



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Estudio Serológico y Aislamiento Bacteriológico de la
Brucelosis, en Cerdos Residentes en una Granja de San
Pedro Atocpan, en el Distrito Federal.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
QUE PRESENTA
PABLO BAUTISTA OSORNO

Director de la tesis
M.V.Z. DANIZA GONZALEZ GARZA

Asesor Técnico
M.V.Z. M.Sc. GERMAN GONZALEZ LOPEZ

MEXICO, D. F., 1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

	C O N T E N I D O	PAG.
I.-	INTRODUCCION	3
II.-	MATERIAL Y METODOS	13
III.-	RESULTADOS	23
IV.-	DISCUSION	29
V.-	CONCLUSIONES	33
VI.-	BIBLIOGRAFIA	34

ANTECEDENTES.

Algunas autoridades en la historia de la medicina consideran que la Brucelosis era una enfermedad conocida desde Hipócrates (400 años antes de la era cristiana); pero las primeras descripciones en las que se presenta con claridad son las de Cleghorn (1751). En 1863, Marston presentó una discusión detallada de la enfermedad tal como ocurría en Malta. En 1886, Sir David Bruce aisló del bazo de un cadáver humano un germen gramnegativo, al que designó con el nombre de Micrococcus melitensis debido a su tamaño, forma cocolde y por haberse encontrado en un caso de fiebre de malta. Más tarde logró aislar el germen de enfermos y pudo demostrar la virulencia del Micrococcus melitensis para el mono. En honor a Sir David Bruce, se propuso la creación del género Brucella, que fue aceptado en todo el mundo. Huges (1897) presentó una monografía que es una de las contribuciones en su época , más completa sobre la materia. También en ese mismo año (1897), Wright y Semple desarrollaron un método de diagnóstico basado en el poder aglutinante del suero sanguíneo de enfermos sobre cultivos de Brucella melitensis (19).

En 1897, el Dr. Bang en Dinamarca, aisló de la secreción uterina de una vaca que había abortado, un germen pequeño de forma bacilar, gramnegativo, al que atribuyó el papel etiológico en el aborto contagioso de los bovinos. El germen recibió el nombre de bacilo de Bang y más tarde Brucella abortus. Sin embargo, la confirmación técnica en cuanto a la etiología de este padecimiento en los bovinos, tuvo lugar hasta 1910 por Mac Neal y Kerr. En 1905, fue demostrada la forma en que el hombre adquiría la infección. El tercer miembro del grupo de las Brucellas: Brucella suis, - fue aislado por Traub en 1914, cultivando órganos de fetos abortados por cerdas. Se trata de un germen más relacionado con Brucella abortus que a Brucella melitensis. La importancia del nuevo germen en la economía ganadera fue reconocida inmediatamente (19).

Es creencia común que el primer caso referido de infección

humana por *Brucella abortus*, lo reportó Keefer en 1924, pero según - -
Huddleson, el germen aislado era en realidad *Brucella suis*, descubierta -
por Traun en el ganado porcino, con lo que fue demostrado el primer caso
de Brucelosis humana producido por un germen diferente de la *Brucella* - -
melitensis (19).

En 1918, Alicia Evans comprobó la relación entre estos micro
organismos, motivando que se les considerara en un solo grupo, el cual fue
clasificado primero en el género *Alcaligenes* por Castellani y Chalmers --
(1918-1920) y tiempo después dentro del género *Brucella*, en honor a Sir -
David Bruce (15, 16, 19).

I.- INTRODUCCION.

La ganadería porcina es una industria pecuaria de suma importancia en México. Esto en parte es debido a características tan favorables como su precocidad sexual, alta prolificidad, rápido desarrollo y engorde, así como la posibilidad de concentrar animales en un espacio limitado. Si a estas cualidades se le suma su aprovechamiento en la industria cárnica por su sabor tan especial y el de su piel en la industria peletera, se deduce el porqué esta especie es tan apreciada en nuestro medio. Sin embargo, en nuestro país en la mayoría de los casos, se padece una incorrecta explotación, derivándose de ello graves pérdidas económicas en las explotaciones, por costos de enfermedades y muertes. Es también de gran importancia, el destacar los problemas de salud pública que pueden traer consigo aquellas explotaciones con serias carencias técnicas de manejo e higiene.

En el caso de las pérdidas económicas (centrándonos al problema de Brucelosis porcina), éstas son muy grandes, debido a las pérdidas de lechigadas completas y desórdenes reproductivos en los animales adultos. Además la erradicación implica costosos gastos, si ésta es efectuada eliminando por completo a una pía (3).

En México "La Campaña Nacional para el Control de la Brucelosis" en 1975, realizó un estudio de pérdidas económicas por concepto de esta enfermedad y concluyó en los porcinos, que estas pérdidas ascendieron a \$11'947,680.00 M.N. anualmente (15). Las cifras anteriores son las pérdidas directas aparentes, que contemplan principalmente la pérdida de crías, ya sean por abortos y por mortinatalidad, por problemas reproductivos (infertilidad), por reemplazo, por disminución en la producción, de carne, gastos de asistencia médica veterinaria y mortalidad.

Por otra parte, las pérdidas directas no aparentes, contemplan la depreciación de los animales enfermos, retrasos de crecimiento, pérdida de peso, recuperación del peso perdido, pérdida del mercado interno

y pérdida de líneas directas. Las pérdidas indirectas o consecutivas, repercuten sobre la salud humana en cuanto al ausentismo, gastos de enfermedad, disminución de la capacidad, indemnizaciones y muertes. Repercuten además sobre la industria y el mercado nacional e internacional (15).

La valoración económica de las pérdidas directas no aparentes e indirectas, resulta difícil de realizar, de ahí que los estudios económicos de Brucelosis porcina, sólo se han estimado con las pérdidas directas aparentes (15).

Ahora, en el caso de salud pública, las personas que manejan el ganado enfermo, así como los médicos veterinarios que lo tratan y el personal que lo sacrifica y procesa en el rastro, son las que tienen mayores posibilidades de contagio. Por estas razones, la Brucelosis es considerada como una enfermedad de carácter profesional, donde los sujetos más expuestos son aquellos que atienden partos y abortos, así como los que manejan carne y vísceras de animales infectados (3, 15, 19).

Entre el público consumidor, la infección puede deberse a la ingestión de carnes que no hayan sido sujetas a calentamiento adecuado, constituyéndose en un medio frecuente de contagio (19).

La Brucelosis porcina es un problema de salud pública, porque se transmite directa o indirectamente al hombre, causándole enfermedad, incapacidad física y pérdidas de horas de trabajo. También produce una disminución seria de las poblaciones proveedoras de proteínas animales, que son esenciales para la salud y el bienestar humano (16).

En las explotaciones porcinas, la Brucelosis se manifiesta principalmente con problemas en la reproducción, aunque puede tener ocasionalmente otras manifestaciones clínicas. La enfermedad en cerdos con mayor frecuencia es producida por Brucella suis, aunque pueden darse casos de infección por Brucella abortus y Brucella melitensis (21).

Si bien las Brucellas poseen un amplio medio de distribución desde el punto de vista de su huésped, no se transmiten fácilmente del huésped preferido a otro (9). De ahí, que aunque la infección por Brucella suis ocurra naturalmente en los caballos, ganado vacuno, perros y en las gallinas, la enfermedad tiene evolución más limitada en estos animales que en el cerdo (9).

La enfermedad en los cerdos, es causada principalmente por cuatro serotipos de Brucella suis (7). En México se han aislado Brucella suis y Brucella abortus a partir de estos animales (16). Algunas pruebas disponibles hacen pensar que la Br. abortus no es altamente patógena para el cerdo y es probable que no haya signos clínicos de la infección - cuando se establece la enfermedad (9).

La Brucelosis porcina se encuentra en la mayor parte de los países del orbe. En zonas enzooticas la proporción de piaras afectadas puede alcanzar hasta 30-60%. La mortalidad en los lechones puede llegar al 80%; en animales adultos, la mortalidad es insignificante, pero los animales se sacrifican por esterilidad o parálisis posterior (3).

Los censos señalan que del 0.5% al 1% de los cerdos de E. U., están infectados de Brucelosis, siendo el principal agente etiológico Brucella suis tipo I (4, 9).

Rodríguez H. en 1970, investigando 142 sueros porcinos - empleando la prueba rápida en placa con antígeno de Brucella abortus cepa 119-3, encontró una incidencia del 11.2% a partir de animales con historia clínica de aborto (13).

Flores Castro R. (14), ha encontrado una incidencia por zonas:

- 1.- Zona norte.- Se muestrearon 50,000 animales con porcentaje del 4%.

- 2.-) Zona pacífico norte.- Con un 4% de incidencia.
- 3.-) Zona pacífico sur.- Con un 4% de incidencia.
- 4.-) Zona centro.- No específica.
- 5.-) Zona del Golfo.- No específica.

Jiménez Parra Francisco (1978), a su vez encontró una incidencia de animales positivos a Brucelosis, en porcentaje de 95.4% mediante pruebas de aglutinación en placa en una granja porcina de Tehuixtla, Morelos (16), en un probable brote epizootico.

Como puede observarse, las incidencias encontradas por - - Flores Castro R. y Jiménez Parra Francisco, discrepan grandemente. Esto puede deberse a que en México esta enfermedad es poco conocida y quizá - sólo hasta últimamente se ha empezado a investigar (12). Por esta causa, no ha sido sujeta a minuciosos estudios como con la Brucelosis en los - - bovinos.

Transmisión.

Se ha demostrado que la infección por Brucella suis en - - cerdos, puede ocurrir cuando éstos adquieren la bacteria por vía oral, con juntival y durante la cópula, siendo susceptibles tanto los machos como - las hembras (7). En la actualidad todos los autores están de acuerdo en que la Brucelosis se transmite principalmente por vía oral (15). La infección del testículo y vesículas seminales del verraco, en la Brucelosis del cerdo es un aspecto extraordinario, pues las enormes cantidades de semen que eyaculan, van contaminadas por una cantidad considerable de Brucellas (19). Esto da a la transmisión de la infección porcina, un aspecto distinto de lo que ocurre en los bovinos, en los que el papel del macho infectado es mucho menos importante (19).

Una vez que ha ocurrido la infección, se produce una fase bacterémica y la infección tiende a localizarse en diferentes tejidos corporales, predominando la infección en órganos genitales: en el macho se lo

caliza en los túbulos seminíferos, epidídimo y vesículas seminales, mientras que en la hembra se localiza en la mucosa uterina (2, 3, 7, 9, 18), en donde se hace crónica, propiciando la eliminación constante del microorganismo en secreciones vaginales y semen.

Etiología.

La Brucelosis en los cerdos, es causada por tres tipos de microorganismos distintos, estrechamente relacionados: Brucella suis, - Brucella abortus y Brucella melitensis (9). Cabe mencionar nuevamente - que la causa principal de Brucelosis porcina es Brucella suis (2, 3, 4, 7, 9, 10).

Las Brucellas son bacilos cortos, cocobacilos, con predominio de las formas cocoides en los tejidos y exudados. Son negativos a la tinción de Gram, exhiben tinción bipolar y los aislamientos recientes son encapsulados. En cultivos viejos se encuentran bacilos grandes. Ninguna de las especies exhibe motilidad (17).

Las tres especies tiñen la gelatina, hidrolizan la urea - y producen H_2S ; el último carácter varía algo con la cepa. Se diferencian por su capacidad para crecer en presencia de los colorantes tionina y fuchina a concentración de 1:100,000 (17).

A continuación, en el siguiente cuadro, se mencionan algunas de las características de los gérmenes especificados anteriormente:

Especie	Gram	Forma	Atmósfera	H ₂ S	Colorantes		Aglutinógeno
					fuchina	tionina	
<i>Brucella melitensis</i>	-	cocoide	ordinaria	-	+	+	Melitensis
<i>Brucella abortus</i>	-	formas con tendencia cocobacilar	CO ₂	++	+	-	Abortus
<i>Brucella suis</i>	-	formas con tendencia cocobacilar	ordinaria	+++	-	+	Abortus

(15)

Patogenia.

Al penetrar al huésped, las Brucellas son inmediatamente atacadas por fagocitos principalmente polimorfonucleares en un intento de que la infección quede perfectamente localizada. Sin embargo, los gérmenes fagocitados son capaces de reproducirse en el interior de las células polimorfonucleares, que protegen a las bacterias de la acción bacteriolítica de algunas sustancias plasmáticas (bacteriolifinas.- sustancias inhibitorias no inmunológicas). Los neutrófilos son destruidos por la multiplicación de Brucellas en su interior y las Brucellas son nuevamente ingeridas, pero en esta ocasión por células mononucleares que las transportarán por vía linfática a los ganglios regionales, en donde darán origen a una hiperplasia de células del sistema reticuloendotelial con formación de granulomas (en este punto puede controlarse el proceso. (14).

Si las bacterias son capaces de superar esta barrera, pa-

...#

san a la sangre, donde son ingeridas por leucocitos mononucleares, pasando a través de órganos como el hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. En estos órganos se producirá una hiperplasia celular con formación de lesiones granulomatosas. La proliferación de monocitos y la presencia de granulomas constituyen respuestas tisulares características de Brucelosis. Estas desaparecen cuando se ha superado la infección (también aquí podría tener fin la infección). (14).

Cuando las Brucellas logran sobrepasar estos mecanismos defensivos, se produce una nueva bacteremia, a la cual sigue una infección generalizada. Finalmente el cuadro se hace crónico y los gérmenes pueden localizarse en el útero, la ubre y ganglios linfáticos. En estos puntos los microorganismos serán capaces de multiplicarse continuamente, de tal manera que se eliminarán en forma intermitente en los exudados vaginales, así como en la leche (14). La infección por Br. suis en cerdos difiere de la causada por Br. abortus en los bovinos, en que no siempre se observa predilección por localizaciones en el útero y la ubre, encontrándose el microorganismo en todos los tejidos corporales (3). El útero grávido es sumamente susceptible a la acción de estos gérmenes, que invaden las estructuras placentarias dando como resultado una inflamación con aumento de las excreciones (14), que se ven como un exudado ligeramente hemorrágico que fluye de la vulva antes del aborto (18).

Los microorganismos pasan a través de la placenta, multiplicándose en los líquidos placentarios. Al invadir las membranas placentarias fetal y materna, las Brucellas les ocasionan hiperemia, edema, -- hemorragias petequiales y necrosis, provocándose el aborto (14, 18).

Consecuencias de la Infección Genital en Cerdos.

Cerdas repetidoras.- La infección uterina persistente está asociada con ciclos estrales irregulares y falta de concepción después de un número considerable de servicios (7).

Abortos.- Los machos infectados transmiten la enfermedad a las hembras susceptibles durante el coito, cuando esto sucede los embriones mueren dentro de los siguientes 22 días. En estos casos el aborto -- pasa inadvertido puesto que no se producen siquiera descargas vaginales - (2, 3, 4, 7, 9, 18).

Cuando las hembras se encuentran entre los 30 y 45 días - de gestación al adquirir la infección por vía oral o conjuntival, los abortos suelen ocurrir entre los 45 y 105 días de gestación, siendo más común la expulsión de fetos de 70-80 días (2, 3, 7, 9).

Mortinatos y lechones débiles.- Cuando las cerdas adquieren la infección por vía oral o conjuntival durante el último tercio de la gestación, entonces es probable que no ocurra el aborto, sin embargo, -- puede haber lechones que nazcan muertos en una camada, en tanto que otros nacen vivos aunque sumamente débiles, estos animales suelen morir en el transcurso de una o dos semanas (2, 3, 4, 7, 9).

Infección genital en machos.- Se ha demostrado que los cerdos son susceptibles a B. suis, tanto como las hembras (2, 3, 9, 10). -- Aún los animales jóvenes pueden adquirir la infección. Brucella suis se localiza en la vesícula seminal, próstata y epidídimo, lo cual propicia -- que la bacteria sea continuamente eliminada por el semen. Es común la -- existencia de lesiones microscópicas en dichos tejidos. La infertilidad -- de los verracos es un problema frecuentemente asociado con la infección -- por Brucella suis (2, 3, 4, 7, 10). Las manifestaciones clínicas son -- muy variables pudiendo existir orquitis uni o bilateral, epididimitis y -- prostatitis asociados con una marcada ausencia de libido (2, 3, 9, 10).

Diagnóstico.

La Brucelosis puede ser diagnosticada mediante tres diferentes procedimientos:

a) Diagnóstico clínico.- Las manifestaciones clínicas en animales infectados varían considerablemente, por lo que el diagnóstico clínico - suele ser meramente presuntivo y requiere la confirmación mediante la ayuda de laboratorio (2, 3, 4, 7, 9, 10, 12, 15, 17, 21).

b) Estudios bacteriológicos.- El aislamiento de Br. suis a partir de sangre, exudados, secreciones, tejidos de fetos abortados, placentas, leche y otros materiales, es el único método definitivo en el diagnóstico de la enfermedad (2, 3, 4, 7, 9, 10, 12, 15, 17, 18, 21).

c) Pruebas serológicas.- El diagnóstico serológico ha sido hasta la fecha el más útil y práctico a pesar de que pueden ocurrir resultados falsos negativos o falsos positivos, debidos a posibles reacciones heteroespecíficas o bien, producidas por anticuerpos residuales en animales vacunados. En porcinos el diagnóstico serológico es complicado, puesto que los anticuerpos tienden a desaparecer muy pronto, aún en casos crónicamente enfermos es posible encontrar reacciones serológicas negativas, o bien, positivas a bajos títulos (2, 3, 7, 9, 10, 21). Es por esto que el diagnóstico de la Brucelosis porcina debe establecerse a nivel de piara y no en forma individual (3, 7, 9, 10, 15). Entre los métodos serológicos más comunes se mencionan: pruebas estándar de aglutinación rápida en placa y lenta en tubo; prueba de tarjeta o rosa de Bengala; prueba de aglutinación con suero inactivado a 56°C. (2, 5, 6, 7, 8, 14, 15, 19).

Se emplean en el diagnóstico de la Brucelosis porcina los mismos antígenos de Br. abortus para pruebas de aglutinación rápida en placa; y lenta en tubo, usadas en el diagnóstico de Brucelosis bovina (9). Se hicieron estudios comparativos de los antígenos preparados con la cepa 119-3 de Br. abortus con los preparados con la misma cepa de Br. suis tipo I, empleados para la inoculación porcina experimental. Las pruebas comparativas en más de 2,000 muestras de suero porcino, demostraron plenamente que los antígenos preparados con Br. abortus eran iguales para el diagnóstico, desde todos los puntos de vista, a los preparados con la cepa homóloga de Br. suis tipo I (9).

Lo anterior puede explicarse debido a las estructuras an-

II.- MATERIAL Y METODOS.

Material.-

1.-) Sangre de 198 porcinos provenientes de una granja porcina ubicada en San Pedro Atocpan, en el Distrito Federal.

El criterio de elección empleado para muestrear esta granja, se basó en los antecedentes clínicos de la piara, que fue expuesta al posible contagio, debido a la compra de un semental que luego de haber sido introducido a la explotación, presentó problemas de orquitis. Poco después de su llegada a la granja, el semental fue apareado con la mayoría de las hembras, quienes comenzaron a manifestar trastornos reproductivos, dentro de los cuales destacaron principalmente, las hembras repetidoras y por consiguiente un mayor número de servicios por concepción, así como la presentación de abortos, que aunque se presentaron en un número muy reducido, despertaron las sospechas acerca de la presencia de Brucelosis entre los animales. Posteriormente se realizaron en este verraco, las pruebas serológicas lenta en tubo, rápida en placa, de tarjeta y prueba de HIF, resultando en todas con reacciones positivas, por lo que de inmediato fue desechado de la explotación. Cuatro verracos jóvenes -- cuya edad fluctuaba entre los 8-11 meses de edad, ocuparon el lugar del animal eliminado y uno de ellos, al poco tiempo manifestó orquitis y claudicación en el tren posterior

En el siguiente cuadro se mencionan algunas características de la piara:

Sexo		Raza		Edad		No. de servicios por concepción	No. de partos por hembra.	Función Zootécnica.	Identificación
Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos				
194	4	Híbridas F1	1 Hampshire. 2 Yorkshire. 1 Landrace	6-11 meses	8-11 meses	X4, aunque algunas tenían de 5-6 servicios.	La mayoría de los vientres con un solo parto	Pié de cría	Ningún animal fue identificado.

- 2.-) Antígeno de *Brucella abortus* cepa 119-3, para prueba rápida en placa de los laboratorios Pronabive.
- 3.-) Antígeno de *Brucella abortus* cepa 119-3, para prueba lenta en tubo de los laboratorios Pronabive.
- 4.-) Antígeno de *Brucella abortus* cepa 119-3 para prueba en tarjeta.

Características de los antígenos

	Concentración celular	Colorante	PH	Presentación
Pba. en placa	11%	Verde Brillante y cristal violeta.	6.4-7.0	100 dosis
Pba. en tubo	4.5%	no lleva	6.4-7.0	200 dosis
Pba. en tarjeta	8.0%	Rosa de Bengala	3.65±0.05	650 dosis

5.-) Material de vidriería.

- a) Tubos de vidrio.
- b) Pipetas de Bang de 0.2 ml. graduadas en 0.08, -- 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml.
- c) Pipetas de 10 ml.
- d) Placa de vidrio cuadrículada.

Método.-

Se tomaron 198 muestras sanguíneas de porcinos mediante el empleo de equipo vacutainer de las cuales se obtuvo el suero al separar el coágulo sanguíneo, con posterior centrifugación a 5000 R.P.M. durante 10 minutos. Cada una de las muestras fue sometida a tres pruebas diferentes: 1) prueba lenta en tubo, 2) prueba rápida en placa y 3) prueba de tarjeta. Se tomó como prueba principal a la primera, mientras que las

otras dos fueron empleadas como marco de referencia.

Prueba lenta en tubo (método de Wright modificado), - -
(1, 8, 10, 19).

La prueba en tubo generalmente se realiza usando suero-salino fenicado, conteniendo NaCl al 0.85% y 0.5% de fenol (1), pero en este caso se realizó con una solución salina fenicada de NaCl al 5% y 0.5% de fenol (10).

El antígeno viene estandarizado en concentración de 4.5% y se diluyó 100 veces en solución salina al 5% y fenolada al 0.5% (1), porque para esta prueba se utilizó a una concentración del 0.045%. La dilución fue realizada 48 horas antes de su empleo (1, 5, 6, 8, 10).

Procedimiento de la prueba.

La prueba de aglutinación en tubo puede realizarse utilizando tres procedimientos: a) diluciones múltiples dobles, b) dilución-múltiple y c) método alterno de diluciones múltiples (1, 8).

En este trabajo se utilizó la técnica de dilución múltiple doble y es la única que se describe en detalle.

Método de diluciones múltiples dobles:

Por cada muestra deberán utilizarse 5 tubos que corresponden a las diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.

Antes de iniciarse la prueba, se retiró el suero y el antígeno del refrigerador y se expusieron a temperatura ambiente durante - 30-60 minutos.

Con una pipeta de Bang se midió el suero problema y en el fondo del primer tubo se depositó la cantidad de 0.08 ml. de suero; en el segundo tubo se depositaron 0.04ml., en el tercer tubo 0.02 ml.; y así su

cesivamente.

Con una pipeta de 10 ml. se depositaron 2.0 ml. de antígeno diluido dentro de cada tubo con el suero problema, en las proporciones especificadas con anterioridad, resultando las diluciones de 1:25 al 1:400.

Los tubos fueron agitados durante 30 segundos para lograr la homogenización de las mezclas.

Se incubaron a 37.5°C. por espacio de 48 horas y posteriormente se leyeron e interpretaron las reacciones.

La interpretación de la prueba se realiza de la manera siguiente:

1.-) Reacción positiva.- Es aquella en que la mezcla de suero-antígeno está parcialmente clara y al realizar una suave agitación se observan grumos en suspensión que no se diluyen.

2.-) Reacción incompleta.- Es aquella en que la mezcla de suero-antígeno está parcialmente clara y al realizar una suave agitación se observan grumos en suspensión que no se diluyen.

3.-) Reacción negativa.- Es aquella en que la mezcla de suero-antígeno es turbia y al realizar una suave agitación no revela grumos en suspensión (1, 5, 6, 8, 10).

Suelen utilizarse las pruebas de aglutinación en tubo, en padecimientos como la Salmonelosis, Brucelosis, Tularemia y Campilobacteriosis. Se prefiere generalmente la aglutinación en portaobjetos como prueba preliminar. Se incluyen en este grupo las pruebas de ácido y antígeno para Brucella en las cuales los microorganismos teñidos con el -

colorante llamado rosa de Bengala, se suspenden en un amortiguador ácido (PH3,6). (20).

Prueba rápida de aglutinación en placa (método de - Huddleson). (19).

Las técnicas más comunes para el diagnóstico de Brucelosis son las pruebas de suero aglutinación de placa y de tubo. Los antígenos que se utilizan para estas pruebas son elaboradas de acuerdo a - especificaciones estándar (5, 6, 8).

El antígeno de placa tiene una concentración celular tal, que cuando se mezclan 0.03 ml. con las diferentes cantidades de suero y se incuba durante 8 minutos, los resultados obtenidos son comparables a las concentraciones de 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200, correspondiente a la prueba en tubo (8).

Procedimiento de la prueba.

Antes de iniciarse la prueba se retiró el suero y el antígeno del refrigerador y se expuso a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos y se encendió el foco del aglutinoscopio durante 5 minutos con el objeto de calentar la placa de prueba.

Con la pipeta de Bang de 0.2 ml., se extrajo el suero problema manteniendo la pipeta en el ángulo de 45° y la punta tocando la placa de aglutinación, se depositó en el primer cuadro de la placa la cantidad de 0.08 ml. de suero.

Utilizando el mismo método se depositaron en el centro de los cuadros siguientes, las cantidades de 0.04, 0.02, 0.01 y - - 0.005 ml.

Posteriormente el frasco que contenía al antígeno de placa, se homogenizó por agitación manual durante un minuto y se depositó una gota de 0.03 ml. de antígeno sobre cada una de las cantidades de suero. Con el removedor o aplicador de madera, se agitaron las mezclas de antígeno y suero en forma rotatoria.

Después del mezclado de las diluciones, se movió la placa en forma rotatoria durante 30 segundos, luego se colocó la placa en la caja aglutinoscópica y se incubó durante 8 minutos, a los 4 minutos de la incubación se volvió a mover la placa de la misma manera para mezclar así nuevamente las diferentes diluciones del suero problema, después de los 8 minutos se movió por última vez la placa en forma rotatoria y se leyeron e interpretaron las reacciones.

Lectura de las reacciones.

Reacción completa.- Es aquella en la cual la mayor parte de las células bacterianas en la mezcla suero-antígeno han sido aglutinadas. Esto puede ser determinado por comparación de la reacción final con la siguiente reacción más baja. El tamaño de los grumos varía desde los extremadamente finos hasta los gruesos.

Reacción intermedia o incompleta.- Incluye todos los grandes intermedios de reacción abarcando desde pequeñas cantidades de células bacterianas aglutinadas, hasta casi la totalidad de las células aglutinadas.

Reacción negativa.- Es una mezcla homogénea de suero-antígeno, sin ninguna evidencia de aglutinación.

Algunos de los primeros trabajos (Cámeron, 1943) sugirieron que un título de 1:25(+) en el ceado, evidenciaba agresión por Brucellas; pero en estudios posteriores (Cámeron y Carlson, 1944; Gram-

ford y Manthel, 1948; Hutchings, 1944) realizados en piaras no infectadas, se observaron títulos de 1:25(+) y 1:50 en cerdos que no habían sido expuestos a las Brucellas (aglutininas inespecíficas por inmunidad cruzada). En consecuencia, numerosos autores recomendaron que la prueba de seroaglutinación se debería basar en una gráfica del título de aglutininas y en la historia de la pira (9).

La interpretación de la prueba actualmente aceptada es que los animales sin título de aglutinación y las que tienen 1:25 (+) ó 1:50, están potencialmente infectados, si están asociados con otros cerdos que presenten títulos de 1:100 o superiores (3, 9). En este trabajo se siguió el criterio empleado por la "Campaña Racional para el Control de la Brucelosis", el cual considera a un animal como reactor o positivo, - - cualquier cerdo que resulte con un título de aglutinación completa de - - 1:25(+) o superior, para la prueba de tubo o de placa, o que resulte positivo a la prueba de tarjeta (12).

Prueba de Tarjeta.

Para la prueba de tarjeta se utiliza un antígeno teñido con rosa de Bengala, que tiene como característica ser más específico que el utilizado en la prueba de placa o tubo, ya que no reacciona con - - ciertos tipos de aglutininas (5, 6, 8, 10). El antígeno tamponado empleado para la prueba de tarjeta, no permite medir el título de anticuerpos, o sea que el método no es cuantitativo, sino cualitativo, obteniéndose algunas diferencias cuando se compara con la prueba de aglutinación en placa - (8).

En algunas ocasiones la prueba de tarjeta resulta positiva con títulos de 1:25U.I., o menos, y en otros casos es negativo cuando del método de placa se obtienen títulos equivalentes a sospechosos o positivos (8, 10).

La prueba de tarjeta se ha considerado como prueba complementaria debido a que algunas aglutininas no reaccionan con este antígeno. Sin embargo se ha utilizado en donde las condiciones de manejo dificultan mucho la operación de control. Esta prueba es rápida y práctica, lo que permite realizar el sangrado, efectuar la prueba de inmediato e identificar los animales reactivos en un mínimo de tiempo, lo cual facilita tremendamente el movimiento de ganado (8).

Las pruebas utilizadas en el Reino Unido y Australia parecen ser relativamente sensibles, pero poco específicas; en estas condiciones se pueden utilizar como pruebas preliminares. En cambio la prueba de tarjeta utilizada en E.U. y Canadá parece poco sensible, pero más específica que las demás. Por consiguiente, se le puede usar para separar de la población los animales positivos (20).

Estudio Bacteriológico.

En la segunda fase de investigación en este trabajo, se trató de aislar y clasificar la Brucella causal de la enfermedad en aquellos sujetos que presentaron reacciones positivas más significativas, mediante las pruebas serológicas. El objeto fue el de poder determinar el tipo de Brucella predominante en la granja. Para ello se contó con muestras sanguíneas extraídas con la ayuda de equipo vacutainer a través de la vena yugular.

La técnica de aislamiento empleada fue el método de medio doble de Castañeda, para lo cual se ocuparon botellas ordinarias de vidrio blanco de forma apianada y corte rectangular con capacidad de 100-200 C.C. En su interior primero se colocó el medio sólido recién preparado y aún caliente en una cantidad de 15-20 C.C. por cada botella, suficiente para que se formara así en una de las paredes angostas, una capa delgada y uniforme de agar. Se cubrió la boca de las botellas con tapones de papel fuerte sujetados con un elástico. Después se esterilizaron las -

botellas en el autoclave a 20 libras de presión durante 20 minutos, luego fueron sacadas de ahí y puestas a enfriar en posición horizontal, para que el medio se solidificara en las paredes de las botellas. Más tarde se agregó el medio líquido en una cantidad de 10-15 C.C. por cada botella y en un volumen similar de gas CO₂.

Después de haberse preparado las botellas, se agite el líquido para que así se moje todo el interior del frasco, incluyendo el tapón, y se conserva en la incubadora a 37°C durante 10-15 días; eliminándose aquellos que muestren contaminación. Después de esta prueba los medios están listos para ser empleados (19).

De esta manera pueden emplearse combinaciones de bacto triptosa caldo y agar, albimi caldo y agar, trypticasa soya y agar, y también infusión de hígado y gelosa hígado. Se recomienda que el medio sólido lleve al menos 0.5% de citrato de sodio y de que la proporción de agar sea del 4% para evitar que se rompa la capa sólida (19).

A partir de las 96 horas de hacerse el hemocultivo, es muy probable que el desarrollo observado en el medio sólido sea Brucella. Mientras que el medio sólido no presente desarrollo bacteriano, hay que seguir practicando "resiembras" por inclinación del frasco cada 48 horas, hasta el trigésimo día en que se descarta como negativa (19).

La razón por la cual se usó este método de practicar el hemocultivo, es porque así se evitan manipulaciones que además de consumir material y tiempo, exponen a un posible riesgo de contaminación.

También se trató de aislar Brucella, a partir de plaquetas fetales. Las muestras fueron sembradas en agar sangre con una atmósfera del 10% de CO₂, añadiéndole al medio polimixina B, para evitar riesgos de contaminación bacteriana.

III.- Resultados.

Al realizarse los primeros estudios serológicos en 12 cerdas, usando las pruebas lenta en tubo, rápida en placa y de tarjeta, se encontraron en diez de estos animales, reacciones positivas.

Los títulos de las reacciones, comprendieron desde 1:25 (+) y 1:50 en siete de los mismos, mientras que en los tres restantes, dos presentaron títulos de 1:100 y uno, un título de 1:200.

Al encontrarse reactivos con títulos tan altos en el primer muestreo, se siguió el criterio de tomar como positivo, a todo aquel animal que presentase reacciones con títulos a partir de 1:25 (+).

De 198 cerdas muestreadas y probadas por la prueba lenta en tubo, se encontraron los siguientes resultados:

- a) 45.45% positivos.
- b) 54.55% negativos.

Los mismos 198 animales, fueron muestreados y probados por la prueba rápida en placa, encontrándose los resultados siguientes:

- a) 30.3% positivos.
- b) 69.6% negativos.

Los 198 animales mencionados, fueron muestreados y probados por la prueba de tarjeta, encontrándose los resultados siguientes:

- a) 29.29% positivos.
- b) 70.71% negativos.

De los 45.45% animales positivos, encontrados median

ta la prueba lenta en tubo, se eligieron aquellos más representativos por tener las reacciones con mayores títulos (1:200). A estos animales, cuatro en total, se les extrajo sangre por medio de la ayuda de equipo vacutainer y posteriormente fueron sacrificados para ser muestreados bacteriológicamente.

Los resultados de este trabajo son presentados en forma -
sintética en los siguientes cuadros.

Cuadro No. 1

Resultado global, total y porcentual de muestras trabajadas por la prueba lenta en tubo, con sus distintas diluciones.

		%	1:25(-)	1:25(+)	1:50	1:100	1:200
No. de muestras probadas	198	100					
No. de muestras positivas	90	45.45	108	33	34	19	4
No. de muestras negativas	108	54.55					

Cuadro No. 2

Resultado global, total y porcentual de muestras trabajadas por la prueba rápida en placa, con sus distintas diluciones.

		%	1:25(-)	1:25(+)	1:50	1:100	1:200
No. de muestras probadas	198	100					
No. de muestras positivas	60	30.3	138	39	17	4	0
No. de muestras negativas	138	69.6					

Cuadro No. 3
Resultado global, total y porcentual de muestras trabajadas
por la prueba de tarjeta.

%

No. de muestras probadas	198	100
No. de muestras positivas	58	29.29
No. de muestras negativas	140	70.71

Cuadro No. 4
Resultados y porcentajes obtenidos mediante la prueba lenta
en tubo, de acuerdo a las distintas diluciones.

1:25(-)	1:25(+)	1:50	1:100	1:200	Total
108	33	34	19	4	198
53.54%	16.66%	17.17%	9.59%	2.02%	100%

Cuadro No. 5
Resultados y porcentajes obtenidos mediante la prueba rápida
en placa, de acuerdo a las distintas diluciones.

1:25(-)	1:25(+)	1:50	1:100	1:200	Total
138	39	17	4	0	198
69.6%	19.6%	8.5%	2%	0%	100%

Cuadro No. 6

Resultados globales y porcentuales, obtenidos mediante la prueba de tarjeta.

Positivos	Negativos	Total
58	140	198
29.29%	70.71%	100%

De los 198 animales muestreados y probados, se siguió la historia reproductiva de 14 encontrándose los siguientes datos especificados en el cuadro No. 7.

Cuadro No. 7

Hembras con partos normales	109	74.7%
Hembras repetidoras (con 4 servicios como \bar{x} por c/cerda)	34	23.3%
Hembras que abortaron	3	2.0%
TOTAL	146	100.0%

Al no identificarse a los animales que presentaron títulos positivos en las pruebas serológicas realizadas, este cuadro quedó inconcluso, ya que no se logró complementar las distintas titulaciones, con los trastornos reproductivos expuestos. No obstante, este cuadro demuestra - que el índice reproductivo se ve disminuído por problemas de hembras repetidoras (principalmente) y abortos, lo cual se traduce en graves pérdidas económicas y problemas latentes de salud pública.

En cuanto al aislamiento bacteriológico, este trabajo arrojó resultados negativos en lo concerniente a la identificación y clasificación de gérmenes pertenecientes al género *Brucella*.

Sólo fue posible aislar a partir de los cultivos de plaquetas fetales, *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp.

IV.- DISCUSION.

La Brucelosis porcina es una enfermedad que se encuentra en la mayor parte de los países del orbe (3). Provoca además grandes pérdidas económicas en el ganado porcino, aunque solamente se estimen las pérdidas directas aparentes (15), las cuales están representadas por problemas reproductivos de mortalidad, de abortos, de reemplazos, de disminución en la producción y por gastos de asistencia médica veterinaria y mortalidad (15).

La Brucelosis de los cerdos es considerada como un -- problema de salud pública (2, 3, 15, 19), porque se transmite directa o indirectamente al hombre, causándole enfermedad, incapacidad física y pérdidas de horas trabajo (16).

La enfermedad en los cerdos es causada principalmente, por cuatro serotipos de Brucella suis (16), aunque pueden darse casos -- de infección por Br. abortus y Br. melitensis (3, 9, 19). Estos tres -- géneros de Brucellas, han sido clasificados dentro del grupo de las cepas lisas (15), y de acuerdo a la proporción de aglutinógenos distribuidos en cada una de ellas, se han clasificado en dos tipos (19). Tipo uno, -- en el que predomina el aglutinógeno "H" y que ocurre en la Br. Melitensis y Tipo dos, en el que predomina el aglutinógeno "A", correspondiente a -- Br. abortus y Br. suis (19).

Por la causa expuesta anteriormente, se explican en el diagnóstico de Brucelosis porcina, los mismos antígenos de Br. abortus, -- para pruebas de aglutinación en placa o en tubo y prueba de tarjeta, para el diagnóstico de Brucelosis bovina (9), ya que pruebas comparativas han demostrado que los antígenos preparados con Br. abortus, son iguales para el diagnóstico, desde todos los puntos de vista, a los preparados con la cepa homóloga de Br. suis tipo I.

El diagnóstico de Brucelosis porcina se realiza por métodos de cultivo o serológicos. Los métodos serológicos son más sencillos y se ejecutan con mayor facilidad; en cambio los métodos de cultivo son más complicados, puesto que los organismos son exigentes y proliferan con lentitud (17), esto puede explicar los resultados negativos al tratar de lograrse el aislamiento, en este trabajo.

La única forma segura y fácil de determinar si una pira está o no infectada, es someterla totalmente a análisis serológicos (2, 3, 4, 9, 12). Sin embargo, el único método definitivo en el diagnóstico de la enfermedad, es el aislamiento y clasificación del agente etiológico (9, 17).

La Brucelosis en los cerdos, por lo general es una infección de carácter crónico y la producción de anticuerpos es reducida, ya que la bacteria se reproduce intracelularmente (14, 21).

Por la razón anterior, el problema de diagnóstico en la Brucelosis porcina se dificulta, ya que las pruebas recomendadas por la "Campaña Nacional para el control de la Brucelosis" (pruebas rápida en placa, lenta en tubo, de tarjeta y cualquier otra prueba especial que se considere necesaria, de acuerdo a las circunstancias especiales del caso), no han resultado del todo satisfactorias, por estar basadas en reacciones de aglutinación (12, 21). Los cerdos como respuesta a las infecciones por *Brucella*, producen IgG1, las cuales poseen poco poder aglutinante y bio-

quean además el poder aglutinante de las IgM (21,25).

Además en porcinos, el diagnóstico serológico se complica un poco más que en los bovinos, puesto que los anticuerpos tienden a desaparecer muy pronto; aún en cerdos crónicamente enfermos, es posible encontrar reacciones serológicas negativas, o bien, positivas a bajos títulos (7, 11, 9).

Por estas razones es que el diagnóstico de la Brucelosis porcina debe establecerse a nivel de piara; y no en forma individual, aunando además la historia clínica de la misma, en donde hayan sido encontrados casos de alta mortalidad en las lechigadas, hembras repetidoras, abortos, mortinados y lechones débiles (3, 4, 9, 10). Los abortos son excepcionalmente raros en cerdas jóvenes cuando eran lechonas (9), esto puede explicar el que no hay habido un elevado número de abortos en la granja.

La interpretación de las pruebas lenta en tubo y rápida en placa, actualmente aceptada, se basa en las piaras dentro de las cuales no existan cerdos con títulos mayores de 1:100, clasificándose como negativos aquellos animales que presenten títulos positivos de 1:25 (+) y 1:50. Pero en piaras infectadas, el criterio aceptado especifica que los animales sin título de aglutinación y aquellos que tienen títulos de 1:25 (+) ó 1:50, están potencialmente infectados, si están asociados con otros cerdos que presenten títulos de 1:100 o superiores (9). En este trabajo, se siguió el criterio empleado por la "Campaña Nacional para el Control de la Brucelosis", quien considera a un animal como positivo, a cualquier cerdo que resulte con un título de aglutinación completa de 1:25 (+) o superior, para las pruebas lenta en tubo o rápida en placa, o bien, que resulte positivo a la prueba de tarjeta (12).

Si se compara la eficacia para detectar casos positivos a Brucelosis utilizando la prueba de fijación de complemento y la prueba

de MIF con las pruebas empleadas en este trabajo; las dos primeras tienen una mayor sensibilidad para el diagnóstico. Sin embargo, la prueba lenta en tubo y las pruebas en tubo, en placa y de tarjeta, son poderosos auxiliares para efectuar un buen diagnóstico, ya que requieren de menos equipo y son más sencillas en su proceso; mientras que las pruebas de fijación de complemento y de MIF, requieren de materiales más complicados y de procedimientos más delicados, de los que se carece en la mayoría de los casos.

Si se analizan los cuadros 1, 2 y 3, se puede observar que las pruebas serológicas a nivel de piara realizadas en este trabajo, detectaron gran número de animales positivos con títulos elevados. Si estos resultados son comparados con los obtenidos en el cuadro No. 7, se relacionan con la historia clínica de la piara, por lo que se supone que la causa fundamental de los trastornos acontecidos en la granja, pudo haberse debido por problemas de Brucelosis, ya que no fue posible lograr el aislamiento y clasificación del germen.

V.- CONCLUSIONES.

De 198 cerdos muestreados y probados por la prueba lenta en tubo, se encontró un total de 45.45% de animales positivos y 54.55% de animales negativos.

De estos 198 animales muestreados y probados por la prueba rápida en placa y por la prueba de tarjeta; se encontraron un total de 30.3% de animales positivos y 69.6% de animales negativos para la primera; y un total de 29.29% de animales positivos y 70.71% de animales negativos para la segunda respectivamente.

Las pruebas lenta en tubo, rápida en placa y de tarjeta, - son poderosos auxiliares en el diagnóstico de la Brucelosis porcina y son además pruebas muy fáciles de realizar y con un mínimo de material.

Sometiendo totalmente a una piara a análisis serológicos, puede determinarse si ésta se encuentra infectada, pero el único método - definitivo en el diagnóstico de Brucelosis es el aislamiento y clasificación del agente etiológico.

De los 45.55% de animales positivos encontrados mediante la prueba lenta en tubo, se eligieron a cuatro de ellos que resultaron ser los más representativos de la piara, por tener los títulos más elevados - (1:200), para ser sacrificados (previa extracción de sangre) y ser muestreados bacteriológicamente. Los resultados para poder aislar gérmenes - del género Brucella, fueron negativos. Tan sólo se lograron aislar Streptococcus spp. y Staphylococcus spp.

Aunque no fue posible lograr el aislamiento bacteriológico, se supone que la presencia de Brucelosis en la granja, fue la causa primordial en los desórdenes reproductivos acontecidos.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.-) Altón, G. L. M. Jones.
"Las Técnicas de Laboratorio en la Brucelosis" FAO/OMS.
Serie de monografías No. 55, 1969.
- 2.-) Beer Joachim.
"Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos"
Tomo II.
Ed. Acribía 1981.
- 3.-) Blood D. C. y Henderson J. A.
"Medicina Veterinaria". Tr. Fernando Colchero O.
Editorial Interamericana, 3a. edición en español (1976).
Pags. 399-402
- 4.-) Bundy E. Clarence. Diggins V. Ronald.
"Producción Porcina", 3a. reimpresión. (1976).
Editorial C.E.C.S.A.
- 5.-) Centro Panamericano de Zoonosis, O.S.P.
"Técnicas e Interpretación de las Pruebas de Brucelosis
por Seroaglutinación".
Argentina, 1968, nota técnica No. 2. p. 11us.
- 6.-) Centro Panamericano de Zoonosis.
"Elaboración y Normalización de Antígenos para las Prue-
bas de Seroaglutinación de Brucelosis".
Argentina, 1969, nota técnica No. 3, rev. 3.
- 7.-) Ciprián Carrasco A., Flores Castro R.
Revista Porcínama.
"Brucelosis Porcina".
No. 76, 1980.
- 8.-) Cortés N. Adán, Cabello F. Eduardo.
"Pruebas Serológicas de Rutina para el Diagnóstico de
Brucelosis".
Campaña Nacional para el Control de la Brucelosis.
D.G.S.A. S.A.G.
Boletín Técnico No. 1

- 9.-) Dunne D. Howard.
"Enfermedades del Cerdo".
Ed. Uthea (1967). tr. Dr. José Pérez Lfas y Dr. Alfredo Beltrán. 1a. Edición al español , 1967.
- 10.-) Esminger E. M.
"Producción Porcina", Ed. El Ateneo.
4a. edición. 1970.
- 11.-) FAO/OMS. Comité de Expertos en Brucelosis 5o. Informe,
Serie de Informes Técnicos, No. 464. Ginebra,
29 jun.-6 jul. de 1970, publicado en 1972.
- 12.-) Flores Menéndez Jorge A.
"Ganado Porcino".
Cría, Explotación e Industrialización.
Prof. Tec. Agraz García Abraham A.
Ed. Limusa, México, 1979, 1a. edición.
- 13.-) I.N.I.P.-S.A.R.H.
"Resúmenes de la Séptima Reunión Anual del I.N.I.P."
S.A.G., 14, 15 y 16 de enero de 1970. Km. 15.5 Carr.
México-Toluca, Palo Alto, D.F.
Revista Técnica Pecuaria.
- 14.-) I.N.I.P., S.A.R.H.
"Resúmenes de la Reunión Anual del I.N.I.P."
S.A.G. Km. 15.5 Carr. México-Toluca,
Palo Alto, México, D.F. (1975)
Revista Técnica Pecuaria
- 15.-) I.N.I.P., E.N.E.P.-C.
"Memorias del Foro Nacional sobre Brucelosis".
Auditorio de la Comisión Nacional de Fruticultura,
México, D.F., diciembre 8 de 1978.
- 16.-) Jiménez Parra Francisco P.
"Contribución al Estudio de la Brucelosis y su Curso en
una Granja Porcina en el Estado de Morelos".
Tesis U.N.A.M. Fac. Med. Vet. y Zootecnia,
México, D.F. 1978.

- 17.-) Medway William, Prier James y Wilkinson S. John.
"Patología Clínica Veterinaria".
1a. edición en inglés (1969). Ed. Uthea. 1a. Edición
en español 1973. tr. M.V.Z. M. Sc. Hedberto Ruiz Skewes.
- 18.-) Runnells, R.A.W.S. Monlux y A.W. Monlux.
"Principios de Patología Veterinaria".
tr. G. Quezada Bravo.
México, C.E.C. S.A. (1979).
- 19.-) Ruiz Castañeda M.
"Brucelosis"
Ed. La Prensa Médica Mexicana (1954).
1a. Edición, 1954.
- 20.-) Tizard R. Ian.
"Inmunología Veterinaria".
Tr. Dr. Roberto Folch Fabre, 1a. ed. al español 1979.
Editorial Interamericana.
- 21.-) Tron Fierros Ma. de Jesús
"La Prueba HIF para el Diagnóstico de Brucelosis Porcina"
Tesis U.N.A.M. Fac. Med. Vet. y Zootecnia,
México, D.F., 1980.