAC, en los que se encontró solo un 40% de seroreactivos, lo que representa el porcentaje más bajo de todos los sitios estudiados.

a) Características de los Aislamientos.

Las 23 cepas bacterianas que se aislaron de los chiguirees y se identificaron como Brucella fueron sometidos a numerosas pruebas, tendientes a evaluar: características coloniales, morfología bacteriana, propiedades bioquímicas, susceptibilidad a la presencia de colorantes, susceptibilidad al efecto de bacteriófagos, aglutinación con sueros monoespecíficos y metabolismo oxidativo. Los resultados de estos exámenes se presentan en los cuadros 7, 8 y 9.

En el Cuadro 7 se muestra en forma resumida las propiedades coloniales, morfología bacteriana, características de tinción y el comportamiento ante algunas pruebas bioquímicas. (Fig. 5, 6).

FIGURA 4

El chiglire (Hydrochoerus hydrochaeris)

ESTA TESIS
SALIR DE LA
NO. 79 DEBE
BIBLIOTECA

Cuadro 7

Características Morfológicas, Tintoreales y Bioquímicas
de las 23 Cepas Aisladas de Chigüires: Identificadas como
Brucella

Características Coloniales: a) Colonias pequeñas, translúcidas.
b) Crecimiento lento.
c) No aglutinadas por Acriflavina 1:1,000.
d) No se tiñeron con Cristal Violeta.

Morfología bacteriana: Cocobacilos

Tinción de Gram: Gram negativos (color rosa)

Tinción de Köster: Bacterias naranja en fondo azul

Prueba de motilidad: Negativa

Prueba de Catalasa: Positiva

Prueba de Oxidasa: Positiva

Reducción de Nitratos: Positiva

Utilización de Citrato: Negativa

Características de las 23 cepas de *Brucella* aisladas de chigüire (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

CEPAS	Hospedador	Sexo	Requiere CO ₂	Requiere suero	TIONINA			FUCSINA			Safranina	V. metilo	1 mg/ml. Eritritol	5 UI/ml. Penicilina	Medio base	Fase colonia	Producción de H ₂ S en días					Ureasa en minutos			Sueros monoespecíficos		Sensibilidad al fago TB.		RESULTADOS				
					1:25	1:50	1:100	1:25	1:50	1:100	1:5	1:100					1°	2°	3°	4°	5°	15'	30'	60'	120'	A	M	1 DMP		10 ⁶ DMP			
3	Ch	M	si	no	4	4	4	-	-	-	-	2	4	4	4	S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	B. suis tipo 2			
30	Ch	H	si	si	-	-	-	2	3	3	4	3	4	2	4	S	++	++	++	++	++	-	-	+	+	+	+	+	+	B. abortus tipo 4			
46	Ch	M	no	si	4	4	4	1	2	2	4	4	4	4	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. abortus tipo 7			
74	Ch	M	no	si	4	4	4	1	1	1	2	4	4	4	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. suis tipo 2			
75	Ch	M	si	no	4	4	4	-	-	2	1	-	4	3	4	S	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B. suis tipo 3		
78	Ch	H	no	si	4	4	4	2	-	-	2	4	4	4	3	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. suis tipo 2		
87	Ch	M	si	no	4	4	4	-	-	-	-	2	4	-	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. suis tipo 2		
93	Ch	H	si	no	4	4	4	-	-	-	-	4	4	3	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. suis tipo 2	
102	Ch	H	no	si	4	4	4	-	-	2	-	3	4	4	4	S	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	B. suis tipo 2	
103	Ch	H	si	no	4	4	4	-	-	2	-	3	4	4	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. suis tipo 2	
105	Ch	H	si	no	4	4	4	-	-	-	-	2	2	4	3	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. suis tipo 2	
148	Ch	M	si	no	4	4	4	-	-	-	-	2	4	3	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B. suis tipo 2	
149	Ch	M	si	si	-	-	-	4	4	4	2	3	4	3	4	S	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	B. abortus tipo 4

Medio base: Tripticasa soya agar + 5% de suero

100% de desarrollo : 4

Chigüire : Ch

Cabra : C

Incubación: 37°C

75% " " : 3

Suino : S

Bovino : B

Atmósfera: CO₂ (10%)

50% " " : 2

25% " " : 1

Cuadro 8 - continuado

Características de las 23 cepas de *Brucella* aisladas de chigüire (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

CEPAS	Inoculador		Sexo	Requiere CO ₂	Requiere suero	TIOMINA				FUCSINA		Safranina	V. metilo	1 mg/ml. Eritritol	5 UI/ml. Penicilina	Medio base	Fase colonia	Producción de H ₂ S en días.					Ureasa en minutos				Sueros monoespecíficos		Sensibilidad al flego Tb.		RESULTADOS				
	Ch	H				no	si	1:25	1:50	1:100	1:25	1:50	1:100	1:5	1:100			1 mg/ml.	5 UI/ml.	Medio base	Fase colonia	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	15'	30'	60'	120'		A	M	1 DHP	10 ⁴ x DHP
																						-	+	++	+++	-	+	+	+	+		-	+	-	+
157	Ch	H	no	si	-	-	-	4	4	4	1	4	4	-	4	S	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	B. abortus tipo 1					
166	Ch	M	no	si	-	3	4	4	4	4	3	2	4	2	4	S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	B. melitensis tipo 3					
171	Ch	M	no	si	4	4	4	-	-	-	2	3	4	4	4	S	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	B. abortus tipo 4					
174	Ch	M	si	no	3	3	4	4	4	4	4	3	4	4	4	S	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	B. suis tipo 3					
177	Ch	H	si	no	2	3	4	4	4	4	-	4	4	4	4	S	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	-	-	+	+	B. suis tipo 3				
179	Ch	M	no	no	4	4	4	-	-	-	-	4	4	3	4	S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	B. suis tipo 2					
192	Ch	M	no	no	2	3	3	-	-	-	-	4	4	1	4	S	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	B. suis tipo 2				
198	Ch	H	si	no	-	2	3	1	2	3	4	4	4	4	4	S	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	-	-	+	+	B. abortus tipo 3				
199	Ch	H	si	si	-	-	-	2	3	4	4	4	4	3	4	S	+	+	++	++	++	-	+	+	+	-	-	+	+	+	B. abortus tipo 4				
16 M	C		no	no	-	4	4	3	4	4	4	4	4	4	4	S	-	-	-	-	-	+	+	++	++	-	-	+	+	+	B. melitensis tipo 3				
1330	S		no	no	4	4	4	-	-	-	-	4	4	1	4	S	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	-	-	+	+	+	B. suis tipo 1			
544-2	B		si	si	-	-	-	4	4	4	3	4	4	3	4	S	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	B. abortus tipo 1				

Medio base: Tripticasa soya agar + 5% de suero

100% de desarrollo : 4

Chigüire : Ch

Cabra : C

Incubación: 37°C

75% " " : 3

Suino : S

Bovino : B

Atmósfera: CO₂ (10X)

50% " " : 2

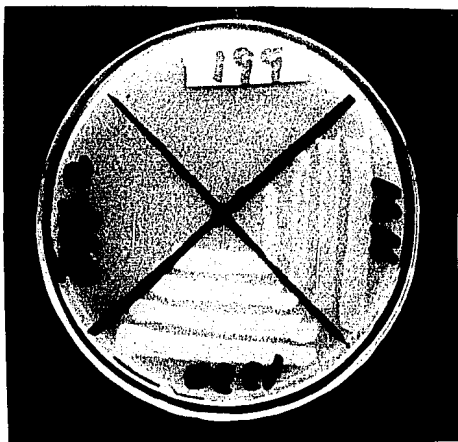
" " : 1

Cuadro 9

Caracterización metabólica de cepas de *Brucella* de identidad conflictiva
con métodos bioquímicos y serológicos

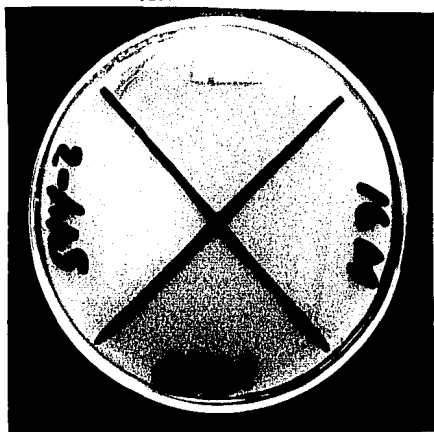
Sensibilidad a Colorantes y Serología			Metabolismo Oxidativo	
Cepas N ^o	Especie	Biotipo	Especie	Biotipo
46	<u>Br. abortus</u>	7	<u>Br. abortus</u>	5
74	<u>Br. suis</u>	2	<u>Br. suis</u>	3
75	<u>Br. suis</u>	3	<u>Br. suis</u>	2
78	<u>Br. suis</u>	2	<u>Br. suis</u>	3
102	<u>Br. suis</u>	2	<u>Br. suis</u>	3
157	<u>Br. abortus</u>	2	<u>Br. suis</u>	2
166	<u>Br. melitensis</u>	3	<u>Br. abortus</u>	7
171	<u>Br. suis</u>	2	<u>Br. suis</u>	2
198	<u>Br. abortus</u>	3	<u>Br. abortus</u>	3
199	<u>Br. abortus</u>	4	<u>Br. abortus</u>	4

FIGURA 5



Prueba de Sensibilidad a colorantes

FIGURA 6



Prueba de Sensibilidad a colorantes

Los resultados que se presentan en el Cuadro 8 señalan los requerimientos de CO_2 y suero, así como el comportamiento de las cepas ante la presencia de colorantes, producción de H_2S , ureasa, reacción con sueros monoespecíficos y sensibilidad a fagos. En base a estas características se identificaron 8 cepas como Br. abortus, biotipos 2,3,4,5 y 7; en 4 ocasiones se demostró el biotipo 4. En lo referente a Br. suis se lograron 15 aislamientos, que incluyeron los biotipos 2 (en 12 ocasiones) y 3 (en 2 casos).

En un animal (N° 166) se aisló una cepa que originalmente fué identificada como Br. melitensis (Cuadro 8), pero que de acuerdo a los resultados de las pruebas de metabolismo oxidativo, se consideró finalmente como Br. abortus biotipo 7 (Cuadros 9,10, y 11). En los Cuadros 8,10 y 11 se incluye el comportamiento de las cepas de referencia que se usaron como controles, siendo estas la 16M de Br. melitensis biotipo 1, cepa 1330 de Br. suis biotipo, y la cepa 544-2 de Br. abortus biotipo 1.

Cuando los 23 aislamientos fueron examinados, solamente en base a su comportamiento bioquímico y serológico, se encontró que 10 de ellas presentaban resultados conflictivos que impedían la interpretación definitiva. Sin embargo al ser sometidas a exámenes para determinar el metabolismo oxidativo, se logró la identificación final como se puede ver en el Cuadro 9. Los resultados de las pruebas metabólicas practicadas en estas 10 cepas, se presentan en los cuadros 10 y 11. En el primero de ellos se indica si el sustrato fué oxidado (+) o si la oxidación no ocurrió (-). En el segundo de estos cuadros (11) se presentan valores de las tasas oxidativas $\text{QO}_2(\text{N})$ de cada una de las 10 cepas ante 8 sustratos. El valor $\text{QO}_2(\text{N})$ se refiere al consumo de oxígeno por mg de nitrógeno, expresado en microlitros.

Cuadro 10

Resultados de las Pruebas Realizadas para Determinar las Características Metabólicas Oxidativas de 10 Cepas de Brucella y sus Biotipos

Cepas Nº	Especies	Biotipo	SUBSTRATOS							
			Grupo I		Grupo II		Grupo III			
			Aminoácidos		Aminoácidos (Ciclo Urea)		Carbohidratos			
			L-Alanina	L-Glutámico	D L-Ornitina	L-Lisina	L-Arabinosa	D-Galactosa	D-Ribosa	D-Glucosa
46	B. abortus	5	+	+	-	-	+	+	+	+
74	B. suis	3	-	-	+	+	-	-	+	+
75	B. suis	2	-	-	+	-	+	+	+	+
78	B. suis	3	+	+	+	+	+	+	+	+
102	B. suis	3	-	+	+	-	+	+	+	+
157	B. suis	2	-	+	+	-	+	+	+	+
166	B. abortus	7	+	+	-	-	+	+	+	+
171	B. suis	2	-	+	+	-	+	+	+	+
198	B. abortus	3	+	+	-	-	+	+	+	+
199	B. abortus	4	+	+	-	-	+	+	+	+
16 M*	B. melitensis	1	+	+	-	-	-	-	-	+
1330*	B. suis	1	+	+	+	+	+	+	+	+
544-2*	B. abortus	1	+	+	-	-	+	+	+	+

* = cepas de referencia.

Cuadro 11

CARACTERIZATION METABOLICA de BRUCELLA

Tasas Oxidativas $QO_2(N)$ de 10 cepas aisladas de chigüire sobre cuatro aminoácidos y cuatro carbohidratos

Cepas Nº	SUBSTRATOS								
	Aminoácidos				Carbohidratos				
	L- Alanina	L- Citrulino- LEO	D,L Ornitina	L- Lisina	L- Arabinosa	D- Galactosa	D- Ribosa	D- Glucosa	
46	122	58	36	37	176	110	90	73	
74	42	22	79	62	39	26	85	56	
75	16	42	137	41	529	111	183	55	
78	57	85	98	91	179	166	81	69	
102	47	55	130	48	82	71	82	60	
157	34	236	135	34	267	135	346	423	
166	183	364	44	35	222	144	84	81	
171	12	56	56	33	131	76	66	87	
198	63	93	46	33	378	377	172	227	
199	102	197	44	34	183	112	358	200	
16 MA	80	97	35	36	24	39	41	56	
1330**	63	69	160	147	122	285	306	373	
544-2***	139	320	40	19	160	280	109	85	

* = Br. melitensis, cepa de referencia; ** = Br. suis, cepa de referencia
 *** = Br. abortus, cepa de referencia

Estos valores se encontraron mediante la fórmula descrita en el capítulo de Material y Metodos, para lo cual fué necesario determinar la constante de cada uno de los sistemas, utilizando la constante de solubilidad del oxígeno a 37°C: 0.0239. Se consideró que el substrato había sido oxidado cuando el valor $QO_2(N)$ era igual o superior a 50 microlitros.

b) Estudios Epizootiológicos.

Con el objeto de establecer una posible correlación entre la edad de los chigüires y la presencia de anticuerpos contra brucelas o bien el aislamiento del germen, se aplicó la técnica del cristalino, mediante la cual se pudo determinar que entre la población examinada se incluyeron animales de 6 meses hasta 5 años de edad. En el cuadro 12 se describen los aislamientos en relación a la edad de los animales infectados. No se aisló la bacteria en animales menores de 1 año, ni en animales de 5 años; el mayor porcentaje de aislamientos ocurrió en chigüires de 4 años.

En el Cuadro 13 se indican las edades de cada animal en relación a la presencia de anticuerpos en el suero, haciendo mención del sitio de procedencia de cada Chigüire.

Al examinar las especies de *Brucella* aisladas en relación a los sitios de procedencia de los animales, se encontró que en 3 áreas existió la infección tanto por Br. abortus como por Br. suis; en la zona denominada El Frío Sur, se aisló Br. suis en 8 de 37 animales estudiados, pero no se logró el cultivo de Br. abortus. Mientras que en el Centro de Recría del MAC en ninguno de los 38 animales se logró el crecimiento de brucelas (Cuadro 14).

En los Cuadros 15 y 16 se muestran los resultados serológicos corres

pondientes a las pruebas de Tubo, Mercaptoetanol, y Rivanol, en comparación con los resultados obtenidos con el antígeno Poli B. Los resultados de la Prueba de Tarjeta no mostraron correlación con las pruebas antes mencionadas.

CUADRO 12

Distribución por Edad de los Chigüires en Relación al
Número de Aislamientos de Brucella

Edad	Aislamientos /	Total (%)
6 - 11 meses	0/27	(0)
1 año	9/72	(13)
2 años	6/40	(15)
3 años	5/40	(13)
4 años	3/14	(21)
5 años	0/5	(0)

Cuadro 13

Distribución por Edad de Reactores Serológicos a Brucella en Chigüires

Sítios	6-11 meses	1 año	2 años	3 años	4 años	5 años
Muestreados						
El Frío	5/7* **	15/24 (63)	6/14 (43)	8/15 (53)	3/5 (60)	0/3 (0)
Norte						
El Frío	0/3 (0)	12/17 (71)	6/8 (75)	1/6 (17)	2/2 (100)	1/1 (100)
Sur						
MAC	2/5 (40)	2/9 (22)	5/12 (42)	6/6 (100)	0/2 (0)	0/1 (0)
Turagua						
Este	2/3 (67)	9/12 (75)	4/5 (80)	4/4 (100)	2/2 (100)	
Turagua						
Oeste	4/9 (44)	8/10 (80)	1/1 (100)	6/9 (67)	2/3 (67)	
Total	13/27 (48)	46/72 (64)	22/40 (55)	25/40 (63)	9/14 (64)	1/5 (20)

* El numerador se refiere al número de animales positivos, mientras que el denominador corresponde al número de animales estudiados.

** Porcentaje de reactores serológicos.

Cuadro 14

Distribución por Especie de Brucella Aisladas de Chigüires

Sitios Muestreados	No. de Animales	Especie de Brucella	No. de Aislamientos	(%)
El Frío Norte	68	<u>Br. abortus</u>	2	(2.9)
		<u>Br. suis</u>	1	(1.5)
El Frío Sur	37	<u>Br. suis</u>	8	(21.6)
MAC	38	ninguno		
Turagua Este	26	<u>Br. abortus</u>	3	(11.5)
		<u>Br. suis</u>	2	(7.7)
Turagua Oeste	32	<u>Br. abortus</u>	3	(9.4)
		<u>Br. suis</u>	4	(12.5)
Total	201	<u>Br. abortus</u>	8	(4.0)
		<u>Br. suis</u>	15	(7.5)
		Total	23	(11.4)

Cuadro 15

Distribución de la Población de Chigüires por Resultados Serológicos de Tubo, Mercaptoetanol, Rivanol e Inmunodifusión en Gel

Pruebas Convencionales (Tubo, Mercaptoetanol y Rivanol)

Clase	Machos		Hembras		Total
	No.	(%)	No.	(%)	No. (%)
No reactores	32	(32)	52	(52)	84 (42)
Reactores	69	(69)	48	(48)	117 (58)
Total probados	101		100		201

Prueba con Poli B

Clase	Machos		Hembras		Total
	No.	(%)	No.	(%)	No. (%)
No reactores	32	(32)	53	(53)	85 (42)
Reactores	69	(69)	47	(47)	116 (58)
Total probados	101		100		201

Cuadro 16

Resumen General de los Títulos Serológicos en las Pruebas de Tubo, Mercaptoetanol, y Rivanol*
en la Población de Chigüires

Población	Probados No. (%)	1:25	1:50	1:100	1:200	Total Reactores
Machos	101 (50.25)	30 (15)	18 (9)	7 (4)	14 (7)	69 (34)
Hembras	100 (49.75)	17 (9)	15 (8)	6 (3)	10 (5)	48 (24)
Total	201 (100)	47 (23)	33 (16)	13 (7)	24 (12)	117 (58)

* La prueba de la Tarjeta no mostró correlación con estas pruebas.

DISCUSION

Proyecto N° 1

En los últimos años se han realizado numerosos estudios orientados a encontrar técnicas sencillas y efectivas para el diagnóstico de la Brucelosis.

Entre los aspectos que se han investigado con más interés están los métodos que permitan identificar anticuerpos originados a consecuencia del estímulo por la infección, a diferencia de aquellos producidos en respuesta a una vacunación (Corbel 1972; Corbel y Day 1973; Alton et al, 1975; Allan et al 1976; Clarke 1977; Pietz 1977; Chappel et al 1978a 1978b; Raybould y Chantler, 1980; Carrol et al 1980). Por otra parte se están investigando nuevos procedimientos para inmunizar animales; tal es el caso de la vacunación de bovinos adultos con dosis reducida de la vacuna cepa 19 de Br. abortus (Alton 1978; Nicoletti 1976, 1978a, 1978b; Deyoe et al, 1979).

Los programas de control de enfermedades como la Brucelosis van fuertemente asociados al sacrificio de animales reactivos, por lo que la vacunación compromete los procedimientos de diagnóstico.

Las publicaciones recientes de Jones y colaboradores (1980) sugieren que el empleo de un antígeno de naturaleza polisacárido, extraído a partir de cepas rugosas de Br. melitensis (cepa B115), proporciona un alto grado de especificidad al reaccionar con anticuerpos asociados con el proceso infeccioso, pero no con anticuerpos de origen vacunal. Por otra parte, los trabajos publicados primero por Nicolette (1976, 1978, 1981) y después por otros autores (Plommet et al 1976), sugieren que la vacunación con dosis reducida de la cepa 19 produce una respuesta inmunológica sólida, pero que

los títulos de anticuerpos en el suero se reducen considerablemente a los 4-6 meses posteriores a la vacunación, lo que permite diagnosticar la enfermedad mediante métodos convencionales, después de transcurridos 6 meses de aplicada la vacuna.

En el presente estudio se encontró que los animales vacunados con 3×10^9 de la cepa 19 desarrollaron títulos elevados de anticuerpos, los cuales pudieron ser demostrados mediante las pruebas de aglutinación usadas rutinariamente. La prueba de tarjeta fué muy sensible, reaccionando 68 animales aún después de 7 meses de la vacunación. Esta prueba no se debe recomendar en adultos vacunados con dosis reducida.

La prueba de aglutinación en tubo también identificó un número considerable de reactores después de transcurridos 7 meses de aplicarse la vacuna. Por su parte, Mercaptoetanol y Rivanol solamente siguieron reaccionando con 12 sueros; posiblemente estos animales desarrollaron una infección, con cepas de campo.

Debe señalarse que los animales de este estudio estuvieron en contacto con 49 animales naturalmente infectados con Br. abortus.

Las pruebas de Inmunodifusión en gel usando antígenos Poli B, mostraron que la ventaja de que solamente en 10 animales vacunados se produjeron reacciones de precipitación. Los otros 139 animales fueron siempre negativos. En el caso de los sueros de animales infectados por Br. abortus estas pruebas resultaron positivas en 10 de 11 animales. En el suero de un animal resultaron negativas posiblemente por características particulares de ese suero, ya que en Fijación de Complemento este suero resulto anticomplementario.

En base a estos datos, se considera muy útil emplear las pruebas de

Inmunodifusión en gel con antígeno Poli B para identificar animales reactivos durante las semanas siguientes a la vacunación ya que en caso de que se identifiquen reactivos, estos pueden ser separados del resto del hato para realizar en ellos otros estudios que permitan definir su verdadero estado de infección sin que representen un foco de contaminación para el resto de los animales. En lo referente a los otros métodos esto no es posible ya que es necesario esperar hasta 5-6 meses para poder identificar a los animales que continúan reaccionando, lo que es sugestivo de que una cepa de *Brucella* permanece dentro del organismo ya sea cepa vacunal o cepa de campo.

Solamente en 7 de los 10 animales en que se encontró precipitación con el Poli B. Se obtuvieron resultados positivos en tubo de Mercaptoetanol, en los muestresos posteriores al 5º mes. Lo mismo ocurrió en el caso de Fijación de Complemento. La persistencia de reacciones positivas en estos animales pudo deberse a que se tratara de animales que se encontraban incubando la infección al momento de la vacunación, o bien otras posibilidades son que se infectaron durante las siguientes semanas de iniciado el estudio por fallas de la vacuna en un medio altamente contaminado con cepas de campo. Por último, debe considerarse la posibilidad de que en estos animales se localizara la cepa 19 en algunos tejidos, persistiendo en ellos de manera indefinida y por consiguiente causando un constante estímulo sobre el sistema inmunocompetente. Si bien no se logró el aislamiento de brucelas a partir de muestras de leche de estos bovinos, hay publicaciones que señalan la persistencia de la cepa vacunal en el 1-2% de animales vacunados como adultos (Nicoletti, 1966, 1976, 1981).

La implementación de la prueba de inmunodifusión con antígeno Poli B

se podrían, recomendar como prueba preliminar en hatos vacunados con cepa 19 en dosis reducida. Los animales positivos a esta prueba deberán ser sometidos a muestreos bacteriológicos, así como a otras pruebas serológicas antes de ser considerados como animales infectados.

Proyecto N° 2

Al analizar los resultados obtenidos de 3 hatos muestreados en Apure, Venezuela, con el fin de definir si el chigüire pudiera ser un reservorio de Brucella, se observaron importantes hallazgos.

De los 201 chigüires muestreados en este estudio, 101 eran machos y 100 hembras y los resultados serológicos revelaron que la tasa de reactores machos fué más alta (65%), que las hembras (47%) (diferencia significativa $\chi^2 = 9.19$). Sin embargo cuando se analizan los resultados bacteriológicos se observó que esta diferencia es menos marcada. Así las tasas de aislamiento en machos fué de un 12.87%, mientras que en las hembras resultó un 10% (diferencia significativa $\chi^2 = 0.90$). Las tasas de reactores de las 5 zonas muestreadas indicaron una considerable variación en los niveles de infección entre la población de chigüires, observándose que la más alta tasa (81%), fué encontrada en Truagua Este y la más baja (40%), en el Centro de Recría del MAC (diferencia significativa $\chi^2 = 42.03$). Durante esta investigación del chigüire no se probaron los sueros por la prueba de Fijación de Complemento ya que estudios anteriores de Bello et al (1976, 1979), revelaron que son anticomplementarios.

De tal manera que los sueros probados con el antígeno Poli B mediante las pruebas de Inmunodifusión Radial, resultó en 116 chigüires positivos coincidiendo con 117 reactores detectados mediante las pruebas de tubo, Mer₂ captoetano, Tarjeta y Rivanol.

Es de importante relevancia en esta investigación los estudios que se realizaron por primera vez para biotipificar cepas de *Brucella* aisladas del chigüire, utilizando la técnica de metabolismo oxidativo, a fin de definir con precisión especies de *Brucella* y sus biotipos. Los resultados finales son el producto de 2 técnicas de biotipificación, utilizadas durante todo el estudio. Así que las especies de *Brucella* aisladas de 4 de las 5 zoans en estudio, resultaron en 8 cepas de *Br. abortus* y 15 de *Br. suis*, corresponden al Frío Sur y por otro lado, ningún aislamiento en el Centro de Recría del MAC.

La significancia de haber aislado *Br. suis* en el grupo de chigüires estudiados, esta dada por el hecho de que siendo los chigüires reservorios de *Brucella*, y debido a la estrecha convivencia de esta especie animal con bovinos infecta a estos lo que traería serios problemas al realizar diagnósticos serológicos y detectar reactores dentro de la población bovina, lo cual lleva a la decisión de eliminarlos del hato.

Especialmente importante resultó la estimación de la edad en los chigüires, mediante la técnica del cristalino considerada por Ojasti (1973) como una de las más sensibles técnicas disponibles.

Cuando son comparados los datos obtenidos de la edad con los resultados serológicos y bacteriológicos, la información revela que los chigüires muy jóvenes se infectan con *Brucella* y que se mantienen como reactores por años. La significancia de la edad en reactores serológicos en *Brucellosis*, es porque pueden transmitir la enfermedad por largo tiempo, lo cual sugiere que el chigüire puede ser un importante reservorio de *Brucella*; con repercusiones epizootiológicas y epidemiológicas.

Los estudios de metabolismo oxidativo, revelaron que es necesario

utilizar más de una prueba para la caracterización de cepas de Brucella, ya que los estudios serológicos y bioquímicos aunque no deben descartarse, no son confiables, particularmente cuando se aíslan cepas que a través de las diferentes pruebas muestran una identidad conflictiva.

Durante este estudio, el uso de 2 técnicas para la biotipificación de Brucella puso en evidencia una vez más que las pruebas de caracterización metabólica, no solo son superiores sino más precisas y altamente confiables.

CONCLUSIONES

A. El uso del antígeno soluble Poli B es útil para la detección de Brucelosis, en animales vacunados con dosis reducida especialmente cuando se van a detectar animales infectados, hecho este de gran trascendencia para México y Venezuela donde la Brucelosis constituye un problema sanitario-económico.

B. La técnica de Inmunodifusión Radial resultó ser sencilla, sensible y específica cuando se le comparó con otra técnica de inmunodifusión en gel y las pruebas convencionales. Por lo tanto es recomendable usar dicha técnica junto con alguna de las técnicas tradicionales prueba de Rivanol y/o 2-Mercaptoetanol.

C. Las pruebas metabólicas permiten definir las especie y biotipo de aquellas cepas de Brucella que resultan con identidad conflictiva en pruebas serológicas y bioquímicas.

D. La estimación de la edad en animales silvestres viene a ser una importante herramienta para correlacionar resultados de edad con resultados serológicos y bacteriológicos y emitir conclusiones más precisas.

De acuerdo a estas consideraciones se puede decir que la distribución de la edad, los reactores serológicos, así como los aislamientos de Brucella indican una alta posibilidad de que el chigüire sea un reservorio de Brucella.

RECOMENDACIONES

A. En vista de los resultados obtenidos en esta investigación, en lo que respecta al estudio serológico se recomienda el uso del antígeno - polisacárido y como prueba de rutina la Inmunodifusión Radial para la evaluación serológica de sueros de bovinos vacunados con dosis reducida, con el fin de detectar anticuerpos de infección por Brucella.

B. Se sugiere un estudio completo de las tasas de infección en bovinos de los Llanos de Apure, Venezuela y correlacionar dicha información con la obtenida para los chigüires.

C. Estudiar un grupo de chigüires mantenidos en cautiverio inoculando las cepas aisladas, tratar de reproducir la enfermedad, hacer estudios serológicos y bacteriológicos, correlacionar los resultados obtenidos con la edad conocida.

D. Realizar un estudio epizootiológico, en otros animales silvestres de la zona estudiada, incluyendo los cerdos silvestres; a fin de obtener mas información de la evidencia epizootiológica acerca del chigüire como reservorio de Brucella.

REFERENCIAS

- Allan, G.S., Chappel, R.J., Williams, P. y McNaught, D.J. (1976). A quantitative comparison of the sensitivity of serological tests for bovine brucellosis to different antibody classes. *J. Hyg.* 76:287-298.
- Alton, G.G., Jones, L.M. y Pietz, D.F. (1975). Laboratory techniques in brucellosis. World Health Organization, Geneva, Monograph Series No. 55, 2nd Ed. pp. 175.
- Alton, G.G., Maw, J., Rogerson, B.A. (1975). The serological diagnosis of bovine brucellosis: An evaluation of the complement fixation, serum agglutination and rose bengal tests. *Aust. Vet. J.* 51:57-63.
- Alton, G.G. (1978). Recent developments in vaccination against bovine brucellosis. *Aust. Vet. J.* 54: 551-557.
- Anderson, R.K. (1964). Rivanol test.; Division of Veterinary Bacteriology and Public Health, College of Veterinary Medicine; University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- Anderson, R.K., Jenness, R.K., Brumfield, H.P. y Gough, P. (1964). Brucella agglutinating antibodies: Relation to Mercaptoethanol stability to complement fixation. *Science* 143:3612.
- Anderson, J.D. y Smith, H. (1965). The metabolism of Erythritol by Brucella abortus. *J. Gen. Microbiol.* 38: 109-124.
- Baker, M.G., Dills, G.J. y Hayes, F.A. (1962). Further experimental studies on brucellosis in white-tailed deer. *J. Wildl. Mgt.* 26:27-31.
- Baker, P.J. y Wilson, J.B. (1965). Chemical composition and biological properties of endotoxin of Brucella abortus. *J. Bacteriol.* 90: 895-902.
- Becker, W. (1969). Determination of antisera titers using single radial immunodiffusion method. *Immunochemistry* 6: 539.
- Becker, H.N., Belden, R.C., Breault, T., y Burrige, M.J. (1978). Brucellosis in feral swine in Florida. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 173:1181-1182
- Beh, K.J. (1974). Quantitative distribution of Brucella antibody amongst immunoglobulin classes in vaccinated and infected cattle. *Res. Vet. Sci.* 17: 1-4.
- Belikov, M.N., Evstafiadi, K.M., Marakova, A.G. y Schumakova, L.P. (1973). (Tularaemia in rams). *Veterinariya, Moscow*, No. 9:49-50.

Bell, L.M., Hayles, L.B., y Chanda, A.B. (1977). Evidence of reservoir hosts of Brucella melitensis in Zambia. Med. J. Zambia 10: 152-153.

Bello, A., Mogollón, P., Villegas, R. y Comez, G. (1976). La brucelosis en los animales salvajes: I. El chiguire (Hydrochoerus hydrochaeris). Vet. Trop. 1: 117-128.

Bello, A., Mogollón, P., Ramírez, M., Rodríguez, V., Laserna de, R., Perez, M., Moreno, J. y Lord, R.D. (1978). Brucelosis en chiguire del Edo. Apure (Hydrochoerus hydrochaeris). Acta Cien. Ven., XXVIII Conv. An. ASOVAC.

Bello, A., Lord de, V., Mogollón, P., Laserna de, R., Salmerón de, C., Ramírez, M., Moreno, J., Toro, M. y Ramos, J. (1979). Estudio epidemiológico de la brucelosis en chiguire (Hydrochoerus hydrochaeris) del Estado Apure. Acta Cien., Ven., XXIX Conv. An. ASOVAC.

Bendtsen, H., Christiansen, N. y Thomsen, A. (1956). Brucella suis infection in hares as the cause of enzootic brucellosis in pigs. Nord. Vet. 8:1-34.

Berman, D.T., Jones, L.M. y Beach, B.A. (1960). Studies on repeated vaccination of cattle with Brucella abortus strain 19. Herd. Proc. A.V.M.A. 87th Ann. Mtg. 171-176.

Berman, D.T., Wilson, B.L., Moreno, E. y Angus, R.D. (1980). Characterization of Brucella abortus soluble antigen employed in immunoassay. J. Clin. Microbiol. 11: 355-362.

Binniger, C.E., Beecham, J.J., Thomas, L.A. y Winward, L.D. (1980). A serological survey of selected infectious diseases of black bears in Idaho. J. Wildl. Dis. 16: 423-430.

Bisping, W., y Loliger, H.C. (1963). Brucellosis in mink. Proc. 17th World Vet. Cong., Hanover, 1: 445-449.

Boer, W.J., Crawford, R.P., Hidalgo, R.J. y Robinson, N. (1980). Small mammals and white-tailed deer as possible reservoir hosts of Brucella abortus in Texas. J. Wildl. Dis. 16: 19-24.

Bosworth, T.J. (1937). The susceptibility of the wild rat to infection with Brucella abortus, a preliminary note. J. Comp. Path. and Therap. 50:345-349

Brim, A., Morris, J.F. y Sumkes, E.J. (1950). Methods of isolation and incidence of Brucella types found in Georgia- J. Lab. Clin. Med. 35:483-487.

Bruce, D. (1887). Note on the discovery of a microorganism in Malta Fever. Practitioner 39: 161-170.

Buxton, A. y Frasser, G. (1977). Animal microbiology I. 1ª Ed., Blackwell Scientific Publications (London), 123 pp.

- Calcedo, V.O. (1968). Aspecto económico de la brucelosis. 1º Symposium Nacional de Brucelosis, Segovia, España.
- Campaire, C. y Gracia, C. (1968). El problema de la brucelosis bovina. 1º Symposium Nacional de Brucelosis, Segovia, España.
- Cameron, H.S. y Meyer, M.E. (1953). Comparative metabolic studies on the genus *Brucella*. II. Metabolism of aminoacids that occur in the urea cycle. *J. Bact.* 67: 34-37.
- Cameron, H.S. y Meyer, M.E. (1955). Synthesis of aminoacids from urea by the genus *Brucella*. *Am. J. Vet. Res.* 16: 149-151.
- Carrol, J.A., Gaydos, M. y Chen, H.P. (1980). Counterimmunoelectrophoresis: A method for the determination of bacterial polysaccharide antigens. *Lab. Med. II: Am. Soc. Clin. Path.* 8: 541-544.
- Chappel, R.J., McNaught, D.J., Bourke, A.A. y Allan, G.S. (1978). Comparison of the results of some serological tests for bovine brucellosis. *J. Hyg.* 80: 365-371.
- Chappel, R.J., McNaught, D.J., Bourke, J.A. y Allan, G.S. (1978) The diagnostic efficiency of some serological tests for bovine brucellosis. *J. Hyg.* 80: 373-384.
- Choquette, L.P.E., Broughton, F., Cousineau, J.G., Novakowski, N.S. (1978). Parasites and diseases of bison in Canada. IV. Serologic survey for brucellosis in bison in northern Canada. *J. Wildl. Dis.* 14: 329-332.
- Chase, M.W. (1968). *Methods in immunology*. Academic Press Inc., New York, Vol. 2.
- Christiansen, M. y Thomsen, A. (1957). A contribution to surveying the spread of brucellosis in hares in Denmark. *Nord. Vet.* 8: 841-858.
- Clark, J.M. (1969). *Manometry: Calibration of Warburg flasks and manometers*. Experimental Biochemistry. W.H. Freeman and Company, San Francisco and London. 228 pp.
- Clarke, N. (1977). Development and evaluation of serological tests in bovine brucellosis. In Crawford, R.P. and Hidalgo, R.J. (Ed.), *An International Symposium of Bovine Brucellosis*. Texas A & M Univ. Press, College Station. pp. 79-82.
- Clausen, E.J. (1976). Leucocyte migration inhibitory factor. In *Manual of Clinical Immunology*, Rose, R.N. y Friedman, H. (Ed.) An Soc. Microbiol.
- Condy, J.B. y Vickers, D.B. (1972). Brucellosis in Rhodesian wildlife. *J. South African Vet. Med. Assn.* 43: 175-179.

- Condy, J.B. y Vickers, D.B. (1976). Brucellosis in buffalo (Syncerus caffer) in Wankie National Park. Rhodesian Vet. J. 7: 58-60.
- Cooper, A.C.D. y Carmichael, I.H. (1974). The incidence of brucellosis in game in Botswana. Bull. Epizootic Dis. Africa 22: 119-124.
- Corbel, M.J. (1972). Characterization of antibodies active in the rose bengal plate test. Vet. Rec. 90: 484-485.
- Corbel, M.J. y Phillip, J.I.H. (1972). The relationship of Brucella abortus agglutinogenic antigens to the receptor sites for Tbilisi phage. Rev. Vet. Sci. 13: 91-93.
- Corbel, M.J. y Day, C.A. (1973). Assessment of indirect hemagglutination procedures for the serological diagnosis of bovine brucellosis. Br. Vet. J. 129: 480-492.
- Corbel, M.J. (1973). Evaluation of an immunodiffusion test for the detection of antibodies to Brucella abortus in bovine serum. J. Med. Microbiol. 6: 67-75.
- Cordero, R.G.A. (1977). Estudio comparativo de población de chiguirens (Hydrochoerus hydrochaeris) se Sabana y Bosque del Llano. Thesis, Univ. Central de Venezuela, Caracas. 70 pp.
- Cordero, G.A. y Ojasti, J. (1981). Comparison of capybara populations of open and forested habitats. J. Wildl. Mgt. 45: 267-271.
- Corey, R.R., Paulissen, L.J. y Swartz, D. (1964). Prevalence of brucellae in the wildlife of Arkansas. J. Wildl. Dis. 36:8.
- Corner, A.H., y Connell, R. (1958). Brucellosis in bison, elk, and moose in Elk Island National Park, Alberta, Canada. Can. J. Comp. Med. and Vet. Sci. 22: 9-21.
- Cowan, S.T. y Steele, K.J. (1974). Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Co. Ed. Continental, S.A., Mexico 320 pp.
- Crawford, R.P. y Hidalgo, R.J. (1977). Wildlife reservoirs of brucellosis. Texas A & M University Press, College Station. p. 269-276.
- Crawford, R.P., Heck, F.C. y Williams, J.D. (1978). Experiences with Brucella abortus strain 19 vaccine in adult Texas cattle. Am. Vet. Med. Assn. 173: 1457-1461.
- Crouch, D. y Elberg, S.S. (1967). Response of the vaccine strain of Brucella melitensis Rev 1 to erythritol. J. Bact. 94: 1793-1795.
- Cruickshank, J.C. (1954). Observations on Brucella species based on examination of 800 strains. J. Hyg., Camb. 52:105.

- Cunningham, B. y O'Conner, M. (1971). The use of killed 45/20 adjuvant vaccine as a diagnostic agent in the final stages of the eradication of brucellosis. *Vet. Rec.* 89: 680-686.
- Cunningham, B. (1977). A difficult disease called brucellosis. In: International Symposium of Bovine Brucellosis. Crawford, R.P. y Hidalgo, R.J. (Ed.). Texas A & M Univ. Press, College Station. p. 687-711.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B. y McCarty, M. (1978). *Tratado de Microbiología*. Salvat Ed., Madrid. 1559 p.
- Davis, D.S., Boer, W.J., Mims, J.P., Heck, F.C. y Adams, L.G. (1979). *Brucella abortus* in coyotes. I. A serological and bacteriological survey in eastern Texas. *J. Wildl. Dis.* 15: 367-372.
- Davis, D.S. (1980). A serological survey for four enzootic diseases in coyotes (*Canis latrans*) in selected areas of Texas. *Diss. Abs. Int.* 408:8.
- De La Vega, E., García Carillo, C. y Arce, C. (1979). Infección natural por *Brucella* en comadrejas (*Didelphis marsupialis*) en la República Argentina. *Rev. Med. Vet. Argentina* 60: 283-286.
- Deyoe, B.L., Dorsey, T.A., Meredith, K.B. y Garrett, L. (1979). Effect of reduced dosages of *Brucella abortus* strain 19 in cattle vaccinated as yearlings. *Anim. Health Assn.* 83rd Ann. Meeting. p. 92-97.
- Díaz, R., Jones, L.M., Leong, D. y Wilson, J.B. (1968). Antigenic relationship of the Gram negative organisms causing canine abortion to smooth and rough brucellae. *J. Bact.* 95: 618-642.
- Díaz, R., Jones, L.M., Leong, D. y Wilson, J.B. (1968). Surface antigens of smooth brucellae. *J. Bact.* 96: 893-901.
- Díaz, R., y Dorronsoro, I. (1971). Contribución al diagnóstico serológico de brucelosis y yersiniosis. I. Utilidad de la reacción de precipitación en gel. *Rev. Clin. Esp.* 121: 367-372.
- Díaz, R. y Levieux, D. (1972). Role respectif en serologie de la brucellose bovine des antigenes et des immunoglobulins G₁ et G₂ dans les tests d'agglutination, de coombs et Rose bengale ainsi que dans le phenomene de zone. *C.R. hebd. seances Acad. Sci.* 274:1593-1596.
- Díaz, R. y Bosseray, N. (1973). Identification d' un composé antigénique spécifique de la phase rougueuse (R) des *Brucella*. *Ann. Rech. Vet.* 4:283-292.
- Díaz, R., y Bosseray, N. (1974). Estudio de las relaciones antigénicas entre *Yersinia enterocolitica* serotipo 9 y otras especies bacterianas Gram negativa. *J. Microbiol. Esp.* 27:1-14.

- Díaz, R., Maravi-poma, E. y Rivero, A. (1976). Comparison of counter Immuno-electrophoresis with other serological tests in the diagnosis of human brucellosis. *Bull. W.H.O.* 53:417-424.
- Díaz, R., Caratea, P., Jones, L.M. y Moriyón, I. (1979). Radial immunodiffusion test with a *Brucella* polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. *J. Clin. Microbiol.* 10: 37-41.
- Dubois, M., Giles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356.
- Eisen, H.N., Little, J.R., Steiner, L.A. y Simms, E.S. (1969). Degeneracy in the secondary immune response: stimulation of antibody formation by cross-reacting antigens. *Isr. J. Med. Sci.* 5:338-351.
- Ellwood, D.C., Keppie, J. y Smith, H. (1967). The chemical basis of the virulence of *Brucella abortus*. VIII. The identification of purified immunogenic material from culture filtrate and from cell-wall of *Brucella abortus* grown in vitro. *Br. J. Exp. Path.* 48:28-39.
- Engvall, E. y Perlmann, P. (1971). Wnzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8:871-874.
- Fay, L.D. (1961). The current status of brucellosis in the white-tailed deer and mule deer in the United States. *Trans. 26th N.A. Wildl. and Nat. Res. Conf.* pp. 203-211.
- Fenske, G. y Pulst, H. (1973). Epidemiological significance of brucellosis in hare and wild boar. *Monat. fur Vet.* 28:537-541.
- Fitch, C.P. y Bishop, L.M. (1938). The wild rat as a host of *Brucella abortus*. *The Cornell Vet.* 28: 304-306.
- Flores Castro, R. (1978). Canine brucellosis: Analysis of methods for diagnosis and treatment. PhD Thesis. Cornell University, Ithaca, New York.
- Flores Castro, R., de la Higuera, A., Mancera, A., Villa, A., y Ruiz, R. (1979). Estudios sobre la vacunación de vacas adultas con cepa 19 de *Br. abortus* en dosis reducidas. Resúmenes de la Reunión Anual. Area Médica. INIP-SARH. p. 11.
- Foster, J.W. y Ribi, E. (1962). Immunological role of *Brucella abortus* cell walls. *J. Bact.* 84: 258-268.
- Freeman, B.A., McGhee, J.R. y Baughn, R.E. (1970). Some physical, chemical and taxonomic features of the soluble antigens of *Brucella*. *J. Infect. Dis.* 121: 522-527.

Frost, A.J., Smith, H., Witt, K. y Keppie, J. (1972). The chemical basis of the virulence of Brucella abortus. X. A surface virulence factor which facilitates intracellular growth of Brucella abortus in bovine phagocytes. Br. J. Exp. Path. 53:587-596.

Fudenberg, H.H., Stites, D.P., Cadwell, J.L. y Wells, J.V. (1980). Basic and Clinical Immunology. Lange Medical Publications. pp. 388-391.

Galanos, G., Reitchel, E.T., Luderitz, O. y Westphal, O. (1972). Biological activities of lipid A with bovine serum albumin. Eur. J. Biochem. 31:230-233.

Gamarra, D. y Szyfres, B. (1968). Aislamiento de Brucella abortus de un hurón (Galactis furax). Rev. Med. Vet. (Buenos Aires). 49:291-294.

Garvey, S.G., Cremer, N.E. y Sussdorf, D.H. (1977). Methods in Immunology. W.A. Benjamin, Inc. Reading, Massachusetts.

González Jiménez, E. y Escobar, A. (1975). Digestibilidad comparada entre chigüires (Hydrochoerus hydrochaeris), conejos y ovinos con raciones de diferentes proporciones de forraje y concentrados. Agronomía Tropical (Maracay, Venezuela) Volumen 25. pp. 283-290.

González Jiménez, E. (1977). El capibara: una fuente indígena de carne de la América Tropical. Rev. Mundial Zootécnica 21.

González Jiménez, E. (1978). Digestive physiology and feeding of capybara (Hydrochoerus hydrochaeris) In M. Recheige (Ed.) Handbook Series in Nutrition and Food, Series G. 1: Diets for mammals. C.R.S. Press, Cleveland.

Gorban, L.V. (1977). Natural nidality of brucellosis in the far north of the Soviet Union. Zhurnal Mikrobiologii i Immunobiologii 8:142.

Gorban, L.V. y Grekova, N.A. (1978). Susceptibility of some rodents to infection with the reindeer Brucella. Zhurnal Mikrobiologii i Immunobiologii 9:146-147.

Gradwall, D.V., Schutte, A.P. y Roux, D.J. (1977). The isolation of Brucella abortus biotype 1 from African buffalo in the Kruger National Park. J. South African Vet. Assn. 48:41-43.

Grekova, N.A. y Gorban, L.V. (1978). Pathogenicity of brucellae isolated from wild and game animals in the far north of the USSR. Zhurnal Mikrobiologii i Immunobiologii 5:46-48.

Haring, C.M. y Fraum, J. (1943). The effect of Brucella abortus strain 19 on cattle of various ages and its bearing on adult vaccination. In Proc. 47th Ann. Meeting, U.S. Livestock Assn. pp. 42-46.

Hayes, F.A., Gerard, W.T., Shotts, E.B., y Dills, G.J. (1960). Brucellosis in white-tailed deer of the southeastern United States. J. Am. Vet. Med. Assn. 137:190-191.

- Heck, F.C., Williams, J.D., Crawford, R.P., y Flowers, A.I. (1979). Comparison of serological methods for the detection of B. abortus antibodies in sera from vaccinated and non vaccinated cattle. J. Hyg. 83:491-499.
- Heremans, J.F. (1971). Antigen titration by simple radial immunodiffusion in plates. In Williams, C.A. y Chase, M.W. (Ed.). Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol. III, Academic Press, New York pp. 213-224.
- Hinsdill, R.D. y Berman, D.T. (1967). Antigens of Brucella abortus. I. Chemical and immunoelectrophoretic characterization. J. Bact. 93:544-549.
- Hoff, G.L., Bigler, W.J., Trainer, D.O., Debbie, J.G., Brown, G.M., Winkler, W.G., Richards, S.H. y Reardon, M. (1974). Survey of selected carnivore and opossum sera for aflutinin to Brucella canis. J. Am. Vet. Med. Assn. 165:830-831.
- Hoyer, B.H., y McCullough, N.B. (1960). Polynucleotide homologies of Brucella desoxyribonucleic acids- J. Bact. 95:444-448.
- Hoyer, B.H. y McCullough, N.B. (1968). Homologies of desoxyribonucleic acids from Brucella ovis, canine abortion organisms, and other Brucella species. J. Bact. 96:1783-1790.
- Huddleson, I.F. (1931). Differentiation of the species in the genus Brucella. Am. J. Public Health. 21:491-498.
- Hudson, M., Child, K.N., Hatler, D.F., Fujino, K.K., y Hodson, K.A. (1980). Brucellosis in moose (Alces alces). A serological survey in an open range cattle area of northern central British Columbia recently infected with brucellosis. Can. Vet. J. 21:47-49.
- Huntley, B.E., Philip, R.N. y Maynard, J.E. (1963). Survey of brucellosis in Alaska. J. Infect. Dis. 112:100-106.
- Hurvell, B. (1973). Serological cross-reactions between different Brucella species and Yersinia enterocolitica. Acta Path. Microbiol. Scand. 81:105-112.
- Hurvell, B., y Lindberg, A.A. (1973). Serological cross-reactions between different Brucella species and Yersinia enterocolitica. Acta Path. Microbiol. Scand. 81:113-119.
- Iannelli, D.R., Díaz, R. y Bettini, T.M. (1976). Identification of Brucella abortus antibodies in cattle serum by single radial diffusion. J. Clin. Microbiol. 3:203-205.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A. (1979). Manual de Microbiología Médica. Ed. El Manual Moderno, S.A., México. 650 pp.
- Jellison, W.L., Fisher, C.W. y Cheatum, E.L. (1953). Brucellosis in a moose (Alces americanus). J. Wildl. Mgt. 17:217-218.

- Jones, L.M., Díaz, R. y Taylor, A.G. (1973). Characterization of allergens prepared from smooth and rough strains of Brucella melitensis. Br. J. Exp. Path. 54:492-508.
- Jones, L.M. (1974). Specificity of Brucella protein antigens and the role of lipopolysaccharide antigens in eliciting delayed hypersensitivity reactions in sensitized guinea pigs. Ann. Rech. Vet. 5:189-199.
- Jones, L.M., Díaz, R. y Berman, D.T. (1976). Endotoxic activity of rough organisms of Brucella species. Infect. Immun. 13:1638-1641.
- Jones, L.M. y Berman, D.T. (1976). Studies of Brucella lipopolysaccharide. Im Regamy, R.H., Hulse, E.C. y Valette, L. (Ed.). International Symposium on Brucellosis II, Karper, Basel. 31:62-67.
- Jones, L.M., Berman, D.T., Moreno, E., Deyoe, B.L., Gilsdorf, M.J., Huber, J.D., y Nicolletti, P. (1980). Evaluation of a radial immunodiffusion test with polysaccharide B antigen for diagnosis of bovine brucellosis. J. Clin. Microbiol. 12:753-760.
- Kachwa, S. (1976). Immunoelectrophoresis. In Manual of Clinical Immunology. Rose, N.R. y Friedman, H. (Ed.). Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. pp. 17-24.
- Kaliner, G. y Staak, C. (1973). A case of orchitis caused by Brucella abortus in the African buffalo. J. Wildl. Dis. 9:251-253.
- Kaueenc, J.M.B., Anderson, R.K., Muscoplat, C.C. y Johnson, D.W. (1979). Cell-mediated immune responses in cattle vaccinated with Brucella abortus strain 19 vaccine and nonexposed control animals of the same age. Am. J. Vet. Res. 40:999-1004.
- Katz, J.S. (1941). Brucellosis in wildlife. J. Am. Vet. Med. Assn. 99:24-27.
- Kellerman, G.D., Foster, J.W. y Babakhsh, F.F. (1970). Comparison of chemical components of cell walls of Brucella abortus strains of low and high virulence. Infect. Immun. 2:237-243.
- Keppie, J., Williams, A.E., Witt, K. y Smith, H. (1965). The role of erithritol in tissue localization of the Brucellae. Br. J. Exp. Path. 46:104-108.
- Kraft, M.E. (1955). The identification of Brucella abortus strain 19 by penicillin tolerance. Am. J. Vet. Res. 16:295-296.
- Kreutzer, D.L., Butler, C.S. y Robertson, D.C. (1974). Chemical characterization and biological properties of lipopolysaccharides isolated from smooth and rough strains of Brucella abortus. Infect. Immun. 23:811-818.
- Lacave, C.J., Asselineau, A.S. y Roux, J. (1969). Comparaison de la composition chimique d'une fraction lipopolysaccharide et d'une fraction polysaccharide que isolees de Brucella melitensis. Eur. J. Biochem. 9:189-198.

- Lamb, V.L., Jones, L.M., Gerhardt, G., Schuripo, G. y Berman, D.T. (1979). Enzyme linked immunoabsorbent assay for bovine immunoglobulin subclass specific response to lipopolysaccharide of Brucella abortus. Infect. Immun. 26:240-247.
- Lambert, G., Amerault, T.E., Manthel, C.A. y Goode, E.R. (1961). Immunogenic response of calves vaccinated at different ages with Brucella abortus strain. Proc. U.S. Livestock Sanitary Assn. pp. 93-99.
- Lambert, G. y Amerault, T.E. (1962). An evaluation of the acidified plate test antigens detecting bovine brucellosis. Am. J. Vet. Res. 23:1031.
- Lambert, G. (1964). Further studies on the persistence of Brucella abortus infection in cattle. Proc. U.S. Livestock Sanitary Assn. pp. 109-117.
- Leong, D., Díaz, R., Milner, K., Rudbach, J. y Wilson, J.B. (1970). Some structural and biological properties of Brucella endotoxin. Infect. Immun. 1:174-182.
- Lord, R.D. (1959). The lens as an indicator of age in the cottontail rabbit. J. Wildl. Mgt. 23:358-360.
- Lord, R.D. (1963). The cottontail rabbit in Illinois. Ill. Dept. Conserv. Tech. Bull. N° 3:1-94.
- Luderitz, O., Ruschman, E., Westphal, O., Raff, R. y Wheat, R. (1967). Occurrence of 3-amino-3,6-dideoxyhexoses in Salmonella and related bacteria. J. Bact. 93:1681-1687.
- Luderitz, O., Galanos, C., Melman, V., Nurminen, M., Reitschel, E.T., Rosenfelder, G., Simon, M. y Westphal, O. (1973). Lipid A: Chemical structure and biological activity. J. Infect. Dis. 128:9-21.
- MacPaddin, J.F. (1980). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panam. S.A., Buenos Aires. 301 pp.
- Macrae, R.M. y Smith, H. (1964). The chemical basis of the virulence of Brucella abortus. VI. Studies on the immunity and intracellular growth. Br. J. Exp. Path. 45:236-239.
- Mancini, G., Carbonara, A.O., y Heremans, J.F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry 2:235.
- Manthel, C.A. (1952). Evaluation of vaccinal methods and doses of Brucella abortus strain 19. In Proc. 57th Ann. Meeting U.S. Livestock San. Assn. pp. 115-125.
- Manzullo, A. (1935). Infección natural por Brucella melitensis en el Cavia pamparum. Foja Biol. Buenos Aires. N° 46-48:211-215.

- Marx, A.R., Sandulache, A.P. y Cerbu, A. (1975). Biochemical basis of serological cross-reactions between Brucella abortus and Yersinia enterocolitica serotype o/g. Ann. Microbiol. 4:435-436.
- McGuaghey, W.J. (1959). Brucellosis in wildlife, Diseases in free-living wild animals. Symp. Zool. Soc. London. Academic Press, New York. pp. 99-105.
- McCullough, N.B. y Beal, G.A. (1951). Growth and manometric studies on carbohydrate utilization of Brucella. J. Infect. Dis. 89:266-271.
- McCullough, N.B. (1970). Microbial and host factors in the pathogenesis of brucellosis. W.B. Saunders Co., Philadelphia. pp. 330.
- McDiarmid, A.K. (1954). Comparison of the intradermal and subcutaneous routes in producing immunity to brucellosis in cattle. J. Comp. Path. 64:384-391.
- McDiarmid, A.K. (1957). The degree of duration of immunity in cattle resulting from vaccination with S19 Br. abortus vaccine and its implication in the future control and eventual eradication of brucellosis. Vet. Rec. 69:877-879.
- McDiarmid, A.K. y Matthews, P.R.J. (1974). Brucellosis in wildlife. Vet. Rec. 94:559.
- McDiarmid, A.K. (1975). Some diseases of free-living wildlife. Adv. Vet. Sci. & Comp. Med. 19:97-126.
- McDiarmid, A.K. (1975). Some disorders of wild deer in the United Kingdom. Vet. Rec. 97: 6-9.
- McEwen, A.D., Priestley, F.W. y Patterson, J.D. (1939). An estimate of a suitable infective dose of Br. abortus for immunization tests on cattle. J. Com. Path. and Therapeutics 52:116-128.
- McKenzie, R.A., Green, P.E., Thornton, A.M. y Blackall, P.J. (1979). Feral goats and infectious disease; an abattoir survey. Aust. Vet. J. 55:441-442.
- Merrell, C.L. y Wright, D.N. (1978). A serological survey of mule deer and elk in Utah. J. Wildl. Dis. 14:471-478.
- Meyer, K.F. y ZoBell, G.E. (1932). Metabolism studies on the Brucella group. IV. The bacteriostatic action of dyes. J. Infect. Dis. 51:72-90.
- Meyer, M.E. y Cameron, H.S. (1959). Comparative metabolism of species and types of organisms within the genus Brucella. J. Bact. 78:130-136.
- Meyer, M.E. y Cameron, H.S. (1961). Metabolic characterization of the genus Brucella. I. Statistical evaluation of the oxidative rates by which type I of each species can be identified. J. Bact. 82:387-395.

- Meyer, M.E. y Cameron, H.S. (1961). Metabolic characterization of the genus Brucella. II. Oxidative metabolic patterns of the described biotypes. J. Bact. 82:396-400.
- Meyer, M.E. y Morgan, W.J.B. (1962). Metabolic characterization of Brucella strains that show conflicting identity by biochemical and serological methods. Bull. World Health Org. 26:823-827.
- Meyer, M.E. (1962). Metabolic and bacteriophage identification of Brucella strains described as Brucella melitensis from cattle. Bull. World Health Org. 26:829-831.
- Meyer, M.E. (1964). Species identity and epidemiology of Brucella strains isolated from Alaskan Eskimos. J. Infect. Dis. 114:169-173.
- Meyer, M.E. (1967). Metabolic characterization of the genus Brucella, VI. Growth stimulation by D-erythritol compared with strain virulence for guinea pigs. J. Bact. 93:996-998.
- Meyer, M.E. (1976). Evolution and taxonomy in the genus Brucella: brucellosis of rodents. Theriogenology 6:263-272.
- Meyers, M.E., Jones, L.M. y Vargas Díaz, V.M. (1972). Studies of antigens for complement fixation and gel diffusion tests in the diagnosis of infections caused by Brucella ovis and other Brucella. Appl. Microbiol. 23:894-902.
- Miles, A.A. (1939). The antigenic surface of smooth Brucella abortus and Brucella melitensis. Br. J. Exp. Path. 20:63-82.
- Miller, L.G. y Neiland, K.A. (1980). Experimental infections by Brucella suis type 4 in Alaskan rodents. J. Wildl. Dis. 16:457-466.
- Moody, C.S. (1976). Methodology and application of counterimmunoelectrophoresis in microbiology. Lab Practice 23:575-580.
- Morgan, W.J.B. (1961). The use of Thionin blue sensitivity test in the examination of Brucella. J. Gen. Microbiol. 25:135-139.
- Morgan, W.J.B., Mackinnon, D.J. y Cullen, G.A. (1969). The rose bengal plate agglutination in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec. 85:636-641.
- Moreira-Jacob, M. (1970). Studies and techniques for the classification of the bacterial genus Brucella. International Symposium on Brucellosis. Tunis. 1968. Symp. Series Immunobiol. Standard, 12, Karger-Basel, pp. 167-180.
- Moreno, E., Pitt, M.W., Jones, L.M., Schuring, G.G. y Berman, D.T. (1979). Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from Brucella abortus. J. Bact. 138:361-369.
- Moreno, E., Berman, D.T. y Beettcher, L.A. (1981). Biological activities of Brucella abortus lipopolysaccharides. Infect. Immun. 31:362-370.

- Moreno, E., Speth, S.L., Jones, L.M. y Berman, D.T. (1981). Immunological characterization of Brucella lipopolysaccharides and polysaccharides. Infect. Immun. 31:214-222.
- Morton, J.E., Thorne, T. y Thomas, G.M. (1981). Brucellosis in elk; III. serological evaluation. J. Wildl. Dis. 17:23-31.
- Mylrea, P.J. y Frager, G.C. (1976). The use of supplementary tests in the serological diagnosis of bovine brucellosis. Aust. Vet. J. 32:261-266.
- Nagy, L.K. (1967). Studies on the precipitin content of bovine sera prepared against various biotypes of Brucella abortus. Immunology 12:463-474.
- Neiland, K.A., King, J.A., Huntley, B.E. y Skoog, R.O. (1968). The diseases and parasites of Alaskan wildlife populations, Part 1. Some observations on brucellosis in caribou. Bull. Wildl. Dis. Assn. 4:27-36.
- Neiland, K.A. (1970). Rangiferine brucellosis in Alaskan canids. J. Wildl. Dis. 6:136-139.
- Neiland, K.A. (1975). Further observations on rangiferine brucellosis in Alaskan carnivores. J. Wildl. Dis. 11:45-53.
- Neiland, K.A. (1980). Experimental infections by Brucella suis type 4 in Alaskan rodents. J. Wildl. Dis. 16:457-464.
- Neiland, K.A. y Miller, L.G. (1981). Experimental Brucella suis type 4 infections in domestic and wild Alaskan carnivores. J. Wildl. Dis. 17:183-189.
- Nicolet, J., Schmid, H.R., Studer, H. y Dauwalder, M. (1979). Outbreak of Brucella suis biotype 2 infection among swine in Switzerland. Schweizer Archiv. fur Tierheilkunde 121:231-238.
- Nicoletti, P. y Murachi, T.F. (1966). Bacteriologic evaluation of serological test procedures for the diagnosis of brucellosis in problem cattle herds. Am. J. Vet. Res. 27:689-694.
- Nicoletti, P. (1976). A preliminary report on the efficacy of adult cattle vaccination using strain 19 in selected dairy herds in Florida. Proc. 80th Ann. Meeting U.S. Anim. Health Assn. pp. 91-106.
- Nicoletti, P., Jones, L.M. y Berman, D.T. (1978). Comparison of the subcutaneous and conjunctival route of vaccination with Brucella abortus strain 19 vaccine in adult cattle. J. Am. Vet. Med. Assn. 173:1450-1456.
- Nicoletti, P. (1981). Prevalence and persistence of Brucella abortus strain 19 infections and prevalence of other biotypes in vaccinated adult dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assn. 178:143-145.
- Nosek, J. (1971). The ecology, bionomics and behavior of Haemaphysalis punctata tick in Central Europe. Zeitschrift fur Parasit. 37:198-210.

- Ojasti, J. (1968). Notes on the mating behavior of the capybara. *J. Mamm.* 49:534-535.
- Ojasti, J. (1970). Datos sobre la reproducción del chiguire (Hydrochoerus hydrochaeris). *Acta Cien. Venezuela* 21:27.
- Ojasti, J. y Medina, P.G. (1972). The management of the capybara in Venezuela. *Trans. N.A. Ann. Wildl. and Nat. Res. Conf.* 37:268-277.
- Ojasti, J. (1973). Estudio biológico del chiguire o capybara. Fondo Nac. de Invest. agropec., Caracas. pp. 1-275.
- Ojasti, J. (1978). The relation between populations and production of the capybara (Hydrochoerus hydrochaeris). PhD Thesis, U. Ga., Athens, 204 pp.
- Olitzki, A. (1970). Immunological methods in brucellosis research. Part I. *Bibl. Microbiol.* 8:1-53.
- Olitzki, A. (1970). Immunological methods in brucellosis research. Part II. *Bibl. Microbiol.* 9:1-58.
- Ouchterlony, O. y Nilsson, L.A. (1973). Immunodifusion and immunoelectrophoresis. p. 1-19, 39. In Wier, D.M. (Ed). *Handbook of experimental immunology*. Vol. 1, 2nd Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford/London.
- Ozsan, K., Fazli, A., Aktan, M., y Beyoglu, K. (1976). Brucellosis, tularemia and borreliosis investigations in wild animals captured in Ankara, Konya, Urfa and Nevsehir provinces, Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni* 10:413-421.
- Pacheco, G. y Thiago De Mello, M. (1950). A urease test for the differentiation of Brucella suis. *J. Bact.* 59: 689-691.
- Parish, C.B. (1972). The relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Transplant Rev.* 13:35-56.
- Parnas, J.C., Mardarowicz, M., Tuscklewicz, S., Poplawski, S. y Sider, A. (1967). Brucella cell-wall receptors for phages. *Bull. Acad. Pol. Sci.* 15:255-262.
- Patterson, J.M., Deyoe, B.L. y Stone, S.S. (1976). Identification of immunoglobulins associated with complement fixation agglutination and low pH buffered antigen tests for brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 37:319-324.
- Pearce, J.H., Williams, A.E., Harris Smith, P.W., Fitzgeorge, R.B. y Smith, H. (1962). The chemical basis of the virulence of Br. abortus, II. Erythritol a constituent of bovine fetal fluids which stimulate the growth of Brucella abortus in bovine phagocytes. *Br. J. Exp. Path.* 43:31.
- Pickett, M.J., Nelson, E.L. y Liberman, J.D. (1953). Speciation within the genus Brucella. II. Evaluation of differential dye, biochemical and serological tests. *J. Bact.* 66:219-229.

- Pietz, D. (1977). *Brucella antigens and serological results*. In Bovine Brucellosis An International Symposium. Crawford, R.P. y Hidalgo, R.J. (Ed). Texas A & M Univ. Press, College Station. pp. 49-60.
- Pilet, C., Toma, B. y Andre, G. (1972). Diagnostic serologique de la brucellose par L'Antigene Tamponne (E.A.T.) ou Card Test; Can. Med. Vet. 41:5-19.
- Pinigen, A.F. y Zabrodin, V.A. (1970). On the natural nidity of brucellosis. Vest. Selskokhoz. Nauki (Moscow) 7:96-99.
- Plackett, P., Gottew, G.S. y Best, S.J. (1976). An indirect haemolysis test (IHLT) for bovine brucellosis. Aust. Vet. J. 52:136-140.
- Plata Garcia, V. (1973). Muestreo serológico en chiguirees (Hydrochoerus hydrochaeris). Estado Apure. Proyecto Conicit DF. DF. 030 Sl. Maracay. 6 p.
- Prichard, W.D., Hagen, K.W., Gorham, J.R. y Stiles, F.C. (1971). An epizootic of brucellosis in mink. J. Am. Vet. Med. Assn. 159:635-637.
- Predoiu, I y Cristescu, P. (1972). Value of the rapid haemagglutination test in the diagnosis of brucellosis in wild hares. Rev. de Zootech. Sci. Med. Vet. 22:75-79.
- Predoiu, I. y Visarion, N. (1980). Effect of the eradication policy on brucellosis in swine in Romania. Rev. Cresterea Animal. 30:30-33.
- Randhawa, A.S., Kelly, V.P. y Baker, E.F. (1977). Agglutinins to Coxiella burnetii and Brucella spp. with particular reference to Brucella canis, in wild animals of southern Texas. J. Am. Vet. Med. Assn. 171:939-942.
- Rausch, R.L. (1972). Observations on some natural-focal zoonoses in Alaska. Arch. Environ. Health 25:246-252.
- Raybould, T.J.G. y Chantler, S. (1980). Serological differentiation between infected vaccinated cattle by using purified soluble antigens from Brucella abortus in a hemagglutination system. Infect. and Immun. 29:435-441.
- Regamey, R.H., Hulse, E.C., Valette, L., Thimm, B. y Wundt, W. (Eds.). (1976). The epidemiological situation of brucellosis in Africa. Developments in biological standardization 31(39): International symposium on brucellosis (II), Rabat, Morocco, 1975. Karger-Basel, Switzerland. pp. 201-217.
- Rementsova, M.M. (1960). Brucellosis in hares: Isolation of Br. melitensis Veterinarija (Moscu) 36:26-28.
- Rementsova, M.M. (1962). Brucellosis in wild animals. Chapter 2, Part A. Wild vertebrates as carriers of brucellosis: Natural Brucella-carrying by wild animals. Acad. Sci. Kaz. SSR Press, Alma-Ata. pp. 44-81.

- Renoux, G. y Quatrefores, H. (1951). L'identification des Brucella par leur activite ureasique. Comparaison avec autres methods de differentiation. Ann. Inst. Pasteur 80:182-188.
- Ricciardi, I.D., Nuñez, M.P., Andrade, C.M. y Da Silva, A.G. (1976). Anti-brucella agglutinins in bats and Callithrix monkeys. J. Wildl. Dis. 12:52-54.
- Rice, C.E., Cochrane, D., y Tailyour, J. (1966). Electrophoretic studies of sera from cattle vaccinated or naturally infected with Br. abortus. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 30:161-168.
- Rocklin, R.E. (1974). Products of activated lymphocytes: Leucocyte inhibitory factor (LIF) distinct from migration inhibitory factor (MIF). J. Immun. 112:1461-1466.
- Rode, L.J., Oglesby, G. y Schuardt, V.T. (1950). The cultivation of brucellae on chemically defined media. J. Bact. 60:661.
- Roitt, I.M. (1978). Inmunología esencial. Editorial JIMS, Barcelona. 317 p.
- Rose, J.E. y Roepke, M.H. (1957). An acidified antigen for detection of non-specific reactions in the plate agglutination test for bovine brucellosis. Am. J. Vet. Res. 18:550-555.
- Roux, L. y Bouvier, G. (1946). Brucellose chez la lièvre. Les premières deux cas constatés en Suisse (1936-1946). Schweiz. Arch. Tierheilk. 88:507.
- Sachs, R.C., Staak, C. y Grocock, C.M. (1968). Serological investigation of brucellosis in game animals in Tanzania. Bull. Epizoot. Dis. Afr. 16:91-100.
- Salem, A.A., Hamed, O.M. y Abd-Elkarim, A.M. (1974). Studies on some Brucella carriers in Egypt. Assuit Vet. Med. J. 1:181-187.
- Sambyal, D.S. y Sharma, V.K. (1972). Screening of free living animals and birds for Listeria, Brucella and Salmonella infections. Br. Vet. J. 128:50-55.
- Sanders, E. y Warner, J. (1953). Urease and catalase activities of Brucella melitensis from different geographical regions. A. J. Vet. Res. 14:388-391.
- Sanderson, C.J. y Wilson, D.V. (1971). A simple method for coupling proteins to insoluble polysaccharides. Immunology 20:1061-1065.
- Schieman, B. y Staak, C. (1971). Brucella melitensis in Impala (Aepyceros melampus). Vet. Rec. 88:344.
- Schurig, G.G., Jones, L.M., Speth, S.L. y Berman, D.T. (1978). Antibody response to antigens distinct from smooth lipopolysaccharide complex in Brucella infection. Infect. Immun. 21:994-1002.

Serre, A., Asselineau, J., Lacave, C. y Bascoul, S. (1971). Comparaison des propriétés immunologiques de deux fractions lipopolysaccharides et d'une fraction polisaccharide isolées de Brucella melitensis. Ann. Inst. Pasteur 121: 479-491.

Sharma, V.D., Sethi, M.S., Yadav, M.P. y Dube, D.C. (1979). Sero-epidemiologic investigations on brucellosis in the states of Uttar Pradesh (U.P.) and Delhi (India). International J. Zoonoses 6:75-81.

Smith, H. y Fitzgeorge, R.B. (1964). The chemical basis of the virulence of Brucella abortus. V. The basis of intracellular survival and growth in bovine phagocytes. Br. J. Exp. Path. 45:174-186.

Stableforth, A.W. (1959). Diseases due to bacteria. In Stableforth, A.W. and Galloway, I.A. (Ed). Infectious diseases of animals. Academic Press, New York. Vol. 1. p. 581.

Stanier, R.Y., Doudoroff, M. y Adelberg, E.A. (1977). Microbiología. Aguilar, Madrid. p. 932.

Stauber, E.H., Nellis, C.H., Magonigle, R.A., y Vaughn, H.W. (1977). Prevalence of reactors to selected livestock pathogens in Idaho mule deer. J. Wildl. Mgt. 41:515-519.

Stoll, L. (1972). Serological studies of zoonoses (brucellosis, listeriosis, psuedotuberculosis, leptospirosis) in wild animals. Verlag Paul Parey, Berlin & Hamburg. pp. 55-59.

Sutherland, S.S., y LeGras, D.V. (1978). Evaluation of new and currently used diagnostic procedures for bovine brucellosis. Aust. Vet. J. 54:329-332.

Swann, A.I., Schnurrenberger, P.R., Brown, R.R. y Graby, C.L. (1980). Brucella abortus isolations from wild animals. Vet. Rec. 106:57.

Szyfres, B. y Tomé, J.C. (1966). Natural Brucella infection in Argentine wild foxes. Bull. WHO 34:919-923.

Szyfres, B., González, T.J. y Palacio, T. (1968). Aislamiento de Brucella suis de la leibre europea (Lepus europeus) en la Argentina. Bol. Of. San. Pan. pp. 441-445.

Tabatabai, L.B., Deyoe, B.L. y Ritchie, A.E. (1979). Isolation and characterization of toxic fractions from Brucella abortus. Infect. Immun. 26:668-679.

Tanaka, S., Suto, T., Azuma, R. y Hatakeyama, H. (1977). Chemotaxonomical studies on fatty acids of Brucella species. Ann. Sclavo. 19:67-82.

Taran, I.F. (1971). A comparative study of Brucella suis strains isolated from animals of various species. Protivochny Inst. Staropol. USSR 48:140-143.

- Thimm,B. (1972). Brucellosis in Uganda. Part I. The epizootiological and epidemiological situation. A Historical review. Bull. Epizoot. Dis. Afr. 20:43-56.
- Thimm,B. (1971). Zoonoses and their importance in the development of animal production in East Africa. I. Animal production and the zoonosis problem. II. Brucellosis as an example. Schlact und Viehhof-Zeitung 71:127-133.
- Thomsen,A. (1959). Occurrence of Brucella infection in swine and hares with special regard to the European countries. Nord. Vet. 11:709-718.
- Thorne,E.T., Morton,J.K. y Thomas,G.M. (1978). Brucellosis in elk. I. Serologic and bacteriologic survey in Wyoming. J. Wildl. Dis. 14:74-81.
- Thorne,E.T.,Morton,J.K. y Thomas,G.M. (1978). Brucellosis in elk. II. Clinical effects and means of transmission as determined through artificial infections. J. Wildl. Dis. 14:280-291.
- Thorne,E.T. y Ray,W.C. (1979). Brucellosis, its effect and impact on elk in western Wyoming. pp. 212-220. In North American Elk: Ecology, Behavior and Management. Boyce,M. y Hayden-Wing,L. (Eds). Univ. Wyoming, 294 p.
- Thorpe,B.D., Sidwell,R.W. y Lundgrum,D.L. (1967). Experimental studies with four species of Brucella in selected wildlife, Laboratory and domestic animals. Am. J. Trop. Med. & Hyg. 16:665-674.
- Tizard,I.R. (1979). Inmunología veterinaria. Interamericana, México. 404 p.
- Tunnecliff,E.A. y Marsh,H. (1935). Bang's disease in bison and elk in Yellowstone National Park and the National Bison Range. J. Am. Vet. Med. Assn. 86:745-752.
- U.S. Dept. Agriculture. Laboratory procedures for isolating, identifying and typing Brucella. National Vet. Serv. Lab., Ames, Iowa. Diag. Reag. Manual 65F. 37 p.
- Velasco,I. (1981). El chiguire: El reto de la capitalización de un recurso natural. Interciencia 6:1-3.
- Vitovec,J. (1976). Pathological studies on 70 cases of brucellosis in hares caused by Brucella suis. Vet. Med. 21:359-368.
- Waghela,S. (1976). Animal brucellosis in Kenya: a review. Bull. Anim. Hlth. and Prod. Afr. 24:53-59.
- Waghela,S. (1977). Brucellosis in Kenya. Kenya Vet. 1:3-7.
- Weeke,B. (1973). Crossed immunoelectrophoresis. In A manual of quantitative immunoelectrophoresis. Axelsen,N.H., Kroll,J. y Weeke,B. (Ed). Universitets-forlaget, Oslo.

- Williams, A.E., Keppie, J. y Smith, H. (1964). The relation of erythritol usage to virulence in the brucellas. *J. Gen. Microbiol.* 37:285-292.
- Williams, C.A. (1971). Precipitation analysis by diffusion in gels. *Methods Immunol. Immunochem.* 3:322-326.
- Wilson, G.S. y Miles, A.A. (1932). The serological differentiation of smooth strains of the Brucella group. *Br. J. Exp. Path.* 13:1-13.
- Wilson, J.B. y Dassinger, B.L. (1965). Biochemical properties of virulent and avirulent strains of Brucellae. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 88:1155-1166.
- Witter, J.F. y O'Meara, D.C. (1970). Brucellosis. In infectious diseases of wild animals. Karstad, L.H. y Trainer, D.O. (ed). Iowa State Univ. Press, Ames. pp. 249-255.
- Wood, G.T., Donaldson, B.R., Snyder, W.A. y Hanson, L.E. (1958). Serology of New Mexico javelina (*Peccari angulatus*) for evidence of some zoonotic infections. *Bull. Wildl. Dis. Assn.* 4:139.
- Wood, W.A. y Corbel, M.J. (1973). Concentrations of bovine serum protein classes in relation to reactivity in serological tests for brucellosis. *J. Comp. Path.* 83:143-150.
- World Health Organization. (1971). Fifth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. WHO Tech. Report Series N^o 464. Geneva.
- Youatt, W.G. y Fay, L.D. (1959). Experimental brucellosis in white-tailed deer. *Am. J. Vet. Res.* 20:295-296.
- Zarnke, R.L. (1978). Occurrence of selected microbial pathogens in Alberta wild animals. *Disertation Abstracts International.* 398:2694-2695.
- Zenkova, N.F. (1969). Immunological reactivity of some wild animals (particularly gerbils) to brucellosis. *Publ. Izdatel'stvo 'FAN' Tashkent. USSR.* pp. 73-77.
- Zenkova, N.F. (1975). Susceptibility to brucellosis of souslik, gerbil, hedgehog, tortoise and frog. *Publ. Alma-Ata. USSR. Acad. Nauk Kaz. SSR.* 150:22-30.