

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



“ MONOGRAFIA SOBRE BRUCELOSIS ”

(TRABAJO MONOGRAFICO)

NOMBRE DEL SUSTENTANTE:

MARIA DEL ROCIO MONROY ROMERO

CARRERA:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

AÑO:

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

INDICE

	Pág.
CAPITULO I	
Introducción.	1
CAPITULO II	
Historia del padecimiento	2
CAPITULO III	
Características del microorganismo	6
CAPITULO IV	
Consideraciones clínicas y métodos de identificación.	25
CAPITULO V	
Prevención y tratamiento.	51
CAPITULO VI	
Control y Erradicación	61
CAPITULO VII	
Resumen	68
CAPITULO VIII	
Bibliografía.	72

CAPITULO I

INTRODUCCION.

La brucelosis, una de la zoonosis de mayor importancia-- para el hombre, tiene una distribución mundial. En Algunos -- países de América Latina, como México, Perú y Argentina, la - brucelosis humana registra la incidencia más alta del Conti - nente. En otros países, como Estados Unidos y Canadá, la pre- valencia es muy baja.

No solo ocasiona grandes pérdidas económicas cuando dis- minuye la producción y la productividad ganadera, sino que - también afecta seriamente la salud del hombre, ya que bajo - condiciones especiales puede adquirir esta enfermedad (51).

Esta situación que daña en forma seria a nuestro país, - despertó el interés por profundizar en ella.

El objetivo de este trabajo, es actualizar los conoci - mientos que se tienen, tanto en lo que se refiere a las bacte - rias que originan la brucelosis, como en los métodos y técni - cas para su identificación. Asimismo conocer los procedimien - tos que han empleado aquellos países en los cuales se ha lo - grado erradicar esta zoonosis que afecta en forma considera - ble a ciertas partes de la población mundial.

CAPITULO II

HISTORIA DEL PADECIMIENTO

Durante la guerra de Crimea (1856 - 1864), por primera vez se observaron numerosos casos de fiebres prolongadas, que no se podían comparar a las producidas por las enfermedades que eran conocidas hasta entonces. La sospecha de que esta fiebre era producida por una infección nueva, se confirmó con la aparición de muchos casos, particularmente en la isla de Malta y en otros países mediterráneos.

En 1859, Marston hizo estudios clínicos y autopsias de casos de fiebres mediterráneas y presentó más tarde una descripción detallada de la enfermedad tal como ocurría en Malta.

Bruce en 1886, investigando la enfermedad conocida como Fiebre de Malta, Fiebre del Mediterráneo, o Fiebre Ondulante, descubrió una bacteria en casos fatales de esta enfermedad a la cual llamó Micrococcus melitensis. Esta era una enfermedad de gatos transmisible al hombre. Fue encontrada en la isla de Malta, donde habían sido afectadas guarniciones británicas así como aborígenes de la isla. Además fue ocasionalmente reportada en Italia, España, Grecia, Argelia, Tunez, Palestina, Arabia, India, Sudafrica, China y varias partes de América del Sur.

En 1904, Bruce y Lammit, hallaron aglutininas en el suero de las cabras infectadas y pusieron de manifiesto la importancia epidemiológica de estos animales prohibiendo el consumo de leche cruda, disposición sanitaria que controló la infección de las fuerzas inglesas en la isla de Malta.

Bang en Dinamarca, durante el año de 1897, aisló una bacteria responsable de aborto contagioso en el gato. Esta enfermedad fué comúnmente conocida como la enfermedad de Bang y al microorganismo causal se le dió el nombre de Brucella abortus. MacNeal y Kerr en 1910 fueron los primeros en aislar y cultivar este microorganismo en los Estados Unidos de Norteamérica.

Fué hasta el trabajo de Alice Evans, publicado en 1918, que estas dos enfermedades, una de cabras y hombre y la otra de gatos, demostraron su estrecha relación, al ver que la morfología bacteriana era similar, al igual que sus cultivos y sus propiedades serológicas.

Un tercer grupo de brucelas fué aislado por Traum en 1914, cultivando órganos de fetos abortados por cerdos hembras. Se trataba de un germen más relacionado al bacilo de Bang, que al melitensis. La importancia del nuevo microorganismo en la economía ganadera fué reconocida hasta 1924, cuando Keefer demostró el primer caso de Brucelosis humana producido por un germen diferente de Brucella melitensis. (17)

Más recientemente se reconoció otra especie de brucelase que causaba aborto en perros. En 1968, fué identificada y se designó como Brucella canis. Subsecuentemente se describieron casos en humanos infectados con este microorganismo; personal de laboratorio u otros y personas que habían estado en contacto con perras caseras infectadas, además de otros en los cuales la infección había sido detectada serológicamente en ausencia de síntomas reportados.

La brucelosis es primordialmente una enfermedad de animales domésticos o semidomésticos (gato, perro, cabra, cerdos, vacas, etc.), y su transmisión de un hombre a otro es un raro acontecimiento. La infección en los animales es el factor más importante en la ecología de las brucelas, ya que el animal infectado, transmite la infección a otros con facilidad; la enfermedad tiende a volverse crónica y las bacterias se excretan en grandes cantidades durante períodos prolongados.

La presencia de la brucelosis en el ganado bovino y caprino, ofrece un amplio reservorio donde el hombre puede adquirir la infección. Cuanto más contacto haya con estos animales, sobre todo en zonas endémicas, mayor será la posibilidad de contraer la enfermedad.

El riesgo profesional de adquirir la brucelosis es importante por la posibilidad de transmisión directa procedente de animales infectados; la gente empleada en la produc -

ción ganadera, principalmente en aquellos países que basan su desarrollo económico en esta industria, puede verse afectada en su trabajo y detener así la misma producción. (51)

Igualmente riesgo profesional existe entre laboratoristas, médicos veterinarios y técnicos dedicados a la preparación de vacunas y reactivos con fines diagnósticos.

CAPITULO III

CARACTERISTICAS DEL MICROORGANISMO

Generalidades:

Clasificación del microorganismo.

Orden:	Eubacteriales
Familia:	Parvobacteriaceae
Tribu:	Brucellaceae
Género:	Brucella

Son cuatro las principales especies estrechamente relacionadas, que constituyen el género *Brucella*: *Br. melitensis*, *Br. abortus*, *Br. suis* y *Br. canis*, además se ha colocado en este grupo *Alcaligenes bronchisepticus*, bajo el nombre de *Br. bronchiseptica*. Otras especies han sido escuetamente descritas como *Br. ovis* y *Br. neotomae*. (58)

Género *Brucella*: Son bacilos diminutos con muchas formas coccoides o cocobacilares de 0.5 por 0.5 a 2.0 micrones, promedio 0.8 μ solos o en parejas unidos por sus extremos o en pequeños grupos y a veces cadenas cortas, aerobios inmóviles, no esporulados, Gram negativos, algunas veces presentan tinción bipolar o se tiñen irregularmente, con relativa inactividad metabólica. Puede demostrarse la presencia de cápsulas

en las variantes lisas y mucoides.

Sus colonias son pequeñas, redondas, convexas, lisas y relucientes en medios enriquecidos, pudiendo volverse parduzcas con el tiempo. Para su desarrollo prefieren una presión de oxígeno parcial o ligeramente reducida con presencia de CO_2 , dependiendo de la especie de que se trate. No licuan la gelatina. Patógeno al hombre y a los animales, siendo característica su localización intracelular. (50)

. Características del crecimiento: Los microorganismos del género *Brucella* están adaptados a un habitat intracelular, y sus requerimientos nutritivos son complejos. Algunas cepas han sido cultivadas en medios sintéticos, compuestos por 18 aminoácidos, vitaminas, sales y glucosa. Las vitaminas indispensables son: Tiamina, Niacina y Biotina; el pantotemato de calcio con frecuencia tiene un efecto estimulante. En general son oxidasa positivos. Poder ureolítico variable, no utilizan el citrato, no producen indol, no oxidan la leche tornasolada. Intervalo de temperatura, 20 a 40°C; temperatura óptima: 37°C, pH óptimo: 6.6 a 7.4. Los productos patológicos recientemente obtenidos de fuentes animales o humanas, se inoculan generalmente en agar de soya tripticasa o gelosa infusión de hígado. Diversos componentes del medio pueden manifestar efectos dañinos para el microorganismo en cuestión (por ejemplo, pueden liberarse niveles tóxicos de azufre procedentes de los aminoácidos azufrados del medio), y es nece-

sario que otros constituyentes del medio neutralicen estos efectos tóxicos, para permitir así el crecimiento de Bruce-lla. Brucella abortus requiere 5 - 10% de anhídrido carbónico para su crecimiento, en tanto que las tres especies res-tantes desarrollan bien en presencia de aire.

Brucella utiliza diversos carbohidratos, pero no produ-ce ácido ni gas en cantidades suficientes como para aprove-char estas pruebas en su clasificación. Algunas cepas produ-cen catalasa y esto puede tener correlación con la virulen-cia. Muchas cepas producen ácido sulfhídrico, los nitratos son reducidos a nitritos; son moderadamente sensibles al ca-lor y a los ácidos y son destruidas en la leche durante la -pasteurización.

. Antigenicidad: Se ha demostrado la presencia de dos-antígenos primordiales en la superficie de brucelas lisas, - las cuales fueron identificadas como A y M. Estos son lipopo-lisacáridos asociados con cantidades variables de polipépti-do, que poseen características endotóxicas similares a las -endotoxinas de las enterobacterias. El fragmento lípido, lla-mado lípido A, es responsable de la toxicidad, el polipépti-do parece ser esencial en la inducción de hipersensibilidad-retardada en animales sensibles, mientras que el componente-polisacárido posee la mayor actividad antigénica siendo res-ponsable de la especificidad serológica. (108).

. Virulencia: Debido a que Brucella se localiza y repro

duce dentro de las células del huésped, y en esta forma el microorganismo se protege de los mecanismos humorales, se ha propuesto la capacidad de la bacteria para crecer a nivel intracelular como un posible mecanismo de virulencia.

La localización intracelular de *Brucella* es de fundamental importancia en sus relaciones con el huésped, ya que al penetrar a la célula, no sólo se destruye ésta sino que la bacteria es protegida de los factores humorales, y la célula huésped constituiría un medio para alcanzar otras partes del organismo.

Hay cepas de baja virulencia que tienen un alto consumo de glutamato y debido a esto, la célula huésped es desprovista de esta sustancia destruyéndose así su integridad metabólica y, consecuentemente, ocurriría la destrucción de la célula y la liberación de *Brucella* al medio donde serían destruidas por los agentes bactericidas. (105)

. Resistencia: Las especies del género *Brucella*, son muy susceptibles a la acción directa de los rayos solares. En tejido necrótico, tanto de fetos como de placenta, estas bacterias son capaces de vivir durante 6 meses, mientras que en el suelo, en ambiente seco y protegidas de la luz solar, resisten 2 a 3 meses. En bajas temperaturas, en agua, leche, orina y otras secreciones, pueden vivir hasta 2 años o más. La pasteurización las destruye muy fácilmente. La desinfección puede hacerse con fenol, formol, compuestos cuaternarios

rios de amonio o con sosa, obteniéndose resultados favorables. (108)

Es importante mencionar que Br. melitensis infecta en forma típica a las cabras, Br. suis, a los cerdos, Br. abortus al ganado bovino y Br. canis a los perros. La enfermedad en el hombre, llamada brucelosis, la cual es provocada por cualquiera de estas especies, está caracterizada por una fase septicémica aguda seguida por un estadio crónico que puede prolongarse muchos años y llegar a afectar diversos tejidos.

. Identificación: Los cuatro microorganismos son muy afines, diferenciándose en el laboratorio por reacciones bioquímicas y serológicas. Cuando se aísla un germen que se sospecha del género *Brucella*, el cultivo debe someterse a las siguientes pruebas de confirmación:

- a) Apariencia típica de las colonias
- b) Prueba de movilidad
- c) Aglutinación con un suero específico de *Brucella*
- d) Tinción de Gram

. Propiedades especiales: *Brucella melitensis*. Es inactivo respecto a los azúcares, aerobio, sólo produce trazas de H_2S en un medio peptonado. Crece generalmente en presencia de fucshina básica. Posee un antígeno M predominante. Se reconocen 3 biotipos.

Brucella abortus. Es positiva para varias reacciones de azúcares, según su biotipo. Suele necesitar la presencia de CO_2 (5%) para crecer, sobre todo durante el aislamiento primario. Produce en general, cantidades moderadas de H_2S , pero puede también no producirlas. Suele desarrollar en presencia de fucshina básica, pero es inhibida por la tionina. Posee en forma regular un antígeno A predominante. Se conocen 9 biotipos.

Brucella suis. Fermenta la glucosa, maltosa, manosa y triosa. Produce grandes cantidades de H_2S o al contrario, no las produce en absoluto. Crece cuando hay tionina en el medio, pero, en general el crecimiento se inhibe en presencia de fucshina básica. Tiene un antígeno A predominante. Hay 4 biotipos.

Brucella canis. Aerobio, no produce H_2S , no crece sobre la fucshina básica, pero sí sobre la tionina. Los cultivos, incluso durante el aislamiento primario, no están en fase lisa (S) y no poseen los antígenos A y M de Brucellas lisas. Producen aglutinación cruzada con las variantes rugosas (R) de las demás especies. (94)

CARACTERES DIFERENCIALES GENERALES (94)

Especies	Biotipo	Aglutinación por			Huésped más común
		Sueros Mono		Suero anti-rugoso	
		específicos			
		A	M		
<u>Br. Melitensis</u>	1	-	+	-	Ovinos, caprinos
	2	+	-	-	" "
	3	+	+	-	" "
<u>Br. abortus</u>	1	+	-	-	Bovinos
	2	+	-	-	"
	3	+	-	-	"
	4	-	+	-	"
	5	-	+	-	"
	6	+	-	-	"
	7	+	+	-	"
	8	-	+	-	"
	9	-	+	-	"
<u>Br. suis</u>	1	+	-	-	Porcinos
	2	+	-	-	Porcinos, liebres
	3	+	-	-	Porcinos
	4	+	+	-	Renos
<u>Br. Canis</u>		-	-	+	Perros

. Medios para el aislamiento primario de Brucella: En su habitat natural crecen intracelularmente en los tejidos lesionados, lo cual puede explicar que necesiten medios de cultivo especialmente enriquecidos en el laboratorio.

El crecimiento es lento, generalmente requiere una semana pero debe continuarse la observación durante dos meses antes de reportarse como negativo.

Se han recomendado, de acuerdo a la muestra, muchos medios sólidos, ya que se facilita la identificación y el aislamiento de las colonias en crecimiento limitando la formación de las mutantes no lisas. Sin embargo, los medios líquidos se utilizan con mayor frecuencia para el aislamiento primario a partir de la sangre y otros humores. Algunos de los medios recomendables que dan resultados especialmente buenos son los siguientes:

- . Agar suero dextrosa
- . Agar de infusión patatas y suero
- . Medios comerciales.- Soya tripticasa, agar triptosa, y agar Brucella (Albimi), que contiene suero.
- . Agar sangre (5% de sangre de cordero en un agar base para medio sanguíneo)

Medios líquidos: El caldo Brucella (Albimi), caldo triptosa, caldo de soya tripticasa y el de León con extracto de nopal; son buenos medios líquidos. Cuando se desea hacer aislamiento a partir de sangre o de otros humores por el método de Ruiz -

Castañeda, se puede utilizar cualquiera de estos medios, pero añadiendo agar a una parte para obtener un medio doble.

Medios selectivos: La adición de antibióticos-bacitracina, -polimixina B y cicloheximida- a los 3 primeros medios mencionados, permiten el crecimiento más fácil de Brucella, ya que se eliminan los contaminantes.

Subcultivos: Para las resiembras se pueden usar los indicados en la sección de medios sólidos, excepto el agar sangre.

. **Métodos de aislamiento.** A partir de la leche: se usan medios sólidos selectivos.

A partir de tejidos: Las piezas obtenidas en forma aséptica, se colocan formando estrías sobre un medio de agar.

A partir de secreciones vaginales: Una muy buena fuente para poder aislar Brucella, es la toma de una muestra vaginal después del parto o del aborto de cabras, ovejas o vacas; es mejor emplear un medio selectivo sólido. (94)

. **Diferenciación:** Las distintas especies de Brucella pueden ser diferenciadas entre sí por su resistencia a diferentes colorantes, los cuales son incorporados en las placas de agar soya tripticasa en concentraciones adecuadas que manifiestan claras diferencias de acción bacteriostática, siendo una de ellas la inhibición. El realizar esta prueba es muy útil, ya que determina la capacidad de Brucella para desarrollarse en presencia de ciertos colorantes. Los que dan-

los mejores resultados en esta prueba son: la fucshina básica y la tionina, así como la pironina además están el cristal violeta y el azul. Es necesario determinar la concentración adecuada del colorante según al medio que se emplee; cuando se utiliza fucshina básica Certificado #NF58 y tionina Certificado #NT16, es recomendable una dilución final de 1/80,000, ya sea de uno o del otro colorante cuando se trate de medios como tripticasa soya o Albimi. En agar papa, la dilución será 1/25,000. La pironina se emplea a una dilución 1/100,000. En el caso de que una cepa no se tipifique satisfactoriamente usando las concentraciones que se indicaron, se hacen nuevas pruebas usando un cultivo fresco empleando 2 o 3 diluciones del colorante a fin de determinar cuál es la más apropiada. Simultáneamente a la muestra en estudio se hacen pruebas de control empleando cultivos conocidos. Los medios de cultivo deben ser recientes y los colorantes se añaden a los medios inmediatamente después de la esterilización. Si los colorantes usados no son certificados, debe determinarse la concentración basándose en la cantidad de colorante que poseen. Se preparan placas de infusión hígado, ajustando el pH a 6.6.

. Variación: Se pueden reconocer variantes lisas, mucoides, y rugosas, tanto por la morfología colonial como por la virulencia. Los organismos virulentos típicos forman colonias lisas y transparentes, pero tienden a mutar a la forma rugosa que es avirulenta. Las células avirulentas (rugosas), aglutinan en solución de acriflavina al 1%, en tanto que las

virulentas (lisas) no lo hacen.

La selección de mutantes "in vivo" parece estar influida 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. Las especies animales resistentes a la infección carecen de estos factores, de modo que puede presentarse una mutación rápida a las formas avirulentas. Se ha mostrado "in vitro" que la D-alanina tiene un efecto selectivo similar. (50)

. Tipificación: Requerimiento de CO_2 .- La determinación del requerimiento de CO_2 adicional para el desarrollo de Brucella abortus es una de las pruebas más constantes de identificación.

Son varias las teorías que explican esta necesidad de CO_2 , siendo la más reciente la de Marr y Wilson (58). Se observó el crecimiento de cultivos en presencia de C^{14}O_2 , más tarde examinando las fracciones celulares, se encontró que el 60% del CO_2 radiactivo estaba en las fracciones glicina y serina, esto indica que el CO_2 adicional es necesario para que las células elaboren sus proteínas.

Ya que Brucella abortus pierde gradualmente este requerimiento para su desarrollo, debido a la adaptación de las células a las condiciones en que se encuentran, es conveniente

te repetir esta prueba. Se emplea un cultivo de 48 horas. El cultivo se suspende en caldo o solución salina (una asada en 5 cc de líquido). Una asada de la suspensión se siembra en medio de agar, incubando el cultivo en una atmósfera al 10% de CO_2 .

Se observa el cultivo durante dos días. Un tubo testigo sembrado de la misma manera se incuba en una atmósfera normal, y otro de una cepa conocida que requiera CO_2 , se incuba con fines de comparación. Brucella suis y Brucella melitensis no requieren CO_2 para su desarrollo.

Producción de H_2S .- La producción o no de H_2S , depende de la cantidad y de los tipos de compuestos sulfurados que contenga el medio y un procedimiento estándar. El agar hígado y el agar papa en tubo inclinado, son considerados como los mejores medios para este propósito. Se emplea un cultivo de 48 horas y con un asa se hace una siembra abundante sobre la superficie del medio. Se prepara papel al acetato de plomo sumergiendo papel filtro absorbente (Whatman # 1), en una solución neutra de acetato de plomo al 10% durante una hora. Las tiras de papel filtro se dejan secar. Una tira de este papel se coloca en la boca de cada tubo, manteniéndola en ese lugar con el tapón de algodón. Se debe evitar que el papel se moje. Los cultivos se incuban a 37°C y diariamente se examinan las tiras de papel durante cinco días para observar si hay ennegrecimiento, si es que lo hay, se reemplaza la tira-

por una nueva para determinar el tiempo de producción.

En general Brucella melitensis produce ennegrecimiento moderado durante dos días o poco más, Brucella suis, produce un ennegrecimiento intenso durante cuatro o cinco días, exceptuando la variedad Danesa que no produce H_2S . En las formas lisas, la producción es mayor. La rapidez con que se efectúa la reacción en el caso de Brucella abortus y Brucella suis, se debe a la acción enzimática de la dihidrosulfhidrasa, sobre los sulfuroaminoácidos.

Producción de Ureasa.- Esta determinación es de algún valor, aunque limitado en la tipificación de las especies. Es una determinación semi-cuantitativa de la actividad de ureasa en cultivos de Brucella. El método recomendado es el de Bauer.- La mayor utilidad de esta prueba consiste en distinguir a -- Brucella abortus de Brucella suis. Sin embargo, muchas veces da resultados equivocados por lo que se debe correlacionar con los resultados de otras pruebas.

Utilización de la dextrosa.- Esta prueba como la anterior, no es digna de mucha confianza, por lo que se debe relacionar con otras pruebas. (58)

Sueros monoespecíficos.- Estos sueros son de gran valor en la tipificación si se dispone de sueros certificados. Su preparación no es fácil, ya que no se puede establecer ninguna regla empírica que garantice su obtención satisfactoria.

Con este fin se utilizan conejos libres de infección -

brucelósica para inocularlos, provocándoles una infección activa por inyección de aproximadamente 100 millones de gérmenes vivos de un cultivo en fase lisa (S) de 48 horas de desarrollo en la vena auricular y los sueros obtenidos son sometidos a la prueba de aglutinación con Brucella abortus y Brucella melitensis para lograr una diferenciación cierta. El uso de sueros mal preparados, puede dar lugar a confusiones.

Disociación.- El término disociación se usa para indicar la transformación de Brucella en nuevos tipos de colonias durante su ciclo sexual de reproducción.

El examen de las colonias sobre medio de agar, se hace observando su forma, diámetro, opacidad, color, consistencia y textura. Para efectuar el estudio de la disociación de Brucella, es necesario obtener previamente cultivos patrón con objeto de determinar la pureza de la colonia, especialmente cuando el germen ha sido aislado de la sangre o de un tejido infectado, en donde es común encontrar más de un tipo de colonias. El medio líquido satisfactorio para obtener una rápida disociación del tipo (S) en otros tipos de colonias, es el caldo triptosa.

La suspensión de gérmenes aislados se siembra en tubos y se incuba a 37°C, pasados 30 días se toma una asada y se resiembra en agar triptosa por estrias para obtener colonias aisladas, éstas se observan por primera vez a los 4 días de incubación a 37°C. Las cajas de petri se colocan después a -

20-25°C, en una atmósfera con humedad relativa no menor del 30% y se examinan a intervalos.

El crecimiento es translúcido y húmedo o grasoso en apariencia, cuando se observa desde la tapa o con luz directa - incidiendo en ángulo inclinado. Algunos de los cambios más sorprendentes en la morfología de las colonias ocurren lentamente durante una larga incubación a temperatura ambiente, apareciendo las colonias hijas entre los 4 y 40 días que, generalmente, son de un tipo diferente al de la colonia madre. Ciertos tipos de colonias madres desarrollan más de un tipo de colonias hijas.

Es difícil, por simple observación, llegar a conocer las verdaderas características morfológicas de cada tipo de colonia, las que pueden variar de tamaño de acuerdo con la densidad de la población, es más, cuando cierto tipo de colonias crecen sobre placas de agar en presencia de otras de diferente especie, son más pequeñas de diámetro y reflejan un color diferente al que tienen cuando son de la misma especie (tipo simple). Los colores que tienen las colonias de *Brucella* son de matices pastel y por esto, es difícil compararlos con cualquier sistema estándar de colores. La consistencia y textura de las colonias se determina por levantamiento con una pequeña espátula.

De acuerdo con esta observación, las colonias se clasifican en: grasosas, granulares, pulposas, blandas, mucoides, duramucoides o cerosa mucoides. La determinación de las dife-

rentes consistencias se relacionan al color en los diferentes tipos de colonias.

Una prueba simple y rápida para determinación del tipo de colonias es la de Braum y Benastell, que se efectúa colocando en una platina una pequeña cantidad de células que se emulsifican con una gota de solución salina, añadiendo una gota de solución acuosa de acriflavina neutra al 1 X 1000 y se mezcla. Si hay una rápida floculación o formación de gránulos, se trata de la forma (R). La ausencia de esta floculación indica que las colonias pertenecen a la forma (S). En el caso de que se forme un hilillo viscoso, las colonias pertenecen a la forma (M).

La estabilidad de las células de los diferentes tipos de colonias, se determina preparando una suspensión de 10^9 - cél/cc en solución salina en unos tubos pequeños de aglutinación, se incuban a 37°C por 24 horas. Algunas células de tipo (R) y (M) se sedimentan a las 24 horas. Esta prueba se hace para saber si la suspensión celular puede usarse como antígeno para estudios de aglutinación.

La propiedad aglutinante de un tipo de colonia, no puede ser determinada o comparada con otro tipo, si la suspensión no permanece estable durante un período de 72 horas. La aglutinabilidad de diferentes suspensiones de células en solución salina se establece en presencia de sueros específicos.

Muchos tipos de colonias de *Brucella* son semejantes cuando se examina su color natural, pero son fácilmente distinguibles cuando crecen sobre agar triptosa, el área central circular de las colonias en fase (S) de *Brucella suis* toman un color obscuro casi negro, las de *Brucella abortus* presentan una sombra roja y las de *Brucella melitensis* presentan un color rojo más claro que el de *Brucella abortus*. Los bordes de las colonias de *Brucella suis* se colorean de amarillo pálido opaco, los de *Brucella abortus* de un azul verdoso transparente - y los de *Brucella melitensis* de un rosado pálido opaco. (58)

Las características mencionadas, nos dan una idea del crecimiento de *Brucella* y cómo poder identificarlas. Existen otras propiedades de este microorganismo las cuales han sido descubiertas recientemente y que nos permiten entender mejor su forma de actuar "in vivo".

De las especies de *Brucella*, la más usada para realizar estudios experimentales es *Brucella abortus*, por lo tanto, lo que se menciona a continuación es referente a esta.

PROPIEDADES BIOQUIMICAS.

Los microorganismos del género *Brucella* tienen la propiedad de sobrevivir y crecer dentro de células mononucleares. La tasa de multiplicación y utilización de carbohidratos, se ve marcadamente incrementada cuando *Brucella* desarrolla bajo vigorosa aereación, lo cual sugiere que algún sistema de cadena respiratoria acoplado a oxígeno, es de importancia en la -

fisiología de la célula. El catabolismo de la glucosa, ocurre por la vía de hexosa monofosfato en conjunción con el ciclo del ácido tricloroacético, también cataboliza eritritol a través de series de intermediarios como: dihidroxiacetona fosfato y CO_2 .

Smith y colaboradores son los primeros que describen el papel único del eritritol en la patogénesis y fisiología del género *Brucella*. Un crecimiento muy extenso de bacterias ocurre en tejidos fetales y fluidos de vacas preñadas, ovejas, cabras y cerdos hembras.

Primero se presenta un shock endotóxico y después el aborto. En contraste con los animales, el microorganismo causa en el hombre una enfermedad crónica, en la cual son infectadas las células del sistema reticulo endotelial. Esto es muy importante, ya que el eritritol es un azúcar que está presente solamente en fluidos fetales y tejido de animales que sufren abortos agudos infecciosos. Así pues, se ha levantado una considerable controversia concerniente con la posible relación entre la utilización del eritritol y la virulencia de la bacteria.

La infección con *Brucella melitensis* y *Brucella suis* ha estado bien mostrada por co-inyección de eritritol, ya que éste puede jugar un papel selectivo en la localización de bacterias en los tejidos fetales. Esto es posible ya que a través de siglos de asociación con animales, ha evolucionado un sistema único de enzimas para catabolismo de eritritol.

La capacidad para catabolizar éste, es casi universal en Brucella y puede explicar particularmente las bases bioquímicas de la localización exhibida por esta bacteria en tejido. (95)

Si la utilización del eritritol es un factor de virulencia para este microorganismo, tal vez sea revelado en estudios futuros sobre la regulación del proceso del eritritol y por otros estudios nuevos que definan su papel en la fisiología de la célula.

CAPITULO IV

CONSIDERACIONES CLINICAS Y METODOS
DE IDENTIFICACION.

Se conoce como brucelosis, a la enfermedad de los animales o el hombre causada por cualquiera de las especies de -- Brucella; Br. abortus, Br. melitensis, Br. suis y últimamente han sido reportados casos de brucelosis en humanos por Br. canis.

. Consideraciones clínicas.- El criterio seguido para establecer el diagnóstico de brucelosis, ha sido que se obtuvieran, al menos, dos de los siguientes datos:

- 1.- Cuadro clínico compatible con una brucelosis
- 2.- Seroaglutinaciones positivas
- 3.- Hemocultivo positivo para Brucella

. Sintomatología.- Por ser una enfermedad de tipo multiforme, no cabe esquematizar sus manifestaciones clínicas. Dado lo difícil que es establecer un período de incubación y la gran variedad de las formas al inicio de la infección, se ha preferido estudiar los síntomas agrupándolos en los siguientes apartados:

- . Fiebre
- . Sudoración (con olor especial a paja mojada)
- . Síntomas musculares y osteoarticulares

. Signos

a.) Hepatomegalia.- El hígado participa regularmente en el proceso patológico de la brucelosis, aunque sus manifestaciones clínicas son extraordinariamente polimorfas. Hepatomegalia, ictericia, síndrome hemorrágico, hepatomegalia dolorosa, ascitis brucelar. Formas hepáticas combinadas con nefritis, neumonitis y cirrosis brucelar.

b.) Esplenomegalia.- Se presente síndrome de inhibición medular (anemia, leucopenia y trombocitopenia).

c.) Adenopatías

d.) Neurobrucelosis.- El extraordinario polimorfismo de la brucelosis se manifiesta también en sus complicaciones neurológicas, apareciendo cuadros clínicos muy variados y diversos en los distintos sujetos. Para valorar la participación del Sistema Nervioso en el transcurso de la enfermedad, se puede decir que existe una serie de manifestaciones inespecíficas, tales como cuadros reactivos por la cronicidad de la infección, manifestaciones totalmente superponibles a las que aparecen en el transcurso de una infección aguda de cualquier etiología y que no se consideran verdaderas neurobrucelosis. Se habla de neurobrucelosis cuando existe un conjunto de complicaciones neurológicas precoces o tardías, debidas a *Brucella* por la localización del germen en el Sistema Nervioso, y por lo tanto clínicamente se encuentran manifestaciones neurológicas claramente objetivas por exploración, junto a una serie de alteraciones del líquido cefalorraquídeo de -

mayor a menor importancia. El mecanismo de la neurobrucelosis no se conoce con certeza y hay multitud de teorías que intentan explicarlo, como son la posibilidad de una invasión meningea por *Brucella*, o un mecanismo inmuno-alérgico o bien una invasión por continuidad a partir de focos óseos de la columna. (89)

e.) Miocarditis brucelar.- Es una presentación poco frecuente de brucelosis, no obstante se presentan ocasionalmente localizaciones viscerales con manifestaciones clínicas poco frecuentes como: manifestaciones respiratorias, manifestaciones renales y localizaciones cardíacas especialmente y de mayor gravedad la endocarditis, aunque se puede igualmente localizar en miocardio, originando una miocarditis brucelar, si bien su incidencia es muy poco frecuente. Es evidente que la propia patogenia del germen es capaz de dar una explicación satisfactoria a esta posible localización, bien del propio germen o de las toxinas por él liberadas a nivel de miocardio. Así, *Brucella* penetra en el organismo y realiza una primera etapa, localizándose en los ganglios linfáticos para más tarde pasar a la sangre, dando lugar a una fase septicémica aguda de duración e intensidad variables.

Sobreviene más tarde un proceso de localización en tejidos u órganos determinados, pero con una mayor afinidad por el sistema retículo endotelial. En la miocarditis brucelar se pueden presentar complicaciones como infartos trombóticos cerebrales. (45)

f.) Exploraciones analíticas.- Los datos hemáticos pueden proporcionar una orientación diagnóstica, siendo los más constantes, la anemia generalmente normocroma, la leucopenia con linfocitosis o linfomonocitosis y el dato serológico de aglutinación positiva a título mayor del 1/100.

g.) Otros síntomas.- Astenia, anorexia, adelgazamiento, etc., considerando los signos y los síntomas, tres puntos deben ser tomados en cuenta:

- 1.) El carácter crónico de una infección por *Brucella*
- 2.) La tendencia de localización con preferencia para tejido osteoarticular
- 3.) El papel de la hipersensibilidad y complicaciones neurológicas. (87)

La localización intracelular y la multiplicación del bacilo, evitan una suficiente inmunidad humoral, lo que explica la cronicidad de la brucelosis. Como excepción se pueden encontrar bacterias extracelularmente como por ejemplo en infecciones fulminantes o en el centro de microabcesos. Igualmente en una etapa de bacteremia, los microorganismos están situados dentro de los polimorfonucleares. *Brucella* muestra una preferencia por el sistema reticulo endotelial (RES), donde la multiplicación ocurre dentro de los macrófagos. Los monocitos de animales inmunes inhiben el crecimiento intracelular y su multiplicación. La posición intracelular dentro de micro y macrófagos protegen al bacilo de la acción de bac

tericidas, complemento, anticuerpos y antibióticos.

Los macrófagos circulantes, favorecen la diseminación de los microorganismos a órganos distantes por la presencia de bacilos fagocitados que contribuyen a la hipersensibilidad como un factor de patogénesis. Otro aspecto de la cronicidad de la infección, es la formación de granulomas en el RES. de acuerdo a observaciones hechas por Braun (1956) en ratones, el número de bacterias decrece considerablemente con la formación de un granuloma, este fenómeno por lo tanto, está considerado como una manifestación de la resistencia del huésped. El granuloma sólido, sin necrosis central, refleja una buena defensa a especies poco virulentas de *Brucella*, pero la formación de abscesos indica una débil resistencia para una invasión virulenta.

Las características septicémicas (fiebre, malestar, sudoración, debilidad, dolor de cabeza), pueden ser muy pronunciadas en el ataque inicial de la enfermedad, pero baja su intensidad después de unas pocas semanas cuando los microorganismos son confinados dentro de los órganos de su preferencia, en los animales estos son placenta, útero, testículos y todos aquellos que contienen un alto porcentaje de eritritol. La preferencia de *Brucella* en humanos por tejido osteoarticular no está bien entendido, las articulaciones sujetas al peso, desgaste y desgarradura, son especialmente afectadas (espinal y cadera). Durante el tratamiento con antibióticos, la migración del dolor en las articulaciones ocurre frecuentemen

te en combinación con una elevación de temperatura, este fenómeno está explicado por hipersensibilidad al antígeno liberado bajo influencia de la terapia o mecanismos inmunitarios. Las anomalías serias de las articulaciones, se reflejan en investigaciones de Rayos X en un gran número de pacientes, en los que no se puede explicar el porqué de estas anomalías, más que sobre bases de hipersensibilidad.

El hígado y bazo son frecuentemente lugares de localización para *Brucella*. Una hepatitis está combinada con anomalías en pruebas funcionales hepáticas y con sintomatología del padecimiento sugiere una localización de la infección en hígado. Esto ha podido ser probado, ya que dependiendo de la virulencia del bacilo invasor, por la formación de fibroblastos y una considerable necrosis, se puede provocar una cirrosis. Se ha observado la formación de un solo absceso de naturaleza crónica en hígado y bazo. Otros lugares de preferencia para la localización de la enfermedad son: tejido nervioso, riñón, corazón y pulmón.

Spink (1956), ha enfatizado el papel que la hipersensibilidad juega en complicaciones neuropsiquiátricas, las cuales ocurren frecuentemente en una etapa tardía de la infección. Cuando la hipersensibilidad tiene un papel dominante en la sintomatología, debe tomarse como un aviso para prescribir un corto tratamiento de corticoesteroides o para desensibilizar al paciente con dosis incrementadas de antígeno.

En este proceso se produce un cierto grado de inmunidad con limitación de los efectos laterales de una alergia celular.

En la fiebre de Bang (brucelosis en humanos provocada-- por Brucella abortus), existe una buena respuesta del RES, - que asociado al menor poder patógeno del germen va a determinar cuadros clínicos más benignos de los que se presentan en la brucelosis por Brucella melitensis o Brucella suis. Igualmente, el menor organotropismo del bacilo va a condicionar - que no aparezcan las complicaciones graves de las otras formas. Estas circunstancias de benignidad, son también compartidas por la enfermedad causada por Brucella canis.

La terapéutica de la enfermedad de Bang no presenta -- las dificultades planteadas por la fiebre de Malta, estas dificultades vienen dadas por la persistencia de microorganismos vivos y su capacidad de reproducción en el medio intracelular. (60)

La brucelosis humana causada por Brucella canis, no difiere mucho en sintomatología con respecto a las otras brucelosis, fiebre, malestar, escalofríos y pesadez; son síntomas que se presentan en pacientes infectados, además de sudor, - debilidad y pérdida de peso y, en casos especiales, también se puede mencionar dolor de cabeza.

Las pruebas de aglutinación para Brucella, que utilizan normalmente antígeno de Brucella abortus, han sido negativas

para todas las personas con infección provocada por Brucella canis.

Las formas posibles de transmisión canina-humana incluyen la exposición a tejidos infectados (tal como un aborto), contacto con orina, contacto directo o un vector de transmisión. Ninguna de estas rutas pueden ser definitivamente establecidas en los casos humanos conocidos.

Es necesario hacer nuevos estudios para definir el mecanismo de contagio de la infección por Brucella canis de perro a hombre, y para establecer formas de control de la expansión de la infección entre la población canina. Así, una infección subclínica o latente, ocurre frecuentemente en individuos, en quienes su ocupación requiere un contacto con animales infectados. El contacto repetido con el agente infeccioso eleva los niveles de anticuerpos séricos para dar un título diagnóstico. Los pacientes con brucelosis crónica, comúnmente tienen una larga historia que menciona los síntomas ya descritos además de depresión recurrente, inercia, impotencia sexual e insomnio. Este estado de la enfermedad usualmente no septicémica y puede persistir por años y aunque no hay explicación para esta compleja enfermedad, fenómenos de hipersensibilidad están implicados. (57)

. Métodos de identificación.- Es importante establecer el diagnóstico de la enfermedad con el aislamiento e identificación del germen, y el hemocultivo es el medio más accesible

ble. Esto se recomienda durante la fase aguda, si bien, dado que la septicemia en la brucelosis, puede ser persistente incluso en las formas crónicas o afebriles, se debe intentar aislar el germen, especificando la sospecha al laboratorio de bacteriología para prolongar suficientemente el tiempo de cultivo y utilizar los medios adecuados.

Actualmente se usa el medio de Ruiz Castañeda que presenta la ventaja de reducir las manipulaciones así como las contaminaciones y posibles contagios personales por ser un medio que consta de una fase sólida y una fase líquida. Cuando la capa de agar presenta colonias a las 24-48 horas después de la inoculación, es probable que el cultivo se haya contaminado. Cuando las colonias aparecen a las 76 horas de la inoculación, el microorganismo que desarrolla puede ser Salmonella, menos frecuentemente Estafilococo y Estreptococo pero probablemente se trate de Brucella.

Los cultivos positivos para Brucella generalmente se determinan al tercer día después de la inoculación del agar. A los 20-30 días los cultivos negativos se pueden desechar. El citrato de sodio que se agrega evita no solamente la coagulación, sino que también reduce al mínimo la actividad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares.

Si el cultivo da resultado positivo para Brucella, se procede a hacer la identificación final de acuerdo a las pruebas descritas anteriormente (colorantes, bioquímicas y serología). (58)

. SEROLOGIA

En ausencia de cultivos positivos, la prueba más segura e indicadora de una enfermedad por *Brucella*, es la de aglutinación. Esto es realmente cierto en casos de brucelosis aguda, en la cual se encuentra en un gran número de casos un título alto de aglutininas en suero, encontrándose un incremento progresivo en este título cuando se realizan pruebas repetidas en pacientes sospechosos de una brucelosis aguda. Estas aglutininas pueden aparecer ocasionalmente al quinto día de la enfermedad, pero ordinariamente no se encuentran sino hasta la segunda semana; algunas veces, las aglutininas específicas no aparecen en varias semanas. Esto es un factor muy importante, ya que estas aglutininas pueden estar presentes pero con un título bajo en personas que han tenido cultivos positivos para *Brucella*. La reacción de aglutinación también puede mantenerse con títulos altos por meses o años.

De esta manera, ciertas personas expuestas continuamente a *Brucella*, como un veterinario por su contacto ocupacional, pueden revelar aglutininas sin ninguna enfermedad aparente; por lo tanto, el nivel del título de aglutininas séricas puede fluctuar en pruebas repetidas. Una persona que haya sufrido otra enfermedad que no sea brucelosis, puede tener una reacción positiva de aglutininas como resultado de una previa sintomatología o enfermedad asintomática por *Brucella* (anamnesia).

En casos de brucelosis crónica, es más difícil la interpretación de las pruebas de aglutinación, ya que muchos pacientes con esta forma dan repetidamente reacciones de aglutinación negativas o pruebas positivas con títulos bajos. - (91)

Cuando el suero problema contiene un exceso de anticuerpos (aglutininas) en el tubo donde está concentrado, con frecuencia se inhibe la aglutinación (fenómeno de prozona), pudiendo dar la impresión errónea de que no existen anticuerpos homólogos, esto se ha atribuido a una propiedad bloqueadora del suero fresco. Para evitar este fenómeno, siempre deberán hacerse diluciones del suero. Los resultados de estas pruebas pueden también verse afectados por las reacciones cruzadas, vacunaciones previas, respuestas anamnésicas, terapia con antibióticos, otros padecimientos, fenómenos de zona, autoaglutinaciones, etc.

Algunos antígenos se encuentran en más de una cepa de gérmenes, por lo que sus anticuerpos correspondientes pueden reaccionar con ellos para producir reacciones cruzadas. Esto se observa, por ejemplo, con Salmonella y Brucella, bacterias totalmente diferentes que, sin embargo, comparten o tienen en común uno o más antígenos. (16)

De esta manera se ha valorado la eficacia relativa de varias pruebas serológicas por comparación de sus resultados con aquellos obtenidos por la prueba de aglutinación estándar en tubo. Algunas técnicas serológicas refinadas se han -

descrito recientemente y parecen tener mayor sensibilidad y especificidad que la mencionada anteriormente. Estas incluyen inmunodifusión (73), contra~~in~~munoelectroforesis, ensayo-inmunoabsorbente de enzimas marcadas "ELISA" (22), y radioinmunoensayo (83). Estas pruebas serológicas no han sido adecuadamente valoradas para permitir su adaptabilidad a los laboratorios clínicos.

No hay una prueba serológica estándar designada para brucelosis humana provocada por Brucella canis, pero el antígeno usado para la prueba de aglutinación que se ha empleado para detección de anticuerpos en perros, se ha usado también con suero humano. (91)

. REACCION DE HUDDLESON

De las pruebas de aglutinación, ésta da resultados significativos cuando existe una infección activa. Cuando los resultados son sospechosos o negativos se repite la prueba antes de decidir que no se trata de Brucelosis. Esta prueba se puede efectuar según el método lento en tubo o bien el rápido en placa, siendo éste último el más utilizado.

La placa que se utiliza para la reacción está dividida en cuadros iguales en dimensiones y se colocan 0.08 cc de suero sanguíneo en el primer cuadro, 0.04 cc en el segundo, 0.02 cc en el tercero, 0.01 cc en el cuarto y 0.005 en el quinto cuadro. Se agita el frasco vial del antígeno fuertemente y se añade una gota de éste a cada cantidad de suero te -

niendo además, control es positivos y negativos, para reali - zarse al mismo tiempo durante la prueba. Después de haber - mezclado el suero y el antígeno, se examina a cada una de - las divisiones para observar la aglutinación, preferentemen - te sobre una fuente de luz.

Cuando un resultado es negativo no hay cambio en la mez - cla de suero y antígeno. Una traza de floculación en la can - tidad de 0.08 cc, con no floculación en las otras cantidades, debe ser descartada y el espécimen se reporta como negativo. Una reacción positiva es reportada si hay floculación en una cantidad de suero menor de 0.08 cc. Una aglutinación comple - ta con suero humano a un título de 1:80 se ha considerado ya como diagnóstica de brucelosis. (41)

. PRUEBA ESTANDAR EN TUBO

Es más complicada en su realización lo que implica un - tiempo mayor para obtener los resultados, ya que ésta inclu - ye la preparación de las diluciones del suero. Cuando están - listas, a cada tubo de suero se agregan 0.5 cc de la suspen - sión diluida del antígeno y se mezclan bien, agitando vigor - samente durante 10 segundos, y se incuban por 48 horas en ba - ño de agua a 37°C.

La reacción positiva se aprecia por la precipitación - completa de las bacterias en forma de grumos, quedando total - mente limpio el líquido sobrenadante. La reacción negativa - muestra una turbiedad uniforme, nebulosa, similar a la del -

tubo testigo.

En la reacción con antígeno para Brucella, los títulos de 1:80 son ya muy sospechosos y pueden tener significado clínico. (16)

. PRUEBA DE FIJACION EN SUPERFICIE

La fijación en superficie es una reacción ideada por Ruiz Castañeda y se aplica hoy, tanto en medicina humana como veterinaria. Es una técnica muy sencilla y puede ser empleada en la investigación de brucelas por su especificidad o como prueba complementaria.

La prueba es el resultado de una reacción antígeno-anticuerpo que requiere solamente una mínima cantidad de anticuerpos. Se ha observado que en algunos casos clínicos con cultivos positivos de sangre, la presencia de anticuerpos no puede ser demostrada por la prueba de aglutinación, mientras que la prueba de fijación en superficie, da resultados positivos en minutos.

Se basa en un procedimiento cromatográfico sobre papel. En una hoja de papel filtro se coloca el antígeno en pequeños círculos y el depositar sobre estos unas gotas del suero en estudio, se forma, en el caso de tener anticuerpos dicho suero, una unión entre antígeno y los anticuerpos presentes en él, que no es posible eliminar mediante el lavado con solución fisiológica; en cambio, cuando el suero del enfermo carece de anticuerpos al colocar el papel en solución salina

se nota en éste un arrastre de la mancha hacia la parte superior del mismo.

La prueba se realiza, cuando se investiga solo un suero, cortando el papel que contiene tres manchas; una para un suero negativo; otra para uno positivo y la tercera para el suero problema.

El suero es colocado sumergiendo un asa de 3 mm de diámetro en el mismo y luego es depositada encima de la mancha -- del antígeno haciendo suaves movimientos circulares; el papel es suspendido mediante un soporte en un recipiente conteniendo solución salina isotónica, teniendo cuidado al sumergir el papel, que las manchas queden más o menos a 1 cm de la superficie del líquido. Por capilaridad la solución salina ascienda hacia la parte superior del papel, demorando en ello entre 15 y 20 minutos.

Cuando se presenta una reacción positiva, es cuando la mancha queda fija en el papel, es decir que no hay arrastre de la tinta hacia la parte superior; en cambio, en las reacciones negativas se observa un arrastre que llega hasta el límite superior del papel. Entre una reacción francamente positiva donde la mancha queda fija, y una reacción negativa, puede haber distintos trazados que se interpretan en comparación con sueros testigos y que pueden graduarse en intensidad de 0 a +++, o bien de 0 a 100% de positividad. (85)

. PRUEBA DE LA BRUCELERGINA

Esta prueba intradérmica se usa para determinar hipersensibilidad para un antígeno específico de *Brucella*. Una reacción positiva alérgica en piel, se acepta generalmente como evidencia de una invasión, pasada o presente, por este microorganismo.

Pacientes en los cuales se había aislado *Brucella* en hemocultivo mostraron una prueba cutánea positiva, aunque también ocasionalmente, la prueba había sido negativa aún cuando la enfermedad por *Brucella* había sido detectada por cultivo.

Las principales fuentes de error en la interpretación del significado de una prueba cutánea, serían en primer lugar, que la prueba es frecuentemente positiva en individuos expuestos, que no tenían historia de una enfermedad compatible con brucelosis y en segundo lugar, que la hipersensibilidad usualmente persiste por muchos años.

Un gran número de antígenos han sido usados para esta prueba cutánea. Los más comúnmente empleados son: 1.) Una suspensión de *Brucella sp* en solución salina fisiológica calentada para inactivarlas y 2.) Una suspensión de nucleoproteínas aisladas de *Brucella sp* por separación química, conocida como brucelergina.

Cuando se va a realizar, se debe diluir la vacuna (la cual se vende comercialmente) en proporción de una parte de vacuna por nueve de solución fisiológica de cloruro de sodio

esterilizada, de esta dilución se inyecta 0.1 cc intradérmicamente en la superficie ventral del antebrazo.

Cuando da como resultado una reacción positiva, se caracteriza por la formación de una circunferencia eritematosa, edematosa, dura, en el sitio de la inyección. En esta prueba, el área de la reacción local, tiene un promedio de 3/4 de pulgada de diámetro pero puede variar de media a 3 o más pulgadas. La reacción es más intensa en 24-48 horas. Los mejores resultados se consiguen observando 48 horas después de la inyección. La presencia de un eritema transitorio, sin edema y sin dureza no es significativa. En casos francamente positivos, la dureza permanece varios días; en personas hipersensibles, una prueba positiva puede ser acompañada desde un ligero calor, hasta una reacción sistémica severa, en tales casos, los canales linfáticos sobre el sitio de la inoculación pueden estar rojos, endurecidos y adoloridos.

Una exacerbación de síntomas puede caer en el descubrimiento de una prueba cutánea positiva. Una necrosis focal del tipo de Arthus ocurre en el sitio de la inoculación en algunos casos. La aplicación de esta prueba intradérmica estimula la producción de anticuerpos y puede indicar un contacto previo con el microorganismo, dependiendo de la capacidad de reacción de inmunidad celular del paciente. (41)

. PRUEBA OPSONOCITOFAGICA

La acometividad que muestran los leucocitos frente a -

las bacterias, dirigiéndose a ellas y englobándolas en su citoplasma, es un fenómeno cuya actividad está determinada por ciertos elementos existentes en el suero sanguíneo llamados opsoninas. Las opsoninas existen en el suero normal y en mayor cantidad en el suero de individuos tratados por vacunaciones o en aquellos afectados por una infección, estos son los factores inherentes al suero que intensifican la fagocitosis, la cual se ha conservado a través de la evolución desde los seres unicelulares hasta las células de los organismos superiores. Se ha señalado que ciertas células de la sangre, ingieren y desintegran partículas extrañas; este fenómeno es llamado fagocitosis, y representa un mecanismo de purificación de la sangre.

Así, durante el curso de la infección, el valor opsónico en un paciente puede ser útil para mostrar, en un momento dado, la situación en que se encuentran las defensas del individuo contra ésta. En el primer período de la infección cuando el suero del enfermo aún no ha elaborado anticuerpos, las toxinas bacterianas circulando libremente paralizan la acción fagocitaria de los leucocitos al mismo tiempo que inhiben su formación, dando paso así a la invasión bacteriana. (17).

Huddleson, Johnson y Hamann reintrodujeron una reacción opsonocitofágica, como una modificación de la técnica Leighman-Veitch (41), para determinación de la actividad fagocítica de la sangre en presencia de opsoninas séricas y leucocitos homólogos. Esta prueba se emplea en conjunto con la prue

ba cutánea, o a la prueba de aglutinación, o ambas, para determinar el estado inmune de un individuo, dando pruebas positivas para cada uno o para ambos métodos.

Para realizar la prueba se mezcla 0.1 cc de sangre citrada de un paciente, con 0.1 cc de una suspensión salina de Brucella la cual ha sido cultivada por 48 horas sobre un medio de infusión de agar hígado. La suspensión debe contener al final seis billones de microorganismos por cc en solución salina fisiológica, a un pH de 7.0, incubar la mezcla a 37°C durante 30 minutos, después de los cuales se deben remover las células sedimentadas con una pipeta capilar.

Se realiza un frotis con una gota grande de la suspensión celular, se lava rápidamente y posteriormente se tiñe con un buen colorante para sangre.

Huddleson, después de realizar la prueba, menciona lo siguiente: el poder opsonocitofágico de la sangre es bajo durante la fase infecciosa activa de la enfermedad y más franca después de la recuperación, de esta manera algunos individuos han revelado inmunidad para Brucella. Si 60% o más de los neutrófilos segmentados, muestran fagocitosis, la prueba es positiva. Si es el 40% de los neutrófilos, la prueba es positiva débil o sea que el paciente puede estar infectado y no revelar todavía inmunidad. Menos del 20% o la ausencia de fagocitosis indica negatividad. Al resultado de esta prueba se le conoce como Índice Opsónico. (41)

. PRUEBA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO

Esta se emplea para determinar la presencia y título de anticuerpos fijadores del complemento, en este caso, de anticuerpos en contra de Brucella. La prueba consta de dos sistemas antígeno-anticuerpo que requieren del complemento para su realización.

El primero de estos está formado por suero problema y antígeno brucelósico. El segundo, por eritrocitos de carnero y suero hemolítico anticarnero.

Se hace reaccionar el primer sistema añadiendo a los componentes complemento medido y controlado. En caso de ocurrir una reacción antígeno-anticuerpo-complemento, ésta no será visible por lo cual es necesario, después de un tiempo razonable y condiciones adecuadas, agregar el segundo sistema (eritrocitos-suero hemolítico). Si el complemento ha sido utilizado por el primer sistema, el segundo ya no se completaría, por lo tanto no se presentará hemólisis; en caso contrario (ausencia de anticuerpos antibrucela), el complemento no es utilizado en el primer sistema y se aplicará a reaccionar con el segundo. Por lo tanto la presencia de hemólisis, hará que este último sistema haga las veces de un indicador de la primera reacción. Esto, es indudablemente un método ingenioso de detectar la reacción antígeno-anticuerpo.

Cuando se realiza la prueba, para el primer sistema se prepara suero fresco de cuy como fuente del complemento y se

hace con éste una serie de diluciones. Cada una se mezcla con una suspensión normalizada de eritrocitos sensibilizados y se incuba durante 30 minutos a 37°C, con el objeto de determinar en qué dilución ocurre la hemólisis del 50% de los eritrocitos; o sea la dilución con el título CH50.

Se extrae sangre del paciente sometido al estudio y se deja que coagule para separar el suero. Se calienta a 56°C durante 30 minutos para inactivar su complemento y se mezcla con una cantidad fija de antígeno estandarizado. Después se agrega al tubo un volumen igual del suero titulado de Cuy, para que el contenido represente una dilución 1:2 de este suero. Se incuba el tubo de ensayo agitándolo a 37°C durante 30 minutos para que pueda ocurrir la fijación del complemento. Una vez pasado este tiempo, se saca el tubo de la incubadora y se hace con su contenido una serie de diluciones, en nuevos tubos de ensayo, se mezcla cada dilución con una preparación estandarizada de los eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisina, volviendo a incubarse a 37°C durante 30 minutos.

Cuando la prueba resulta positiva, es decir, cuando se ha fijado el complemento, el título CH50 disminuye, por ejemplo, en una prueba positiva típica donde el título CH50 original fue de 1:1024, después de la incubación del sistema podría ser 1:32. En una prueba con resultado negativo, dicho título CH50 debe mantenerse aproximadamente en 1:1024 (57)

Cuando la prueba se lleva a cabo con el sistema de mi -

crofitulo, ésta se realiza en una placa con 5 horadaciones en las que se colocan diluciones de suero que van de 1:2.5 a -- 1:40. La prueba comprende un volumen (0.025 ml) de dilución de suero en amortiguador de veronal, un volumen de antígeno, 2 volúmenes de complemento y un volumen de células sensibilizadas de oveja. Anteriormente a la prueba, todo el suero se diluye a 1:2.5 e inactiva a 62.5°C durante 30 minutos. La fijación y la prueba final se incuban a 37°C durante 60 minutos y treinta minutos respectivamente. También se incluyen el anticomplementario usual, controles positivos y controles negativos.

Una gota del antígeno es mezclada sobre una placa de vidrio con una cantidad igual de suero no diluido a temperatura ambiente. Los resultados se leen después de 5 minutos con un blanco. (20)

Clásicamente los métodos inmunológicos usados en diagnóstico tienen la ventaja de detectar anticuerpos que aunque altamente específicos, no pueden detectarse sino hasta diez días después de haberse iniciado la enfermedad. Igualmente se presentan problemas de interpretación por la presencia de anticuerpos después de que la infección ha pasado. Otras desventajas se encuentran con el uso de pruebas para detectar inmunidad celular. Los métodos basados en la identificación inmunológica de los antígenos microbianos, tienen ventajas potenciales en velocidad y especificidad; en -

la práctica, la mejor aplicación de tales métodos, son las técnicas que usan anticuerpos fluorescentes para la identificación de bacterias o virus en secreciones y tejidos.

El radioinmunoensayo convencional, emplea antígenos -- marcados radioactivamente y requiere un conocimiento previo de la naturaleza química de la sustancia a ser detectada y es más satisfactorio para sustancias homogéneas de una especie molecular simple. De tal manera, muchos antígenos bacterianos son mezclas complejas de sustancias con diferentes propiedades químicas y es una tarea formidable el preparar a partir de ellas material marcado radioactivamente para -- usarlo en un ensayo de competición. Si se usa un método satisfactorio para marcar los productos de una bacteria, no tiene que ser necesariamente aplicable a otra. Una ventaja -- más, es que las manipulaciones radioquímicas son hechas sobre inmunoglobulinas fácilmente caracterizadas y purificadas.

La brucelosis es actualmente una enfermedad cuyo diagnóstico se puede obtener por métodos perfeccionados que pueden ser de gran valor, la detección de antígenos bacterianos en muestras de sangre, se complica por la presencia de anticuerpos séricos y se han investigado los efectos de esto sobre el ensayo, dando una perspectiva para el desarrollo -- eventual de una prueba de diagnóstico en la cual puedan ser evitados efectos inhibitorios de anticuerpos.

Para una aplicación práctica del ensayo en el diagnós-

tico de brucelosis, es necesario para evitar el efecto inhibitorio de anticuerpos naturales, se obtenga una muestra de suero durante una etapa precoz de la enfermedad o sea antes de que se descubra la respuesta de anticuerpos, o cuando el antígeno está presente en exceso, se encuentre material antigénico de Brucella que existe en circunstancias normales. (103)

Además de las pruebas serológicas refinadas, como las antes mencionadas, existen otras que también se usan para el diagnóstico de la brucelosis. Un ejemplo es la prueba del Rosa de Bengala en placa (RBPT) que puede ser considerada altamente segura y es especialmente útil en áreas donde no están disponibles las facilidades de servicios de laboratorio aunque puede ser usada también como una prueba segura en áreas con facilidades de laboratorio.

La RBPT es una variación de la prueba de aglutinación rápida en la cual el antígeno se marca y concentra para incrementar su sensibilidad. Para inhibir la actividad de aglutininas no específicas, se acidifica el antígeno.

La aplicación de la RBPT en medicina humana necesitó de una amplia investigación. Algunos investigadores encontraron una estrecha relación entre los resultados de RBPT y CFT (Prueba de fijación de complemento), sobre suero humano. Además, la prueba se considera como un método muy eficiente para el diagnóstico tanto de una enfermedad aguda por Brucella, como para casos crónicos.

Al valor de los títulos de CFT se le da mayor atención, ya que la actividad de la enfermedad se refiere al aumento en los anticuerpos de fijación de complemento, aunque es restringido por la frecuente ocurrencia de actividad anticomplementaria en sangre humana. Ambas, la RBPT y la CFT, detectan anticuerpos IgG y por esa razón se correlacionan bien. Los resultados de la RBPT son acordes a los títulos encontrados en la prueba de aglutinación en placa. (20)

Valor diagnóstico de la inmunofluorescencia indirecta en Brucelosis.- Aunque los anticuerpos específicos de la clase IgG aparecen precozmente en formas agudas de brucelosis, por su mayor producción y sobrevivencia, se encuentran elevados más constantemente y a títulos más altos, en las formas de brucelosis de evolución crónica. En éstas, la inmunofluorescencia da valores más llamativos con los conjugados anti IgG y estándar, alcanzando para ambos, casi constantemente, cifras altamente expresivas.

Todos los anticuerpos específicos originados con motivo de la enfermedad son aptos para la reacción de inmunofluorescencia, evitando por consiguiente, el aspecto cualitativo de las reacciones restantes y la especificidad de respuesta particular de cada sujeto. Precisamente amparados en dicha especificidad, se ha llegado a precisar, que cualquier título de inmunofluorescencia brucelósica podría tener valor diagnóstico.

Es sugestivo pensar que los anticuerpos específicos de

tectables por inmunofluorescencia, sean de aparición tardía - en relación con los anticuerpos aglutinantes. Muy posiblemente sean, dentro de los anticuerpos específicos inmunofluorescentes los de las clases IgA e IgM, los primeros en pasar al suero, haciéndolo posteriormente los IgG, que serán, en último extremo, los que dominarán en concentración y persistencia. (98)

Hoy en día es generalmente aceptado que en brucelosis crónica, la mayor proporción de anticuerpos es IgG, pero poco se conoce el nivel de anticuerpos IgA en cada una de las enfermedades crónicas o agudas. Vaerman (1970), fraccionó un suero procedente con brucelosis (presumiblemente aguda), con el objeto de estudiar la fijación de complemento de IgG, IgM e IgA. Mientras que se obtenía la fijación de complemento con las fracciones IgG e IgM, pero no con la fracción IgA, todas mostraron aglutinación, indicando anticuerpos aglutinantes en las tres clases, resultando alto el título de aglutinación con la fracción IgG, y los anticuerpos IgG en general tienen una muy baja capacidad aglutinante lo cual sugiere que IgG era la clase de anticuerpos dominante.

La interpretación y validez de los resultados de todas las reacciones inmunológicas, dependen de la seguridad de los reactivos antiglobulina, la especificidad considerada y una caracterización más estricta. (103)

CAPITULO V

PREVENCION Y TRATAMIENTO

El control y/o erradicación de esta zoonosis, se basa en tener un amplio conocimiento de la epidemiología tomándose en cuenta las condiciones prevalentes en el país, las costumbres, las prácticas utilizadas en el manejo de la ganadería y las especies de animales presentes. Estos elementos influyen en el mantenimiento y la transmisión de la brucelosis.

En la prevención y control de una enfermedad infecciosa-comunicable como la brucelosis, las siguientes consideraciones son de gran importancia:

- . Conocimiento exacto de ocurrencia e incidencia de la enfermedad entre humanos y animales huéspedes.
- . Diagnóstico temprano de casos agudos.
- . Cuidadoso control de condiciones de trabajo de empleados en contacto con animales de granjas.

Algunas medidas de control que son practicables ahora, incluyen:

- . Higiene del campesino (granjero)
- . Limitación y control del reservorio de la infección.
- . Control del método de transmisión (no ingestión de leche cruda).
- . Especialmente vacunación de individuos expuestos-
- . Ensayos para incrementar la resistencia de la población.

El problema de la brucelosis es primeramente veterinario, si el animal reservorio de la enfermedad puede ser eliminado, la infección humana automáticamente cesa. Por lo tanto la -- aproximación teórica y control de la enfermedad es simple. El animal reservorio infectado puede ser detectado y removido de sus rebaños, la leche debe ser pasteurizada antes de ser inge- rida, la carne tiene que ser sujeta a un tratamiento adecuado por calentamiento, además el ganado como ovejas, cabras, cer- dos y aún el hombre, pueden ser inmunizados empezando la in- fección.

Ya en la práctica, no es tan simple. La eliminación de - reservorios extrahumanos presenta formidables problemas.

Leche y productos lácteos.- Los microorganismos del géne- ro *Brucella* son destruidos por una combinación tiempo-tempe- ratura igual a la que se requiere para *Mycobacterium tubercu- losis* o *Mycobacterium bovis*. Por esto, donde la leche no pue- de ser bipasteurizada, es suficiente con elevar la temperatu- ra de la leche hasta llegar a su punto de ebullición y des - pués enfriarla inmediatamente. La crema de la leche infectada es usualmente más fácil de contaminarse que el resto de la - misma, por que los glóbulos grasos que se forman, llevan en su superficie a los bacilos. Se puede usar una combinación -- tiempo-temperatura para la pasteurización de crema derivada-- de leche no pasteurizada.

Carné y sus productos.- La transmisión de brucelosis por carne y sus productos puede ser prevenida si se sujeta a es -

tos un adecuado tratamiento por calentamiento. Estos tratamientos, no tienen efecto sobre brucelosis humana si el hombre esta en contacto con animales infectados.

Inmunización.- La vacunación de los animales ha sido probada afortunadamente para la prevención de la extensión de brucelosis en rebaños y es practicada ampliamente en medicina veterinaria. Como quiera que sea, la erradicación de la enfermedad separando a los animales infectados de sus rebaños, es una solución completamente satisfactoria.

La vacunación humana tiene desventajas, ya que puede producir severas reacciones adversas en algunos individuos que provocan hipersensibilidad frente a un contacto futuro con antígeno de *Brucella*. También se producen anticuerpos persistentes, los cuales dificultan la tarea de distinguir anticuerpos persistentes, los cuales dificultan la tarea de distinguir anticuerpos procedentes de una postinfección. Por lo tanto, la vacunación humana es una medida de protección temporal cuando empieza la infección, sobre todo donde hay un gran peligro de brucelosis ocupacional; por ejemplo, para dueños y manipuladores de ovejas y cabras, para trabajadores de la industria de la carne y para trabajadores de laboratorios y veterinarios.

Se considera la vacunación del hombre como un suplemento, básicamente deberá existir una estricta aplicación de medidas de higiene y sanidad. Las primeras vacunas y las posteriores, pueden ser dadas solamente a aquellos grupos ocupacionales -- quienes estén altamente expuestos a la infección por *Brucella*

melitensis y solamente si la prueba intradérmica es negativa.

Con la introducción del antígeno dentro del cuerpo, ocurre una reacción anafiláctica, la cual se asemeja a un ataque agudo de brucelosis. Estos síntomas pueden ser suprimidos por corticoesteroides; cuando se introduce el antígeno, se presenta en la piel una infiltración de linfocitos no específicos, que dan lugar a la formación de linfocitos sensibilizados. Esta reacción es citotóxica para algunas células.

Por ser la prevención y erradicación de brucelosis, un problema que ofrece muchas dificultades para su realización, se han seguido haciendo investigaciones y estudios experimentales para obtener datos que guíen hacia un mejor método para el control de esta infección, además de conocer nuevos tipos de vacunas que ayuden a la prevención de la enfermedad. Una de las investigaciones realizadas es la siguiente:

- . Estimulación activa de fracciones de *Brucella* en una prueba de transformación de un linfocito humano.

"PI" es una fracción de extracto procedente de *Brucella melitensis* que ha sido usada por años para la vacunación de laboratoristas y agricultores, considerados como trabajadores de alto riesgo. Ahora ha sido usada "in vitro" junto con otro extracto fenolado y péptido-glicano conteniendo fracción 4A, en una prueba de transformación de linfocito. La correlación entre el índice de estimulación de anticuerpos humorales para *Brucella* y la respuesta cutánea para PI, ha sido estudiada en

sujetos vacunados con la fracción PI, en pacientes con bruce-
losis y en controles normales.

Se han extraído en años recientes numerosas fracciones -
de la pared celular de Brucella melitensis, varias de estas -
fracciones habían mostrado poseer propiedades protectoras e -
inmunogénicas y no producir reacciones alérgicas en puercos--
de Guinea y ratones. La inmunidad celular juega un papel im -
portante en la respuesta inmune para bacterias intracelulares
facultativas y la transformación de linfocitos, todo en rela-
ción con la hipersensibilidad retardada.

Esta es la primera descripción de una estimulación "in -
vitro" de linfocitos humanos para una fracción purificada ex-
traída de la pared celular de la bacteria. Además, el uso de
fracciones semejantes para las pruebas comparativas de pacien-
tes y sujetos vacunados, ha aclarado los siguientes puntos:

a.) Los péptido-glicanos se han comportado no mitogénica-
mente, hacia linfocitos humanos normales.

b.) PI, usada normalmente como un agente vacunante para
hombres y ratones, ha mostrado cómo estimula "in vitro", lin-
focitos humanos sensibilizados frente a una infección por Bru-
cella o por vacunación con PI. El índice de estimulación de -
pacientes brucelósicos, es como quiera que sea, altamente sig-
nificativo, a menos que estos sujetos vacunados estén en es -
trecho y repetido contacto con Brucella. Solamente estudios -
epidemiológicos darán conclusiones definitivas sobre la efi -
ciencia de la vacunación humana con PI. Sin embargo, las ob -

servaciones hechas en laboratoristas y trabajaderos que han sido vacunados, revelaron buena protección y que PI puede ser un buen factor para medirla.

c.) La fracción PI puede también ser usada en pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada frente a *Brucella* y ha mostrado una menor reacción alérgica y más resultados reproducibles que la melitina.

Por otro lado, no hay correlación entre la vacunación con PI y cuerpos humorales, la vacunación con fracción PI induce, pero baja y transitoriamente, respuesta de anticuerpos IGM en el hombre y la prueba altamente sensible de inmunofluorescencia, ha mostrado anticuerpos antibrucella no humorales en varios pacientes brucelósicos crónicos.

d.) La fracción PI purificada por tratamiento enzimático, no es un buen agente estimulante para sensibilizar linfocitos humanos "in vitro". Esto sugiere que una estructura más compleja que la fracción Pi juega un papel importante en la activación de linfocitos "in vitro" o que, durante la purificación de la fracción 4A (la cual incluye menos del 90% de material PI), se pierde en parte un componente responsable para la activación "in vitro" de linfocitos sensibilizados. Por otro lado, no se ha usado todavía en el hombre, la fracción 4A muestra inducción hacia una buena inmunidad frente a *Brucella* en ratones. Todo lo anterior lleva a pensar dos cosas: si hay o no protección por inmunización y activación de linfocitos sensibilizados, o que sean dos funciones separadas y lle-

vadas a cabo por dos diferentes constituyentes. (7)

La medicina moderna ha reducido la mortalidad, aun prima ria, a través del control de enfermedades infecciosas. Desafortunadamente se cree que las enfermedades infecciosas requieren relativamente pequeños esfuerzos para llevar a cabo una supresión o erradicación. Consecuentemente los investigadores habían enfocado en gran parte sus estudios e interés clínico, para degeneraciones cardiovasculares y enfermedades neoplásicas. El problema de erradicación de la brucelosis es un desafío a la economía ya que está implicada en la salud pública. La brucelosis es transmitida de animal a animal y de animal a hombre, pero rara vez de hombre a hombre. Para romper la cadena de transmisión, se exige una cooperación completa de campesinos, gobierno, veterinarios e investigadores.

La responsabilidad de los investigadores es relativamente simple y sencilla, deben reconocer la enfermedad cuando la encuentran y reportarla rápidamente a las autoridades de salud pública. Estas acciones ayudan a las autoridades en la identificación de las fuentes de infección que pasan inadvertidas.

Los campesinos pueden tener a la familia completa con la enfermedad en los más agudos aspectos y puede ser benéfico hacer un sacrificio substancial financiero, en ocasión, para eliminar el foco de infección. Aquí el gobierno puede actuar, pero no solamente por ejecución de leyes para disponer de rebaños infectados, sino también para montar algunas formas de

compensación financiera para estas demandas.

Los veterinarios pueden hacer inspecciones continuas e intensas de rebaños y la vacunación de éstos para prevenir la expansión de la enfermedad. Pueden hacer que aquéllos que compran ganado para añadir a sus rebaños e ignorar que el factor de la infección de Brucella puede ser asintomático y tener un período largo de incubación, antes de que las pruebas detecten su presencia, estén enterados y se abstengan de comprarlo, hasta que no se les haya realizado las pruebas necesarias que confirman que los animales están libres de brucelosis. (9)

. TRATAMIENTO

Conviene distinguir entre el tratamiento de las formas agudas o subagudas y el de la brucelosis crónica.

Tratamiento de las formas agudas y subagudas.- Dada la frecuencia de curaciones espontáneas, la eficacia de una terapéutica se juzgará atendiendo a los elementos siguientes:

- a.) Mejoría clínica en el espacio de una semana
- b.) Ausencia de Brucella en la sangre o en otros tejidos que ya dieron resultados positivos
- c.) Complicaciones menos frecuentes
- d.) Recaídas menos frecuentes
- e.) Disminución del título de los anticuerpos

Tratamiento general.- Durante las manifestaciones agudas de la enfermedad está indicado un tratamiento de apoyo, con reposo en cama y régimen alimentario adecuado. El hecho de

que muchos enfermos se restablezcan sin ningún tratamiento, debe tenerse en cuenta como se mencionó anteriormente, cuando se trata de considerar una nueva terapéutica.

Antibióticoterapia.- Algunos autores tienen la idea de que utilizando una sola droga, es más frecuente la recaída y el paso a la cronicidad de la enfermedad y recomiendan el tratamiento asociado, realizado en dos o más formas de duración variable, sobre todo en las formas crónicas, recaídas y reinfecciones.

Los pacientes que han llevado una larga evolución, sufriendo recaídas, o aparición de formas localizadas, han obtenido mejores resultados tras varios ciclos de tratamiento combinado.

Brucella puede tener susceptibilidad a las tetraciclinas o a la ampicilina. Puede ocurrir el alivio sintomático a los pocos días de haberse iniciado el tratamiento con estos medicamentos; sin embargo y debido a su localización intracelular, los bacilos no son erradicados con facilidad completamente del huésped. Para obtener los mejores resultados, el tratamiento debe ser prolongado.

Puede usarse el tratamiento combinado estreptomicina y una tetraciclina; primero la estreptomicina y después la tetraciclina (10 días cada droga). La oxitetraciclina insoluble se ha mostrado muy eficaz en las formas de localización ósea.

Más especies de Brucella son también sensibles a trimetoprim sulfametoxazol y esta droga ha dado resultados alentadores

en el tratamiento de brucelosis crónica y aguda. Todas las especies de *Brucella* son resistentes a las penicilinas y cefalosporinas.

Antigenoterapia específica.- Se recomienda en casos muy particulares, combinar la antibióticoterapia y la antigenoterapia. La inyección intravenosa del antígeno, al desencadenar una reacción febril, tiene, al parecer, un efecto favorable sobre los casos que presentan focos de infección dolorosos y evita las recaídas. No obstante, esta terapéutica lleva consigo graves riesgos y debe aplicarse con mucha precaución.

Corticoterapia.- Los corticoesteroides no son recomendables en la brucelosis leve, aunque su empleo está justificado en asociación con los antibióticos en ciertas condiciones, como por ejemplo, en el caso de brucelosis septicémica grave para impedir las reacciones tóxicas, y sin que su empleo dure más de algunos días. Pueden también utilizarse en ciertas formas viscerales de la enfermedad. (94)

CAPITULO VI

CONTROL Y ERRADICACION

La distribución geográfica de la brucelosis humana está estrechamente relacionada con la infección animal endémica, los métodos de la industrialización animal, los hábitos alimenticios humanos, la higiene y otras actividades socioeconómicas.

La brucelosis es de particular importancia sobre otras zoonosis, no solamente porque es de impacto directo sobre el hombre, sino por las pérdidas económicas y reducciones en alimentos de los cuales es responsable, ya que no se pueden utilizar la leche y los derivados si proceden de animales infectados; por todo lo anterior, los aspectos fundamentales de la enfermedad como problema mundial, son esencialmente dos: a) su importancia en la Salud Pública, y b) las pérdidas económicas de la producción animal causadas por las diferentes especies de *Brucella* que pueden infectarlos.

La importancia en Salud Pública, incluye no solamente la transmisión directa o indirecta a través de animales infectados al hombre, con sus respectivas consecuencias como la incapacidad física y pérdida del poder humano, sino también significa una seria disminución en ingestión de muchas proteínas animales que son necesarias para la salud humana. Esto es particularmente verdadero en países con desarrollo económico ba-

sado en la industria ganadera.

Un análisis económico muestra los costos que siguen como los principales en la enfermedad:

Costos directos o indirectos en la brucelosis en el individuo:

- . Honorarios médicos, hospitalización, enfermeras y medicamentos
- . Pérdida de ingresos y pérdidas de productividad, resultado de la ausencia al trabajo. (3)

Por estas razones es interesante hacer una revisión de - un programa para el control y erradicación de brucelosis en - varios países.

Las condiciones que prevalecen a través del mundo, varían mucho para que sea posible hacer un solo programa universal - para la erradicación y control de brucelosis. La erradicación completa de la brucelosis procedente de animales, podría ser el objetivo final de todos los países y esto es siempre enfocado hacia el ganado. Los siguientes, son ejemplos de diferentes sistemas de control de brucelosis y sus resultados con - las condiciones locales variantes.

En algunos países, especialmente los escandinavos, ha sido controlada. En 1938, se llevó a cabo una campaña para controlar la brucelosis bovina en Finlandia, donde la tasa inicial de infección fue de 3 a 4% en los rebaños, el programa - para control radical entonces iniciado, rindió resultados muy satisfactorios. En 1956, el aborto infeccioso fue completamente

te borrado, por lo tanto, la infección también disminuyó entre los trabajadores finlandeses y consecuentemente la brucelosis fue erradicada de la población. En Noruega, se tomaron medidas enérgicas a lo ancho del país desde 1934, con ayuda financiera procedente del gobierno.

En forma similar, la erradicación de la enfermedad ha sido lograda en Suecia. La gran extensión de la infección entre la densa población ganadera de Dinamarca, requirió una actividad muy grande, contando con el apoyo de la Cooperativa Lechera y el Estado, se pudo establecer una campaña colectiva, la tasa original de infección del 25% de los rebaños en 1944, había declinado a menos del 5% hacia 1957. En Zurich, el 15% de los rebaños fueron detectados con infección en 1951, y en 1957 el número fué solo del 1%. En Yugoslavia el porcentaje de vacas con pruebas positivas a *Brucella* fué de 4.1% en 1951 y en 1956 disminuyó a 1.0. En Rusia la tasa correspondiente fué estimada en un 8% en 1932, 3% en 1940, y 1.5% en 1953; la mortalidad humana ha estado declinando también, ya que se ha logrado la reducción de la infección por el uso de la vacuna Strain 19 en grupos expuestos ocupacionalmente.

En los Estados Unidos, el primer esfuerzo oficial organizado para combatir los abortos bovinos infecciosos fué en 1934, cuando se constituyó el programa de erradicación de brucelosis, del Estado Federal por Cooperativa, se logró una gran mejoría, cuando en 1941, la vacunación con Strain 19 fue añadida al programa. Desde 1947 se estableció una campaña uniforme en toda -

la nación, la cual era flexible para abarcar los diferentes rebaños bajo sus condiciones regionales. En las dos décadas siguientes, aproximadamente 127 millones de cabezas de ganado, habían sido analizadas con pruebas serológicas. El número de rebaños infectados disminuyó en este período, de 38% a 14.2%, y el porcentaje en animales se reportó con disminución del 10% a 2.6%. Entre 1941 y 1955, más de 21 millones de vacas fueron vacunadas y durante los siguientes tres años se alcanzaron los 20.9 millones.

En 1958, la tasa de infección entre los bovinos en los Estados Unidos había sido 1.6%, mientras que Puerto Rico había certificado estar completamente libre de brucelosis. La brucelosis en cerdos prevalece especialmente en el oeste de la Unión Americana, ya que se han presentado algunas dificultades en los esfuerzos para eliminarla, como por ejemplo: la carencia de pruebas de diagnóstico aceptables, los costos de las mismas existentes y el reporte incompleto de animales analizados en casos de matanza en las granjas.

La incidencia de brucelosis en el hombre, alcanzó su máximo en los Estados Unidos en 1947, con más de 6,000 casos reportados. El programa de erradicación por cooperativa y medidas de control asociadas, como la pasteurización de la leche, se ha manifestado en una reducción efectiva de casos humanos. En el presente, menos de 240 casos de brucelosis se reportan cada año, estos son principalmente trabajadores de empacadoras

de carne y otros expuestos ocupacionalmente a animales infectados y sus productos y que son debido principalmente al contacto con Brucella suis.

Los programas de vacunación pueden ser usados efectivamente en áreas con una muy alta prevalencia de brucelosis (como ocurre actualmente, en muchos países tropicales, que basan su desarrollo en esta industria), para reducir la infección hasta un punto donde los procedimientos basados en exámenes y pruebas, sean posibles con eliminación de reactores sin pérdidas económicas serias para los dueños de rebaños infectados. La vacunación está considerada como un paso importante enfocado hacia una erradicación total.

Las vacunas apropiadas, son también útiles para mantener medidas protectoras frente a la brucelosis en rebaños y áreas que están sujetas a exposición de fuentes de infección adyacentes.

A medida que las campañas de erradicación avancen y la incidencia de brucelosis esté reducida en una región dada, serán importantes para limitar la extensión de la infección que pueda ocurrir a través de movimientos normales, que ambas se logren dentro y entre los países que se ven afectados con esta enfermedad. Esto se puede conseguir por medio de la legislación; por ejemplo: ganado introducido dentro de rebaños libres de brucelosis, debe ser procedente de rebaños sanos de otras áreas o países. Todos los programas de control, deben incluir el mantenimiento de un alto nivel de sanidad en el medio am --

biente e higiene personal, tomando medidas adecuadas para reducir la intensidad de exposición.

Esto es de particular importancia en rebaños con cabras, ovejas y cerdos donde la erradicación puede ser difícil. El establecimiento de un registro de rebaños libres de brucelosis bajo constante supervisión y sujeto a pruebas periódicas, hace posible que tales rebaños puedan servir como una fuente de reposición para otros en los cuales, la erradicación esté siendo ensayada. (3)

Los intentos para eliminar la brucelosis bovina han sido fáciles en otros países como Noruega, que en 1952 archivó el programa de erradicación, seguido por Suiza en 1957, Finlandia en 1960, Checoslovaquia en 1964 y Rumania en 1969. Japón reportó ganado infectado por brucelosis como una ocurrencia excepcional en 1977, pero la enfermedad ha sido también erradicada. Todos estos países mantenían a sus rebaños sanos de la infección utilizando pruebas serológicas, cuarentena y otras precauciones en sus fronteras para prevenir la importación de animales infectados.

En otros países, la brucelosis bovina continúa existiendo con el consecuente resultado de infecciones humanas. Muchos Países tienen designados programas para que la incidencia de la enfermedad sea menor. Esto incluye a Canadá, donde la infección como en los Estados Unidos, está reducida pero existe y en México; donde hay una alta incidencia de brucelosis.

Alemania, Austria, Luxemburgo y Etiopía reportaron "ocurrencia excepcional", se sabe también que la enfermedad está reducida pero aún se puede encontrar en Gran Bretaña y Polonia. Los reportes indican que está confinada a ciertas regiones en Argentina, Rusia, Alemania del Este y Siria.

Hay una baja incidencia esporádica en Bélgica, Italia, España, Egipto, Cuba, Yugoslavia, Grecia e Israel y una "moderada incidencia", en Francia, Portugal, Sudáfrica, Brasil, Perú, Venezuela y Australia.

Una "alta incidencia", es reportada en Rodesia, Paraguay, Chile, Guatemala, Costa Rica, India y Hong Kong. (104)

Aquí, en nuestro país, la frecuencia de brucelosis en cabras no ha sido totalmente publicada, aún cuando se sabe que el 90% del problema de Salud Pública en humanos con esta enfermedad se origina en dichos animales. Los estados mexicanos, concretamente Coahuila, que limitan con los Estados Unidos han sido especialmente comprometidos, con tasas de mortalidad tan altas como 40.4 casos en 100,000 habitantes durante los años sesentas. Las tasas de infección en rebaños se han reportado en un 38% lo cual viene a confirmar el dato de la alta incidencia de brucelosis en México. (25)

CAPITULO VII

RESUMEN

La brucelosis (fiebre ondulante), se expande a la población humana, procedente de los animales. La enfermedad es raramente transmitida de persona a persona. En contraste, la infección entre animales es altamente contagiosa, y su mal puede hacerse crónico con diseminación del microorganismo dentro del medio ambiente. Animales que llegan a ser infectados quedan así de por vida, algunos, particularmente aquéllos expuestos cuando jóvenes o hembras preñadas, se recobran y eliminan la infección y no quedan inmunes.

La enfermedad es adquirida por el humano, a partir de animales infectados o de sus productos, a través de varias puertas de entrada: cortadas o heridas en la piel, inhalación de microorganismos a través del tracto respiratorio, ingestión oral o por contaminación de los ojos. Los bacilos sobreviven en carne cruda, leche cruda y otros productos lácteos tales como la mantequilla, crema y queso.

Para algunas personas, la enfermedad es un riesgo ocupacional, particularmente campesinos, lecheros, veterinarios, inspectores de carne, trabajadores de plantas empacadoras, carniceros y otros quienes trabajan con productos contaminados.

Por estas razones, es necesario aplicar las diferentes -

pruebas de laboratorio en forma exhaustiva para establecer un diagnóstico real de brucelosis y éstas son:

- . Hemocultivo
- . Reacción de Huddleson o similares
- . Prueba de la Brucelergina
- . Prueba de Fijación en superficie
- . Prueba Opcionocitofágica
- . Prueba de fijación del complemento
- . Otras pruebas (RBPT, SAT, etc.)

Además debe contarse con otros datos, como son la sintomatología presentada por la persona enferma, que comprende sin tomas generales como:

Fiebre

Sudoración

Síntomas musculares y osteoarticulares

Astenia

Anorexia

Pérdida de peso

Cefalea

Al estar plenamente confirmado que se trata de brucelosis, el paso a seguir es establecer el tratamiento indicado, que puede ser con antibióticos, corticoesteroides y antigenoterapia, dependiente del caso que se esté revisando.

El número de casos reportados de brucelosis humana en nuestro país no ha sido fielmente publicado, siendo éste un

problema que impide valorar en realidad la incidencia de la enfermedad en México; pero es interesante hacer ciertas consideraciones sobre programas de erradicación que se puedan llevar a cabo, contando con el apoyo de personas que se ven afectadas tanto física como económicamente en relación con esta infección.

Es indudable que los factores de educación, económico, social, político y biológico, influyen en el proceso de control y erradicación. La educación es realmente necesaria, la revisión de textos usados para la enseñanza de Microbiología y sobre enfermedades infecciosas en escuelas mexicanas de Medicina y Veterinaria, revelan que las características epidemiológicas importantes de esta enfermedad son discutidas inadecuadamente, ya que por ignorancia o indiferencia, la población toma pocas medidas de precaución.

Las instituciones públicas y grupos profesionales no asumen su responsabilidad para transmitir adecuadamente programas de información en salud pública.

No solamente es necesario un conocimiento adicional de factores biológicos, sino también la interacción que haya entre los factores epidemiológicos y económicos, con la dinámica de la industria, así como la influencia en la prevalencia de la brucelosis. Hay necesidad de investigar sobre la protección de las personas en la industria alimentaria, quienes están en riesgo de enfermar. Es necesaria la investigación, para reve -

lar un sistema de identificación en animales, que permitiría - conocer a los infectados, a sus dueños previos y a sus rebaños de origen.

El papel de los investigadores en este esfuerzo es im - portante si se desea que la brucelosis sea eliminada en nues - tro país. Se requiere apoyo médico en términos de (1) Diagnós - tico exacto de brucelosis humana, (2) Reporte de todos los ca - sos presentados en las instituciones de salud pública, (3) Edu - cación de laboratoristas y público en general en el conocimien - to de la enfermedad, y (4) Apoyo político y económico por legis - ladores, que proporcionen fondos y recursos que se dirijan a - una erradicación y control total.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alausa O.K. (1976) Brucellosis: The situation in Western Nigeria. Trop. Geogr. Med. Vol 1, 54-59.
- 2.- Alausa O.K. (1980) Incidence and seasonal prevalence among occupationally exposed population to Brucellosis. Trop. Geogr. Med. Vol 1, 5-12.
- 3.- Alausa O.K. (1980) Brucellosis: Socio-economic problems and control in various countries. Trop. Geogr. Med. Vol 1, 5-11.
- 4.- Alton G. (1975) Laboratory techniques in Brucellosis. Geneva World Health Organization. Ser No. 55.
- 5.- Alton G. (1975) The serological diagnosis of bovine Brucellosis: An evaluation of the complement fixation, serum agglutination and Rose Bengal tests. Aust. Vet. Vol 57, 57-63.
- 6.- Anderson N (1964) Brucella agglutination antibodies. Relation of mercaptoctanol stability to complement-fixation. Science 143, 1334-1335.
- 7.- Barcoul S. (1976) Stimulating activity of Brucella fractions in a human lymphocyte transformation test. Correlation with humoral and cellular immunity. Immunology Vol 5, 717-722.
- 8.- Bolívar Mejía J.A. (1979) Brucellosis in the personnel of a slaughterhouse of Caldas, Colombia. Bol. Sanit. Panamá. Vol 4, 319-324.
- 9.- Barclay William. (1980) Brucellosis: Control. J.A.M.A. - Vol 244, 2315.
- 10.- Berger T.G. (1981) Cutaneous lesions in Brucellosis. Arch. Dermatology. Vol 1, 40-42.

- 11.- Beh K.J. (1980) Antibody containing cell response of --- sheep to intestinal infusion of killed Br. abortus cells. Cell. Immunology. Vol 1, 70-78.
- 12.- Brown S.L. (1981) Safranin O-stained antigen microagglutination test for detection of Brucella antibodies. J. Clin. Microb. Vol 12, 398-400.
- 13.- Brown G.M. (1975) Serologic and bacteriologic procedures for the diagnosis of Br. canis. Prac. U.S. Anim. Health - Assoc. Vol 6, 583-584.
- 14.- Black B.A. (1975) Brucellosis control versus eradication. J. Am. Vet. Assoc. Vol 3, 185-186.
- 15.- Beck A.C. (1977) The use of simulation modelling in the management of Brucellosis eradication. Aust. Vet. J. Vol 10, 485-489.
- 16.- Bioxon. Antígenos febriles. Manual de técnicas.
- 17.- Cantú Cuevas Diana. Oponización en Brucelosis. Tesis. - Universidad Motolinía.
- 18.- Cortina Greys P. (1975) Results of a seroepidemiological survey on Brucellosis. Rev. Sanit. Hig. Publ. Vol 8, 767 771.
- 19.- Coombs R.R. (1978) The class of antibodies sensitizing - bacteria measured by mixed reverse passive antiglobulin-haemagglutination (MrPAH). Immunology. Vol 6, 1037-1044.
- 20.- Cernyseva M.I. (1977) Study of the plate agglutination - test with Rose Bengal antigen for the diagnosis of human Brucellosis. Bull WHO. Vol 6, 669-674.
- 21.- Cendron R.J. (1980) Goat and human Brucellosis in the - department of Rivadavia province of Salta Argentina. Bol. Sanit. Panam. Vol 5, 432-440.
- 22.- Carlsson H.E. (1976) Enzyne-linked immunosorbent assay - (ELISA) for titration of antibodies against Br. abortus- and Yersinia enterocolitica. Pathol. Microb. Scand. Vol 84, 168-176.

- 23.- Cameron R.D. (1976) Characteristics of semen changes during Br. ovis infection in rams. Vet. Rec. Vol 12, 231--233.
- 24.- Daikos G.K. (1973) Trimethoprim-sulfamethoxazole in Brucellosis. J. Infect. Vol 128, 731-734.
- 25.- Eckman M.R. (1975) Brucellosis linked to mexican cheese. J.A.M.A. Vol 6, 139-144.
- 26.- Edwards J.M. (1970) Comparison of the Indirect Fluorescent antibody test with agglutination complement-fixation and Coombs test for Brucella antibody. J. Clin. Pathol. Vol 23, 161-165.
- 27.- Editorial. (1975) Brucellosis. Lancet. Vol 1, 436-438.
- 28.- Editorial. (1976) Brucellosis. test developments. Vet. Rec. Vol 11, 207.
- 29.- Editorial. (1977) Brucellosis going? Br. Med. J. Vol 6059, 466-467
- 30.- Editorial. (1978) Antiacids and Brucellosis. Br. Med. J. Vol 6115, 739-740.
- 31.- Editorial. (1977) Standardized complement-fixation test for bovine Brucellosis. Aust. Vet. J. Vol 8, 394-400.
- 32.- Eaton P. (1980) Br. canis infection (Letter) Vet. Rec. - Vol 11, 255-256.
- 33.- Farid Z. (1980) Acute Brucellosis presenting fever of un known origin (FUO). Trop. Geogr. Med. Vol 3, 2318-2322.
- 34.- Fredickson L.E. (1974) A serologic survey for canine Brucellosis in a metropolitan area. J. Am. Vet. Med. Assoc. Vol 11, 987-989.
- 35.- Fichtner G.J. (1973) Progress of the state federal Brucellosis eradication program Proc. U.S. Anim. Health Assoc. Vol 77, 100-108.
- 36.- Flores Castro R. (1977) Canine Brucellosis: Bacteriological and serological investigation of naturally infected dogs in Mexico City. J. Clin. Microb. Vol 6, 591-597

- 37.- Flores Castro R. (1976) A serological and bacteriological survey of canine Brucellosis in Mexico. Cornell. Vet. Vol 3, 347-352.
- 38.- Flores Castro R. (1978) Canine Brucellosis: Current status of methods for diagnosis. Cornell. Vet. Suppl. 7, -- 76-88.
- 39.- Gras J. (1975) Stimulation of IgG antibody formation by-sublethal irradiation during persistently repeated immunization with Br. abortus. Immunology. Vol. 4, 629-634.
- 40.- Garcia Carrillo C. (1979) Isolation of Br. abortus biotypes 1 and 4 in Nicaragua. Bol. Sanit. Panam. Vol 2, 132-134.
- 41.- Gradwhol R.B. (1948) Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. 4a. Edition. Vol II, 1476-1485.
- 42.- Glenchr H. (1961) Significance of the blocking antibody-in experimental Brucellosis. J. Inmun. Vol 86, 421-426.
- 43.- Garner J. G. (1981) Bacteriological aspects of a case of Br. suis infection. Med. J. Vol 675, 8-9.
- 44.- Hinchliffe P.M. (1975) A screening method for the detection of Brucella antibodies in human serum. J. Clin. Pathol. Vol 1, 50-53
- 45.- Higuera J. de la (1979) Unusual case of Brucellosis: Brucellar-myocarditis. Rev. Clin. Esp. Vol 4, 301-304.
- 46.- Hall W.H. (1953) Comparison of the Coombs test with other methods for Brucella agglutinins in human serum. J. Clin. Invest. Vol 32, 96-106.
- 47.- Hess W.R. (1953) Studies on a nonspecific Brucella agglutinating substance in bovine serum. The diferentiation on the specific agglutinins by heat treatment. Am. J. Vet.-Res. Vol 14, 192-194.
- 48.- Havas L. (1980) Problems and new developments in the treatment of acute and chronic Brucellosis in man. Acta Trop. (Basel). Vol 3, 281-286.

- 49.- Hunter. (1977) A comparison of three selective media for the isolation of Br. abortus from contaminated material. -- Br. Vet. J. Vol 5, 486-489.
- 50.- Jawets Ernest. (1975) Manual de Microbiología Médica. 6a. Edición, 254-256.
- 51.- Kourany M. (1975) Seroepidemiologic survey of Brucellosis in a high risk population of Panama. Bol. Sanit. Panamá. Vol.3, 230-236.
- 52.- Kerr W.R. (1966) The laboratory diagnosis of chronic Brucellosis. Lancet. Vol 2, 1181-1183.
- 53.- Kontoyanis P.A. (1975) Co-trimoxazole in chronic Brucellosis. A two year follow-up study. Br. Med. J. Vol 2, 480-481.
- 54.- Kuzdas C.D. (1953) A selective medium for the isolation of Brucellae from contaminated materials. J. Bacter. Vol 66. 502-503.
- 55.- Kassur B. (1980) Andrologic studies and sexual potency in chronic human Brucellosis. J. Infection. Vol 3, 94-97.
- 56.- Koler J. (1978) Some observations on antigenic properties and immunogenic effects of brucella vaccine PB19. Br. Vet. J. Vol 4, 384-392.
- 57.- Lee Gordon B. (1975) Lo esencial de la Inmunología. 2a. Edición, 80-83.
- 58.- Leyzaola Castillo Ma. (1955) Método actual de preparación de antígeno de Br. abortus y pruebas más recientes de diagnóstico de Brucelosis en el hombre y en los animales. Tesis. U.N.A.M.
- 59.- León Lomeli Ma. (1961) Diagnóstico de la brucelosis en la comunidad e identificación de las especies de Brucella por la intradermoreacción y la reacción de fijación del complemento. Tesis. U.N.A.M.
- 60.- Ledro Molina D. (1977) Bang's disease; apropos of 10 cases. Rev. Clin. Esp. Vol 5, 507-510.

- 61.- Ledro Molina D. (1980) Current therapeutic and anatomoclinical aspects of Brucellosis. Rev. Clin. Esp. Vol 6, - 427-431.
- 62.- Livingston W.H. (1975) letter: Brucellosis eradication. J. Am. Vet. Med. Assoc. Vol 8, 697-700.
- 63.- Lander K.P. (1978) Brucellosis Blood samples. Letter. Vet. Rec. Vol 1, 21.
- 64.- Lynch Matthew J. (1972) Métodos de Laboratorio. 2a. Edición 945-947.
- 65.- Lorens Terol J. (1980) Brucellosis treated with rifampicin. Arch. Dis. Child. Vol 6, 486-488.
- 66.- Morris J. (1975) Effect of gaseous conditions on the dye-sensitivity of Strain 19 and other Brucella cultures. J. Biol. S. Vol 2, 163-166.
- 67.- Munford R.S. (1975) Human disease caused by Br. canis. A clinical and epidemiologic study of two cases. J.A.M.A. - Vol 12, 1269-1276.
- 68.- Munford R.S. (1977) Epidemiologic aspects of Brucellosis in a high risk population in Panama. Bol. Sanit. Panam. - Vol 2, 140-147.
- 69.- Mayer E.P. (1978) Enumeration of human B lymphocytes in stained blood smears by their binding of bacteria. Clin. Immunopathol. Vol 1, 37-46.
- 70.- Madraso E.D. (1978) Polyadenylic acid-polyuridylic acid (poly A:U) and experimental murine Brucellosis. Effect of single and double-stranded polynucleotides on Br. abortus in vivo and in vitro. Immunology. Vol 1, 69-76.
- 71.- Madraso E.D. (1978) Polyadenilic acid-polyuridilic acid (polyA:U) and experimental murine Brucellosis. Macrophages as target cells of polyA:U in experimental Brucellosis. Immunology. Vol 1, 77-84.
- 72.- McCullough N.D. (1976) Immune response to Brucella. Manual of Clin. Immu. 304-311.
- 73.- McMahon J.J. (1979) An agar-gel immunodiffusion test for detection of Brucella antibodies in human serum. Can. J. Micro. In Press.

- 74.- Meyer M.E. (1958) Species metabolic patterns within the genus *Brucella*. Am. J. Vet. Res. Vol 19, 754-758.
- 75.- Meyer M.E. (1974) Advances in research on Brucellosis. - Adv. Vet. Sc. Comp. Med. Vol 0, 231-250.
- 76.- Navarro J.F. (1974) Epidemiology of Brucellosis in the province of Avila. Rev. Sanit. Hig Publ. Vol 10, 885-906.
- 77.- Osollo Rodríguez Gloria. (1962) Relación del properdin - complemento. Anticuerpos específicos y propiedades bactericidas del suero sanguíneo con la inmunidad natural para *Brucella melitensis*. Tesis. U.N.A.M.
- 78.- Oomen L.J. (1974) The Rose Bengal plate test in human Brucellosis. J. bacter. Vol. 3, 300-302.
- 79.- Oomen L.J. (1976) Human Brucellosis in Kenya. Trop. Geogr. Med. Vol I, 33-45.
- 80.- O'Reilly L.M. (1977) Chronic human Brucellosis and anti-anergic treatment with levamisol. Vet. Rec. Vol 5, 103.
- 81.- Peña Yañez A. (1977) A case of chronic epidural granuloma of melitococcal origin. Rev. Clin. Esp. Vol 2, 141-145.
- 82.- Peña Yañez A. (1976) Report on Brucellosis. Rev. Sanit.- Hig Publ. Vol 9-10, 1013-1022.
- 83.- Parrot D.K. (1977) Radioimmunoassay of IgM, IgG, and IgA *Brucella* antibodies. Lancet. Vol 1, 1075-1078.
- 84.- Pickering J.P. (1975) Letter: Brucellosis eradication. - Vet. Rec. Vol 5, 117.
- 85.- Ramacciotti Felix E. (1959) La reacción de fijación en su superficie en Brucelosis. Rev. Latinoam. de Microb. Vol 2, 117-123.
- 86.- Rest R.F. (1975) Characterization of the electron system in *Br. abortus*. J. Bacter. Vol 1, 139-144.
- 87.- Rodríguez Cuartero (1975) Brucellosis: Comments on 90 cases. Rev. Clin. Esp. Vol 5, 13-21.
- 88.- Rodríguez de Serna A. (1978) Septic shock and disseminated intravascular coagulation in a case of acute Brucellosis. Rev. Clin. Esp. Vol 6, 623-624.

- 89.- Rivera Pérez L. (1979) Brucellosis in the provincial hospital of Alicante. Review of 90 cases. Rev. Clin. Esp. -- Vol 2, 97-102.
- 90.- Rusell A. O. (1978) Evaluation of the card test for diagnosis of human Brucellosis. J. Clin. Microb. Vol 7, 454--458.
- 91.- Reener E.D. (1979) Brucellosis. Clin. Microb. News. Letter. Vol 1.
- 92.- Riecke J.A. (1975) Br. canis isolated from the eye of a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. Vol 6, 583-584.
- 93.- Renoux M. (1977) Brucellosis. Immunodepression and levamisole. Letter. Lancet Vol 1, 372.
- 94.- Comité Mixto FAO-OMS de expertos en Brucelosis. (1970) - Quinto informe.
- 95.- Sperry J.F. (1975) Erythritol catabolism by Br. abortus.- J. Bacter. Vol 2, 619-630.
- 96.- Sperry J.F. (1975) Inhibition of growth by erythritol catabolism in Br. abortus. J. Bacter. Vol 1, 391-397.
- 97.- Santillana López T. (1976) Brucellosis: Therapeutic and - Clinical considerations. Review of 50 cases. Rev. Clin. - Esp. Vol 2, 131-137.
- 98.- Sánchez Calle M. (1977) Diagnostic value of indirect immunofluorescence in Brucellosis. Rev. Clin. Esp. Vol 2, -- 153-157.
- 99.- Spink W. (1954) A standardized antigen for agglutination - technique for human Brucellosis. Am. J. Clin. Pathol. Vol 24, 496-498.
- 100.-Versilova P.A. (1974) Diagnosis of human and animal Brucellosis by the indirect haemagglutination test. Bull. WHO - Vol 2, 191-197.
- 101.-Vendrell J.P. (1980) Mitogenic activity of two Brucella - fractions for murine B Lymphocytes. Immunology. Vol 1, 41-46.
- 102.-Vargas V. (1980) Treatment of acute Brucellosis with cotrimoxazole, doxycyclin and streptomycin. A comparative stu-

- dy. Med. Clin. Vol 10, 418-420.
- 103.- Wilson D.V. (1977) A solid phase assay with radioactively labelled antibody for the detection of Br. abortus. - J. Med. Microb. Vol 3, 281-292.
- 104.- Wire Robert I. (1980) Brucellosis in the United States.- Past, present and future. J.A.M.A. Vol 244, 2318-2322.
- 105.- Wilson J.B. (1962) Estudio de la relación entre virulencia, capacidad de invasión y desarrollo intracelular de Br. abortus. Rev. Latinoam. de Microb. Vol 5, 135-148.
- 106.- Wright A.E. (1897) On the application of the serum test to the differential diagnosis of the typhoid an Malta Fe ver. Lancet. Vol 1, 656-661.
- 107.- Woolwy R.E. (1976) Canine Brucellosis in man. Med. Vet.- Pract. Vol 4, 287-288.
- 108.- Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis (1978) Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias (SARH), Escuela Nacional de Estudios Profesionales (ENEP "C").