

COMENTARIOS DE LIBROS E INFORMES

LA BRUCELOSIS ANIMAL EN LOS ESTADOS UNIDOS DE N. A.

Informe sobre la difusión de la enfermedad, medios y procedimientos de lucha, progresos en el conocimiento de la bacteriología, de la patogenia, del diagnóstico y de la terapéutica

B. SZYFRES

PÉRDIDAS ECONÓMICAS. ÍNDICE DE INFECCIÓN

La brucelosis sigue siendo uno de los problemas más serios de la sanidad animal en los Estados Unidos. Según cálculos hechos por el Comité de U. S. Livestock Sanitary Association, la pérdida por brucelosis animal asume la cifra de 100 millones de dólares anuales, de los cuales 87 millones serían debidos a brucelosis bovina.

Estudios hechos durante varios años en distintos establecimientos representativos que comprenden varios miles de cabezas de vacunos, para comparar la diferencia en las pariciones en vacas libres de la enfermedad, vacas recientemente infectadas (reaccionantes de hace menos de dos años) y vacas con brucelosis crónica (reaccionantes de hace más de dos años), han dado los siguientes datos:

Si damos un índice de 100 a vacas que producirían un ternero normal cada doce meses, las vacas libres de brucelosis dan un promedio de 87, las recientemente infectadas 54 y las reaccionantes crónicas 76. En estas cifras no entran las vacas que han sido eliminadas a causa de esterilidad permanente.

Según otro informe, una vaca no infectada daría un ternero cada once y medio meses, mientras el promedio por una vaca infectada sería un ternero cada veinte meses. Una sobre cada cinco vacas que abortan, se volvería estéril.

La reducción en la producción de leche por brucelosis es calculada en 20 %, lo que para los Estados Unidos significaría una pérdida de cincuenta millones de dólares.

El índice de infección en los animales que fueron sometidos a la prueba de sueroaglutinación es alrededor de 5 % y el número de establecimientos infectados sería de un 20 %. Si se calcula que hay cuarenta millones de vacas, entre las de leche y carne, en edad de reproducción, habría unos dos millones de animales infectados.

En su otro aspecto, el de salud pública, la brucelosis presenta un problema no menos grave, pues arroja una cifra de unos siete mil enfermos anualmente.

MEDIOS Y PROCEDIMIENTOS DE LUCHA CONTRA LA BRUCELOSIS

Hasta el año 1934 no había ningún plan nacional para la erradicación de la brucelosis. En julio de ese año, el Congreso otorgó medios para la reducción del número de ganado cuyo excedente se calculaba en diez millones de cabezas. Estos fondos fueron aprovechados para instituir un plan cooperativo entre el Gobierno Federal y los distintos gobiernos estatales para la erradicación de la brucelosis. El procedimiento puesto en acción fué el de prueba serológica y sacrificio de los reaccionantes, previa indemnización al propietario. Si bien al principio la labor se llevó a cabo en establecimientos aislados, diseminados en distintas comarcas del país, pronto el programa fué modificado, adoptándose el plan de áreas, con el fin de evitar que establecimientos saneados estuvieran expuestos a ganado infectado de establecimientos vecinos. La división territorial de ese país, o sea el condado (county), sirvió de base para el programa.

Desde diciembre de 1939 se consideraba "área modificada acreditada" todo condado en el cual los reaccionantes positivos no excedían el 1 % y el número de establecimientos infectados no pasaba del 5 %. Al cabo del año fiscal 1948 había en los Estados Unidos 480 condados declarados áreas acreditadas, lo que viene a ser un 15,59 % del total de las divisiones territoriales de aquel país.

Desde el año 1943 al 1948 se observa cierta regresión en el número de áreas acreditadas, ya que en aquel año se encontraban en ese estado 583 condados, en comparación con los 480 del año 1948. El único estado que está acreditado es el de Carolina del Norte.

El número de bovinos que se somete anualmente a las pruebas oficiales de sueroaglutinación, es de cinco millones, lo que viene a ser un 12 o un 13 % del total de hembras en edad de reproducción.

Gracias al plan de lucha expuesto, se pudo reducir el índice general de infección del ganado estadounidense y muchos establecimientos lecheros quedaron saneados. El procedimiento de prueba serológica y sacrificio ha dado resultados satisfactorios, especialmente en establecimientos chicos, donde el índice de infección inicial era bajo, la infección databa desde hacía varios años y a los cuales no se introducían animales susceptibles de otros orígenes.

La experiencia recogida ha enseñado, sin embargo, que por este método sólo, será imposible erradicar la brucelosis en plano nacional. El procedimiento de sueroaglutinación y sacrificio no es sólo sumamente oneroso, significando muchas veces la pérdida de los mejores linajes zootécnicos, sino que es inoperante en muchos establecimientos grandes, o donde la infección es activa, con abortos frecuentes e índice de infección alto. Además, los estragos que una reinfección ocasiona en un establecimiento saneado hace tiempo, son mayores de los que lo eran originariamente, pues los animales en ese caso son completamente susceptibles. Otra limitación de este método es el factor personal, pues, a pesar de la excelente organización de la sanidad animal americana y la intervención de numerosos técnicos oficiales y particulares, las pruebas hechas anualmente se reducen a una pequeña parte del total del ganado del país.

En 1940 se introdujo en los procedimientos oficiales de lucha, la vacunación de terneras con la cepa 19. Esta vacunación no elimina ni sustituye el procedimiento de prueba y sacrificio, sino le sirve de base, pues su objeto es limitar la difusión de la infección y conferir resistencia a los animales, para luego recurrir a la sueroaglutinación para erradicar la enfermedad.

PLANES DE LUCHA ACTUALMENTE EN OPERACIÓN

La U. S. Livestock Sanitary Association, con el fin de uniformar los programas de lucha en los diferentes estados de la Unión, ha recomendado, en su conferencia anual de diciembre de 1947, los siguientes planes de control de la brucelosis, que fueron aprobados por el Bureau of Animal Industry.

Plan A: Prueba serológica y sacrificio, con o sin vacunación de terneras.— Este plan es recomendado para los establecimientos con un índice bajo de infección y donde la eliminación de los reaccionantes no significaría gran pérdida económica. Este plan tiene la ventaja que es a corto plazo, pues establecimientos poco infectados pueden eliminar la enfermedad después de pocas pruebas serológicas. Todas las reglas de higiene y de sanidad deben ser estrictamente observadas. Se recomienda la vacunación de terneras, cuando el establecimiento en saneamiento se encuentra rodeado por haciendas muy infectadas.

Plan B: Prueba serológica y vacunación de terneras, con retención temporaria de reaccionantes.— En este plan, los reaccionantes son retenidos hasta el momento en que pueden ser reemplazados por los animales vacunados que entran en producción. Este es un plan a un plazo largo y no exige mayor sacrificio económico del propietario. Con el tiempo, la resistencia conferida al ganado por la vacunación, se manifiesta por la disminución de los casos activos de la enfermedad y la reducción del número de reaccionantes. El propietario debe tratar de

eliminar los reaccionantes en cuanto tenga la posibilidad económica de hacerlo. Cuanto antes los elimine, tanto más rápida será la erradicación de la infección.

Plan C: Vacunación de terneras solamente.—La prueba serológica no es exigida. El plan tiene por objeto establecer con el tiempo un rodeo resistente, para luego proceder a la eliminación de la infección, por prueba serológica y sacrificio.

Plan D: Vacunación de adultos.—Es un plan de emergencia, al cual se puede recurrir solamente en haciendas donde la enfermedad se difunde rápidamente, provocando gran número de abortos. Para la vacunación de adultos se requiere un permiso especial, por escrito, de las autoridades competentes. El propietario debe ser advertido que la vacunación de los adultos no siempre detiene la difusión de la infección. Previa la vacunación se practicará la prueba serológica, se identificarán todos los reaccionantes y la vacuna será administrada solamente a los animales negativos, dentro de los diez días de la sueroaglutinación oficial.

Para que uno de los planes entre en vigencia en forma obligatoria en un área, se requiere que lo pidan el 65 % de los establecimientos que reúnan el 51 % del ganado de la comarca.

La Livestock Sanitary Association adoptó también resoluciones con respecto a la identificación de los reaccionantes y de los vacunados. Éstos serán marcados ya sea a fuego o por tatuaje con la letra "V", mientras los reaccionantes deberán serlo a fuego con la letra "B", excepto los puros de pedigree que están identificados en forma permanente. Los reaccionantes podrán ser movilizados del establecimiento solamente para el sacrificio, a excepción de animales de alto valor zootécnico que, previo permiso del estado, podrán entrar a otros establecimientos infectados.

Todas las vacunaciones, como asimismo los resultados de las pruebas serológicas, deberán ser comunicados a las autoridades competentes.

SIGNIFICADO

DE LA DIVERSIFICACIÓN DE LOS PLANES DE LUCHA

El programa de acción trazado por la U. S. Livestock Sanitary Association, evidencia el hecho de que no se puede adoptar un procedimiento uniforme de lucha para todos los establecimientos infectados. En establecimientos chicos, con infección inactiva y con pocos animales reaccionantes, la enfermedad puede ser rápidamente eliminada, con poco sacrificio económico, mediante pocas pruebas serológicas. En los establecimientos que no respondan a este tipo, la cooperación de los propietarios puede ser obtenida solamente cuando el procedimiento a emplearse no implique pérdidas económicas excesivas. Esta situación puede ser contemplada por un plan a largo plazo, que tiene por base la vacunación y como última finalidad la erradicación de la enferme-

dad. La vacunación, al conferir resistencia a los animales, disminuiría los efectos de la enfermedad y prepararía el terreno para la aplicación del procedimiento de prueba y sacrificio, con el fin de eliminar la infección residual.

EJECUCIÓN DEL PROGRAMA DE LUCHA EN LOS DIFERENTES ESTADOS

La mayor parte de los estados tiene actualmente en operación estos planes de lucha, con ligeras modificaciones, de acuerdo a las condiciones locales. Indemnización se paga solamente cuando el propietario adopta el Plan A, es decir cuando se compromete a eliminar de inmediato a los reaccionantes. Nueve estados de la Unión no pagan actualmente indemnización.

La vacunación con la cepa 19, está aumentando año a año en los Estados Unidos. En el año fiscal 1948 se han vacunado en forma oficial 1.159.327 terneras. La cantidad de vacuna que se produce por año es de 3 ½ a 4 millones de dosis. La vacunación de terneras fué declarada obligatoria en los estados de California y Connecticut. En muchos otros estados la vacunación de terneras es estimulada por el suministro gratuito de la vacuna y del servicio veterinario. En N. Jersey, por ejemplo, le cuesta al estado alrededor de US\$ 0,30 cada dosis de vacuna (vacuna liofilizada), siendo la remuneración del veterinario también por cuenta del estado, de US\$ 3 por la primera ternera vacunada de un establecimiento y de 0,50 por cada subsiguiente.

Ensayos experimentales con la cepa 19.— Daremos a conocer a continuación distintos ensayos con la cepa 19, tales como la vacunación intradérmica en terneras en comparación con la subcutánea, la vacunación intradérmica en adultos y el empleo de dosis centesimales de vacuna, revacunación y otras experiencias.

La vacunación intradérmica de terneras.— El Servicio Sanitario Animal de la Universidad de Maryland, ha conducido ensayos comparativos de vacunación de terneras por vía intradérmica y subcutánea. Aproximadamente 2.800 terneras han sido vacunadas desde 1940, de las cuales un tercio recibió la vacuna por vía subcutánea a la dosis de 5 c.c. y dos tercios por vía intradérmica, a la dosis de 0,5 c.c. El 97 % de las terneras vacunadas por vía intradérmica, a la edad de 4 a 6 meses, se ha vuelto negativo al examen serológico dentro del primer año de la vacunación, mientras el 86 % de las terneras de la misma edad, inoculadas por vía subcutánea, ha vuelto al título negativo. De las terneras vacunadas a la edad de 7 a 8 meses, el 93 % de las inoculadas intradérmicamente y el 73,9 % de las inoculadas por vía subcutánea, ha recuperado el estado negativo al cabo del año. La inmunidad desarrollada por ambos métodos, parece ser similar, a juzgar por los resultados obtenidos por la exposición natural en condiciones de campo.

El Bureau of Animal Industry ha hecho un estudio comparativo entre estos dos métodos de vacunación en terneras de un año. De un

total de 37 animales, 20 fueron vacunados con 0,2 c.c. por vía intradérmica, 4 con 0,2 c.c. por vía subcutánea y 13 con 5 c.c. subcutáneamente. El título máximo de aglutinación fué alcanzado entre 14 y 21 días, siendo el del grupo de vacunación subcutánea de 1/3.200 y el del grupo intradérmico de 1/6.400. A los 18 meses después de la vacunación, no hubo diferencia apreciable en el título aglutinante entre los dos grupos.

Una parte de los animales fué expuesta artificialmente con 26 millones de gérmenes y la otra con 15 millones, por vía conjuntival. En el grupo que recibió 26 millones de gérmenes, se produjo la infección en el 60 % de los animales vacunados con 5 c.c. por vía subcutánea, en el 50 % de los animales vacunados con 0,2 c.c. por vía intradérmica y en el 50 % de los vacunados con 0,2 c.c., por vía subcutánea. En el grupo expuesto a 15 millones, el 62 % de los vacunados subcutáneamente y el 64 % de los vacunados intradérmicamente, quedaron infectados. La dosis de 15 millones de gérmenes ha producido el 100 % de infección en los animales testigos.

Estos resultados indican que no hay una diferencia apreciable en la inmunidad conferida por ambos métodos de vacunación. En cuanto a la persistencia del título aglutinante, si bien los ensayos de la Universidad de Maryland dan un pequeño margen a favor de la inmunización intradérmica, los resultados obtenidos por el Bureau no evidencian ninguna ventaja de un método sobre el otro.

Ensayos en la vacunación de adultos, con la cepa 19.— Ensayos comparativos hechos por el Bureau of Animal Industry, entre la vacunación subcutánea e intradérmica, no muestran una diferencia apreciable en la declinación del título aglutinante en los dos grupos de vacas. En el establecimiento donde se han hecho estos ensayos, hubo una severa infección. De las 88 vacas vacunadas subcutáneamente, 70 tuvieron pariciones normales, mientras de las 34 del grupo intradérmico 29 parieron normalmente. La cepa 19 fué recuperada de un aborto en cada uno de los grupos. De tres vacas vacunadas subcutáneamente y de cuatro vacas del grupo intradérmico, se pudo recuperar la cepa 19 durante las pariciones. Algunas de estas vacas eliminaban la cepa 19 en la leche, pero por un período muy breve, ya que una semana después, al repetirse los cultivos, no se pudo recuperar el germen. Todas las vacas de las cuales se aisló la cepa 19, estaban preñadas cuando fueron vacunadas.

La Universidad de Maryland ha obtenido resultados semejantes en unos 2.500 animales adultos vacunados por ambos métodos. Al cabo del año de la vacunación, hubo un 10 % de animales que han vuelto al estado negativo, un 40 % con títulos de 1/100 o más, y el restante 50 % con títulos de 1/25 y 1/50. Después del año, los títulos de aglutinación tendían a bajar, pero de una manera muy lenta en ambos grupos.

En lugar de la dosis intradérmica de 0,5 c.c. que había empleado hasta ahora, la Universidad de Maryland está ensayando dosis 2,4 y 10

veces menores. Los primeros ensayos son favorables en cuanto a la rapidez de la desaparición del título aglutinante. En cuanto a la inmunidad, la dosis de 0,05 c.c. podría ser demasiado reducida, según la Dra. C. Cotton —a cuyo cargo están estas experiencias— y a juzgar por algunas fallas en la resistencia que observó en los animales vacunados.

Metzger, de la Universidad de Rutgers, N. Jersey, ha hecho un estudio comparativo entre dosis intradérmicas de 0,2 c.c. y 0,04 c.c., llegando a la conclusión de que no hay mayor diferencia en la resistencia a la infección entre los dos grupos vacunados y que —en cambio— la dosis menor favorece a que un mayor número de animales vuelva a un título negativo.

El Bureau of Animal Industry del estado de N. Jersey, basándose en las experiencias de Metzger, ha vacunado 116 animales adultos, negativos al examen serológico, con 0,04 c.c. de vacuna intradérmicamente. A los doce días de la vacunación, 92 animales daban reacción positiva, 17 dudosa y 7 negativa. A los tres meses de la vacunación, había solamente 13 con título positivo, 35 con dudoso y 75 con negativo. Estos animales fueron introducidos a un establecimiento infectado, no habiéndose comprobado —al estar a la información del Jefe de la División Tuberculosis y Brucelosis de N. Jersey— casos de brucelosis entre los vacunados.

La vacunación intradérmica de adultos con dosis centesimales, necesita más ensayos controlados para que se pueda sacar conclusiones.

Dentro del capítulo de la vacunación de adultos es interesante también resumir la experiencia hecha en el Del Norte County, en California.

LA EXPERIENCIA EN EL NORTE COUNTY, CALIFORNIA

En la conferencia de Investigadores sobre Brucelosis Bovina, realizada en noviembre de 1948, en Chicago, el Dr. C. M. Haring dió cuenta de la experiencia recogida en la lucha contra la enfermedad de Bang, en un distrito de California, llamado Del Norte County. En 1930 a 1935 procuraron eliminar la infección de Del Norte County, por el método de prueba y sacrificio. Después de tres años lograron reducir el índice de infección del 16 al 12 %, pero en 1935 el número de animales infectados aumentó otra vez a 14 %, lo que indujo a la Universidad de California a abandonar ese plan. En 1939 iniciaron un programa de vacunación con la cepa 19.

De 2.675 vacas lecheras, repartidas por 47 establecimientos, había entonces un 46,9 % de reaccionante. En 14 de estos establecimientos se vacunaron tanto los animales adultos como los terneros, en 16 solamente las terneras, y en 17 no se usó vacuna del todo, porque contenían pocos reaccionantes, o porque estaban libres de infección. Donde se cumplió la vacunación de adultos, ésta fué practicada una sola vez y luego se siguió vacunando solamente las terneras todos los años.

Los resultados más satisfactorios fueron obtenidos en los establecimientos donde se practicó la vacunación de los adultos junto con la de las terneras. Resultados menos satisfactorios se obtuvo, donde se empleó la vacunación de terneros solamente. Los establecimientos donde la vacuna no fué empleada, se llevaron la peor parte, habiéndose propagado la infección a estas haciendas. A los cuatro años de iniciar la vacunación, el índice de reaccionantes fué reducido de 46,9 % a 9,7 % y actualmente es de 7 %.

Según el Dr. Haring, los resultados obtenidos en el Del Norte County fueron los que indujeron a las cámaras legislativas de California a declarar obligatoria la vacunación de las terneras con la cepa 19, en ese estado.

REVACUNACIÓN

La resistencia conferida por la cepa 19 disminuye gradualmente. Experiencias llevadas a cabo por el Bureau de Industria Animal, demuestran que la vacunación de terneras con la cepa 19, les confiere una inmunidad por 4-5 pariciones. Los animales en los cuales fué efectuada esta experiencia, fueron mantenidos aislados de toda infección brucélica hasta el momento de la exposición artificial. Experiencias hechas por otras estaciones experimentales, indicarían, sin embargo, que esta resistencia ya es notablemente disminuída a la tercera parición.

La duración de la inmunidad depende de varios factores, tales como grado y virulencia de la exposición y un factor individual de cada animal vacunado.

Para reforzar la inmunidad de la cepa 19, se ha pensado, en primer término, en la revacunación con la misma vacuna, como se hace en la profilaxis de otras enfermedades infecciosas. Los estudios sobre la revacunación tienen por objetivo principal determinar el curso de la curva de aglutinación, y en especial modo saber si un animal adulto que fué vacunado cuando ternero, tenderá —al ser revacunado— a conservar el título aglutinante por largo tiempo, como un adulto que es sometido a la vacunación por primera vez, o si —por el contrario— ese título declinará rápidamente.

Según una comunicación de la Dra. C. Cotton a la Conferencia sobre Investigaciones en Brucelosis Bovina realizada en Chicago en noviembre de 1948, los animales vacunados cuando terneros y revacunados a la edad de dos o tres años, producen un título de 1/500 o más. Estos títulos, sin embargo, desaparecerían en el curso de tres meses. Cuando se emplean dosis reducidas para la revacunación, los animales igualmente alcanzan títulos altos, pero se vuelven negativos más rápidamente, frecuentemente en menos de un mes.

Cuando se vacunan animales adultos y se revacunan de uno a cuatro años más tarde, se obtiene una amplia gama de reacciones a la segunda vacunación. Los títulos varían en gran escala, pero generalmente hay tendencia a volver a los títulos previos a la revacunación.

Los resultados obtenidos por el Bureau de Industria Animal y comunicados por el Dr. C. A. Manthei a la misma conferencia, son un poco diferentes. 85 animales vacunados a la edad entre 6 y 7 meses fueron revacunados cuando tenían entre 14 ½ a 36 meses. La reacción más alta fué alcanzada a los 18 días de la revacunación, siendo su promedio de 1/400. A los 7 ½ meses de la revacunación, los animales que previamente a la segunda vacunación tenían títulos negativos o un título de 1/100, han regresado a un promedio de 1/100. Los que tenían títulos de 1/25 y 1/50 previos a la segunda vacunación, han regresado a un título promedio de 1/50. Se nota también una diferencia en la declinación del título aglutinante, según la edad de los animales, cuando se practica la revacunación. Los animales de 14 ½ a 24 meses de edad, han regresado a una reacción promedial de 1/50, a los 7 meses después de la segunda vacunación, mientras los animales entre 24 a 36 meses de edad, han regresado a un título promedio de 1/200, en el mismo período de tiempo.

El jefe del Bureau de Industria Animal, Dr. B. T. Simms, dió a conocer en su informe anual de 1948, experiencias de vacunación en terneras de 10 a 100 días de edad y revacunadas a la edad de un año. Estos ensayos tenían por objeto duplicar la observación de que la vacunación de terneras nacidas de vacas infectadas, ocasiona títulos más bajos y menos persistentes que cuando se vacunan terneras de madres no infectadas. Se emplearon 35 terneras. El título máximo de 1/4.000 se había producido entre los 14 y 21 días de la revacunación y el título promedio a los 18 meses de la segunda vacunación era de 1/70. Por la curva de aglutinación y por la prueba de exposición artificial, Simms concluye que no hay ventaja en este procedimiento, ya que la resistencia adquirida no es mayor de la que adquieren los terneros con una sola vacunación. Por este procedimiento los títulos de aglutinación tienden a mantenerse por un tiempo más largo, lo que implica que la primera vacunación entre la edad de 10 a 100 días, no duplica las condiciones de exposición que reciben las terneras de sus madres infectadas, a juzgar por la aglutinación.

En la Universidad de Wisconsin están trabajando sobre el mismo problema. Las terneras de la experiencia fueron vacunadas a los seis meses de edad y divididas luego en tres grupos. Los animales del primer grupo fueron revacunados a los doce meses de edad, los del segundo grupo a los dieciocho meses y los del tercer grupo no fueron revacunados.

De las averiguaciones hechas hasta ahora, resulta que los títulos de la revacunación desaparecen con bastante rapidez (a los dos años la mayor parte son negativos, manteniéndose pocos con título positivo) y que no hay mayor diferencia en el comportamiento entre el grupo revacunado a los 12 meses y el revacunado a los 18 meses, con respecto a las aglutinaciones. Estos animales van a ser expuestos a la infección durante la tercera preñez, para conocer en qué grado se benefician con la revacunación.

OTRAS EXPERIENCIAS CON LA VACUNA A CEPA 19

Gilman, de la Cornell University, estudia la posibilidad de reactivar la inmunidad originada por la cepa 19, usando repetidas inoculaciones de suspensiones muertas de *Brucella*. Un grupo de terneras que fué vacunado con la cepa 19, va a ser inoculado periódicamente con suspensiones muertas de *Brucella abortus*, durante la segunda y ulteriores preñeces. Los animales estarán expuestos a la infección natural.

El Dr. Wilson, de la Universidad de Wisconsin, hace un estudio comparativo entre el poder inmunógeno de la cepa 19 cultivada en medio artificial (agar papa) y la cepa 19 cultivada en medio vivo, en embrión de pollo. Inocula cepa 19 en el saco amniótico de embrión de pollo de diez días y cosecha la membrana corioalantoidiana cuatro días después. Según una comunicación personal, cobayos inoculados con la vacuna común de cepa 19 (cepa 19 cultivada en agar papa y suspendida en solución fisiológica) y expuestos a las seis semanas a 30.000 gérmenes de una cepa virulenta de *Br. abortus* (cepa 2.308), resisten a la infección en un 30 %, mientras los cobayos vacunados con la cepa 19 pasada por embrión de pollo, resisten a la infección en un 70 %.

IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA 19 POR LA ACCIÓN BACTERIOSTÁTICA DE AZUL DE TIONINA

En 1944, McLeod, en Inglaterra, ha observado que la cepa 19 es por lo menos ocho veces más sensible a la acción bacteriostática de azul de tionina que las 15 cepas virulentas de *Br. abortus* que él ha empleado.

H. B. Levine y J. B. Wilson, de la Universidad de Wisconsin, modificaron y standardizaron ese método para poder distinguir la cepa 19 en animales vacunados de otras cepas de *Brucella*. Con el empleo de 0,4 mg. del colorante (de origen británico: British Drug Houses, Londres) por un litro de Bacto-triptosa agar quedaron inhibidos 31 cultivos de *Br. abortus*, cepa 19, de distintos orígenes, mientras 66 otras cepas de *Br. abortus*, de distinto grado de virulencia, se desarrollaron bien, aun en el caso de emplear un 50 % más de azul de tionina que en el caso anterior.

La cepa 19 pasada por bovinos, suinos o embrión de pollo, como asimismo las formas rugosas, demuestran la misma sensibilidad frente al azul de tionina.

CONTROL DE LA VACUNA CEPA 19

Como todas las vacunas a gérmenes vivos, la vacuna a cepa 19 es un producto frágil. Si no se toman las precauciones debidas para conservar la viabilidad de los gérmenes que integran la vacuna, ésta sufre

enormemente en su valor como agente inmunizante. Muchos fracasos de la vacunación con la cepa 19 son atribuidos a que éstas hayan sido hechas con un producto deteriorado. Para obviar estos inconvenientes, el Bureau of Animal Industry ha dado instrucciones y ha reglamentado la elaboración y expendio de la vacuna.

Hay dos factores principales que conspiran contra la viabilidad de la vacuna; ellos son el pH del líquido de suspensión y la temperatura de conservación. En una escala de pH entre 3,8 a 8,0 se nota una definitiva aceleración del índice de mortalidad de los gérmenes en las concentraciones de iones de hidrógenos por debajo de 5,9 o por encima de 6,8. Los valores de pH entre 6,3 a 6,8 se han mostrado como los más apropiados para mantener la vida de los gérmenes. La exposición a temperaturas altas es otro factor de la desvalorización rápida de la vacuna. Ch. Mitchell y T. Moore han hecho contajes de gérmenes viables, en una vacuna conservada en la heladera y otra de la misma serie que fué transportada por tren durante trece horas, en un día en el cual se registró una temperatura máxima de 30,5 grados centígrados. Mientras la vacuna en la heladera contenía 12 millones de gérmenes por 1 c.c., la transportada por tren tenía 12 mil solamente.

La carta circular 2.301 del Bureau of Animal Industry, del 3 de marzo de 1941, establece que en los prospectos y en las etiquetas de las casas comerciales, debe indicarse en un lugar prominente que la vacuna debe conservarse a una temperatura no mayor de 45° F. (7,2° C.) y que la temperatura de transporte no debe exceder los 55° F. (12,7° C.). Se establece también que los envases deben ser de dosis únicas, conteniendo 6 c.c. de vacuna, para asegurar la inyección de una dosis completa de 5 c.c. La eliminación de envases con dosis múltiples tiene por finalidad evitar las contaminaciones que pueden originarse cuando se emplean parcialmente esos envases. Todas las botellas y frascos para la elaboración y expendio de la vacuna, deben ser de vidrio resistente y libre de álcali. No se debe emplear envases de "vidrio blando", pues éste es de una estabilidad variable, altamente alcalino y perjudicial para *Br. abortus*. "La disolución de la substancia del vidrio es un proceso continuo que afecta materialmente el pH de la vacuna. Cuanto más tiempo se mantiene la vacuna en esa clase de envases, tanto más se degrada la vacuna por el álcali originado por el proceso de disociación".

El Bureau asimismo ha instruído que la suspensión de la cepa debe ser hecha con solución fisiológica "bufferada" a pH 6,4.

Desde el 21 de agosto de 1944 (carta circular 2.681) la validez de la vacuna quedó limitada a tres meses desde la fecha de la producción. No hay un límite superior en el número de gérmenes viables que debe contener la vacuna. El límite mínimo establecido es (carta circular N° 2.723, del 28 de febrero, 1945) de 10 mil millones de gérmenes viables por 1 c.c., cuando la vacuna es enviada al contralor, antes de ser librada a la venta y de no menos de 5 mil millones por 1 c.c. hasta la fecha de la expiración.

Inspectores del Bureau retiran muestras de cada serie nueva de la vacuna de los laboratorios comerciales y las envían a la Animal Disease Station de Beltsville, Md., donde son controladas. En la Animal Disease Station las vacunas son sometidas a las siguientes pruebas: 1) pureza, 2) pH y 3) concentración microbiana. Según el Dr. E. L. Love, técnico encargado del contralor de la vacuna, las muestras son conservadas y a los tres meses de su producción son sometidas a una prueba de viabilidad. Los resultados de las tres pruebas arriba mencionadas son informadas a los cuatro días de recibidas las muestras y en el caso de que la prueba de pureza tenga que ser repetida, a los ocho días. No se practica actualmente un control de disociación microbiana en esas muestras, ya que desde 1941 el Bureau remite a los laboratorios comerciales, cada dos meses, un subcultivo fresco de la cepa 19, controlado en cuanto a disociación.

Varios de los grandes laboratorios comerciales estadounidenses, elaboran en la actualidad únicamente vacuna a cepa 19 liofilizada (deshidratada bajo congelación y alto vacío). Este producto significa un gran adelanto con respecto a la vacuna líquida, pues es mucho más resistente a los cambios de temperatura y se caracteriza por una prolongada estabilidad. La vacuna liofilizada conservada a temperatura de heladera, mantiene su viabilidad por un término no menor de un año. El proceso de la liofilización acarrea una mortalidad grande de gérmenes —término medio 50 %—, pero luego la viabilidad de los gérmenes es muy escasamente afectada en el término de un año. La pérdida por el proceso de la desecación se compensa, aumentando la densidad inicial de la vacuna.

Varios estados adquieren solamente vacuna liofilizada para el uso oficial en sus planes de lucha.

OTRAS VACUNAS EN ESTUDIO

La cepa 19 es una gran arma de lucha contra la brucelosis y es la mejor vacuna de que se dispone hoy en día, pero no es de ninguna manera un agente inmunógeno ideal. La inmunidad que origina no es absoluta y puede ser vencida ya sea por infecciones masivas o muy virulentas. El inconveniente más grande, sin embargo, es que los animales a consecuencia de la vacunación se vuelven reaccionantes a la sueroaglutinación por un período de tiempo más o menos largo, según la edad que tengan en el momento de la inmunización.

El interés de encontrar un agente inmunógeno que no tenga los inconvenientes de la vacuna a cepa 19, es muy grande entre los investigadores que trabajan en el problema de la brucelosis. Varios de estos productos están actualmente en ensayo. Pasaremos revista a algunos de ellos.

LA VACUNA MUCOIDE DE HUDDLESON

En 1947, Huddleson dió a conocer los resultados obtenidos por él en la inmunización de cobayos con distintas fases mucoides de *Brucella*.

En aquel entonces, Huddleson había reconocido en la disociación del género *Brucella*, tres formas mucoides obtenidas de *Br. abortus*, cuatro formas mucoides de *Br. suis* y dos de *Br. melitensis*. Las formas mucoides, en estado puro, inoculadas a cobayos en cantidades de 5 mil a 10 mil millones, no originaban una infección progresiva. A las cuatro semanas de la inoculación, no se podía recuperar el germen de los tejidos del cobayo. Las colonias mucoides de *Brucella* inoculadas a animales, producen títulos bajos y poco persistentes en la suerorreacción con un antígeno liso *S* de *Brucella*.

Huddleson ha ensayado las distintas formas de colonias mucoides como agentes inmunógenos en cobayos y llegó a la conclusión de que una de las formas llamada por él fase 2 de *Br. suis*, representaba un interés especial en este aspecto. Cobayos en grupos de diez fueron inoculados con 1 mg. de peso seco de gérmenes por vía subcutánea o intradérmica y cuatro semanas después se les expuso a una cepa virulenta de cada una de las tres especies de *Brucella*. De 70 cobayos inoculados con la variante mucoide, fase 2 de *Br. suis*, 63 resistieron la infección ulterior con *Br. suis* virulenta, mientras que, de los 70 testigos, solamente 5 quedaron libres de infección. De 30 cobayos vacunados de la misma manera y expuestos a 100.000 gérmenes de *Br. abortus*, solamente 3 se infectaron, mientras del mismo número de testigos, 25 quedaron infectados. De 30 cobayos vacunados y expuestos a 100.000 gérmenes de *Br. melitensis*, 4 no resistieron la infección, mientras la totalidad de los 30 testigos adquirieron la infección.

La inactivación por el empleo de 0,25 % de formalina o por la luz ultravioleta (por el método de Oppenheimer y Levinson) no destruye, aunque disminuye la propiedad inmunógena de la suspensión microbiana de esta variante de *Brucella*, por lo que Huddleson concluye que la viabilidad de los gérmenes no es un factor indispensable para la inmunización.

Es interesante también el hecho de que los cobayos vacunados que han resistido la infección daban reacción negativa a la sueroaglutinación con antígeno *S*, después de la exposición con cultivos virulentos de colonias *S* de *Brucella*. Este investigador también encuentra que el suero de los cobayos vacunados, en combinación con el complemento, tiene una propiedad inhibidora sobre la *Brucella* *in vitro*, aun en diluciones de 1/20.000.

Huddleson, en base de estos ensayos, llegó a la conclusión de que la fase 2 de la variante *M* de *Br. suis*, no produce aglutininas en cobayos para el tipo usual del antígeno brucélico, y de que es capaz de proteger a esos animales contra las tres especies de *Brucella*.

Los resultados favorables obtenidos en cobayos, determinaron a Huddleson a ensayar el valor protectivo de la variante mucoide de Br. suis en bovinos. El primer paso fué conocer si la variante mucoide inoculada en dosis grandes, podría o no provocar infección y abortos. Siete vaquillonas fueron inoculadas con 2,5 mgs. de peso seco de gérmenes, conteniendo unos 100 mil millones de gérmenes vivos y otro tanto de muertos. Algunas de estas vaquillonas fueron inoculadas tanto antes como después de estar preñadas, y otras recibieron una sola inyección durante los primeros cinco meses de la preñez. Todas tuvieron partos normales y los exámenes bacteriológicos de la leche y de las placentas dieron resultados negativos. Dentro de los tres meses después de la inoculación, todos los animales daban reacción negativa a la sueroaglutinación. El título máximo encontrado antes de ese período era de 1/100.

En noviembre de 1948, Huddleson y Bennett dieron a conocer los ensayos hechos con la vacuna mucoide en 22 establecimientos, donde la infección brucélica era de reciente fecha. En esos rodeos no se han dejado testigos y las conclusiones de Huddleson se basan sobre la protección alcanzada en los animales vacunados, que de otra manera —al no ser vacunados— se hubieran probablemente infectado, dado el hecho de que las infecciones recientes se difunden con rapidez. Según el informe de Huddleson, había en los 22 establecimientos un total de 1.127 animales, de los cuales 772 eran negativas, 197 reaccionantes positivos y 158 sospechosos. De los 772 negativos que se vacunaron, 684 permanecieron negativos durante los catorce meses de observación, 23 dieron reacciones positivas, 25 reacciones sospechosas y 40 murieron o fueron vendidos.

La mayor parte de las reacciones positivas entre los animales vacunados ocurrieron en los tres a cuatro meses después de la vacunación, lo que no excluye la posibilidad de que un número de esas vaquillonas se encontraban en período de incubación de la brucelosis cuando fueron vacunadas. En el período de tiempo arriba mencionado, 33 de los vacunados abortaron, pero solamente 9 de ellos dieron reacciones positivas a la suerorreacción de la brucelosis. Cultivos hechos de catorce fetos de los animales negativos que abortaron, no revelaron la presencia de *Brucella*.

En cuanto a la posibilidad de la reversión de la variante mucoide a una fase lisa, virulenta, Huddleson sostiene que durante los cinco años de estudios de la variante, él no pudo observar esa reversión, ya sea por pasaje en medios de cultivo o por animales de experiencia. La única disociación que se observa en esa cepa es una fase que, aunque morfológicamente se parece a *S* (*S* like o *S*¹ de Huddleson) no es virulenta y es aglutinada por la acriflavina. (Ver más adelante disociación microbiana.)

En la conferencia anual de American Veterinary Medical Association, de julio de 1949, Huddleson dió a conocer algunos ensayos nuevos, efectuados en cuatro establecimientos chicos.

En un establecimiento con 16 animales adultos, 1 de los cuales eran reaccionante, se vacunaron 5 y se dejaron 6 como testigos. Al año, 3 de los testigos se infectaron, mientras todos los vacunados resistieron la infección. En el segundo establecimiento infectado, fueron introducidas 5 vaquillonas preñadas vacunadas y 5 sin vacunar. Al año, dos testigos acusaron reacción positiva y dos sospechosa, mientras que las vacunadas se mantuvieron negativas. En el tercer establecimiento se procedió de una manera similar, resultando que una sobre las siete vaquillonas vacunadas, acusó una reacción sospechosa y tres sobre cuatro testigos, reacción positiva al término de un año. En el cuarto establecimiento, 218 animales fueron vacunados y 88 dejados como testigos. A los diez meses se encontraron sobre 88 testigos dos reaccionantes positivos y dos sospechosos, mientras todos los vacunados se mantuvieron negativos.

Huddleson, refiriéndose a estos ensayos expresó, que si bien el número de animales empleados era reducido para sacar conclusiones definitivas, los resultados obtenidos en estos establecimientos son, no obstante, sugestivos y dignos de tomarse en cuenta.

La variante mucoide para la elaboración de la vacuna es actualmente cultivada en el siguiente medio de cultivo: caldo triptosa, 1.000 c.c.; ClNa, 0,5 %; tiamina, 0,5 mg. %; glucosa, 2 %. Se filtra a través de papel filtro y se ajusta el pH a 6,7 con H^3PO^4 al 20 %.

La incubación se hace sobre una agitadora a 37° durante 72 horas. Durante todo el período de incubación, el balón con el medio de cultivo recibe un flujo constante de oxígeno, a razón de 25 c.c. por minuto. El rendimiento que se obtiene es de 2 ½ a 3 mgs. de peso seco de gérmenes por 1 c.c. de medio. Desde que la viabilidad de los gérmenes no tendría mayor importancia en la producción de la inmunidad, las dosis de la vacuna son calculadas también sobre la base de peso seco de los gérmenes.

Mientras no existan ensayos controlados sobre la eficacia de la vacuna mucoide, su uso en gran escala no es permitido por el Bureau of Animal Industry. La única excepción la constituye el estado de Michigan (el Laboratorio de Huddleson se encuentra en ese estado). donde la vacuna es distribuida a los veterinarios. Según informó Huddleson a la Conferencia sobre la Investigación en Brucelosis Bovina (Chicago, noviembre de 1948), se había vacunado en Michigan unos 49.000 animales y un poco más de 1.000 en otros estados, con permiso especial del Bureau of Animal Industry.

Debido al interés despertado por la vacuna mucoide, varias universidades (la de Ohio, California, Wisconsin e Illinois) llevan a cabo experiencias bien controladas sobre la eficacia y otros aspectos de este producto. La mayor parte de estos ensayos se hacen comparativamente con la cepa 19. Una experiencia en mayor escala —cuyos resultados se conocerán en el curso de este año— se está realizando actualmente en West Virginia con la cooperación de cinco estados del Este de EE. UU.

Todos los datos obtenidos hasta ahora confirman los de Huddleson sobre la poca duración (60 a 90 días) y los bajos títulos de aglutinación que origina la vacuna.

En cuanto a la eficacia de la vacuna, desde el punto de vista de inmunidad, habrá que aguardar los resultados de las experiencias controladas, que están en marcha.

BACTERINAS

Las vacunas a gérmenes muertos, han dado resultados poco satisfactorios en las manos de muchos investigadores, pero experiencias ulteriores, han demostrado que el factor principal en estos fracasos es la manera de inactivar las vacunas. En la revisión de este problema se ha procurado elaborar métodos por los cuales al matar los gérmenes quedarían —sin embargo— intactos los antígenos inmunógenos.

En 1943, Huddleson ha demostrado que se puede obtener una sustancia inmunógena hidrosoluble de células brucélicas trituradas. El principio inmunizante era muy lábil a la acción de agentes físicos y químicos, resistiendo sin embargo al éter etílico.

Retomando estas experiencias, Live, Sperling y Stubbs (Universidad de Pennsylvania) han logrado inmunizar con éxito cobayos con suspensiones de *Brucella* muertas por éter o con gérmenes desintegrados por ondas sónicas. La inmunización con gérmenes muertos por éter, requiere una gran concentración microbiana. Para lograr una resistencia activa, estos experimentadores han usado dosis mayores a 150 mil millones de células microbianas por cobayo. Al mes o seis semanas después de la inyección de la vacuna, los cobayos eran negativos a la prueba de aglutinación. Asimismo se ha comprobado que los animales vacunados conservan la reacción negativa un mes después de ser expuestos a cepas virulentas. Los extractos sónicos provocan una aglutinación baja y no se nota aumento del título aglutinante después de la exposición a la infección.

Las experiencias ulteriores de Live han demostrado, sin embargo, que la duración de la inmunidad con esta vacuna es muy limitada, no yendo más allá de dos a cuatro meses. Para mejorar este inconveniente, Live ha ensayado últimamente la incorporación en esta vacuna de sustancias coadyuvantes que retardan la absorción de los gérmenes y prolongan el estímulo de los mismos. Uno de los coadyuvantes ensayados es la "falba" (marca de fábrica de una sustancia parecida a la lanolina, producido por Pfaltz y Bauer, Inc., N. York) en combinación con un aceite mineral (Atreol N° 9 de Atlantic Refining Co.) y el otro, el alumbre (precipitación por alumbre).

En un estudio comparativo entre la vacuna sin y con coadyuvante, la que dió mejor resultado es la que contenía falba con aceite mineral.

A los diez meses de la vacunación, el 80 % de los cobayos inoculados con la vacuna con falba, más aceite mineral, resistieron la infección

artificial, mientras que los inoculados con vacuna precipitada con alumbre resistió el 50 %, y de los con vacuna en suspensión salina, el 33,4 %.

El agregado de coadyuvantes es causa, por otra parte, del desarrollo de títulos aglutinantes más altos y de una duración más larga. Cobayos inoculados con la vacuna a falba y aceite mineral, dieron —en uno de los ensayos— a los dos meses, un título medio de 1/1.500 y a los diez meses todavía mantenían un título término medio de 1/220. La vacuna precipitada con alumbre provocó —en uno de los ensayos— un título promedio de 1/70 a los dos meses, y en otro ensayo a los seis y medio meses, un título promedio de 1/20, desapareciendo completamente a los diez meses. La vacuna en suspensión salina, como ya dijimos, origina títulos bajos y de muy poca duración.

Durante mi estada en la Universidad de Pennsylvania, Live estaba realizando ensayos con la vacuna a gérmenes muertos por éter y suspendidos en falba y aceite mineral, en bovinos del establecimiento lechero de la Universidad. Los animales negativos adultos fueron divididos en tres grupos, un tercio recibió la cepa 19, un tercio la bacterina (300 mil millones de células bacterianas por dosis) y el tercio restante quedó como testigo. En el grupo inoculado con la cepa 19, había títulos aglutinantes mayores que en el grupo vacunado con la bacterina. Pero mientras en el grupo vacunado con la cepa 19 los títulos empezaron a declinar, los del grupo con la bacterina se sostenían y aun seguían aumentando, debido probablemente al estímulo de la continua liberación de gérmenes en el organismo animal.

Muchas de las vacas inyectadas con la bacterina dan una reacción de anillo y de suerolactoaglutinación positiva. Algunas, sin embargo, a pesar de tener títulos de suero sanguíneo de 1/200 a 1/400, acusan reacciones negativas a las pruebas mencionadas.

Elberg (Universidad de California) está ensayando en cobayos una bacterina a gérmenes muertos por mostaza líquida (sulfuro B₁-B¹ diclorodietílico) usando como coadyuvante una mezcla de un derivado de colesterol, aceite de maní y cera ("Pendil" de Endo Products, N. York). El mismo investigador está llevando a cabo también ensayos de protección de ratones con células brucelares desecadas, de acuerdo al método desarrollado por Baker y colaboradores para *P. pestis*. (Agregar acetona enfriada a —70° C. a la suspensión microbiana en agua destilada y centrifugar, repetir cuatro veces el mismo proceso y luego desecar al vacío sobre ácido sulfúrico.)

Ninguno de estos dos últimos productos ha dado hasta ahora resultados satisfactorios.

SOBRE LA EXPOSICIÓN ARTIFICIAL

En todos los ensayos de inmunidad se plantea el problema de la cepa a emplearse, dosis y vía de exposición. Cualquiera de estos factores puede hacer variar los resultados de una experiencia y puede

llevar a errores de interpretación en la evaluación de un agente inmunógeno. Este es un problema que preocupa vivamente a los investigadores en la brucelosis, sin que hasta ahora se haya podido establecer una técnica standard que dé resultados uniformes. Muchas veces los resultados obtenidos por distintos investigadores son difíciles de comparar entre sí, por el empleo de cepas de exposición de una virulencia distinta y de dosis diferentes. Pero aun en el caso de emplearse la misma cepa y la misma dosis, los resultados no siempre son uniformes. La vía de introducción del germen tampoco está resuelta. Si bien casi todos los investigadores en brucelosis bovina usan la vía conjuntival, posiblemente por el hecho de que más se asemeje a la infección natural, no hay sin embargo seguridad de que éste sea el más apropiado, ya que parte de la dosis inoculada puede perderse. A los factores arriba mencionados, hay que agregar el de la edad y de la susceptibilidad individual de cada animal.

Un estudio interesante con respecto a la influencia de la dosis de exposición, fué realizado en la Animal Disease Station del Bureau en Beltsville, en animales vacunados con la cepa 19 y animales testigos susceptibles. Según el informe de Manthei, se han empleado dosis que varían de 100 millones a 370 mil gérmenes, de una cepa de Br. Abortus, muy virulenta, aerógena, denominada 2.308. (Con el fin de uniformar resultados, esta cepa es de uso casi general en las estaciones experimentales de EE. UU.) Empleando una dosis de 15 millones de células microbianas, el 100 % de los testigos quedaron infectados, mientras el 72 % de los vacunados con la cepa 19 adquirieron la infección.

Empleando 740 mil gérmenes de la cepa 2.308, el 88,8 % de los testigos contra el 22,2 % de los vacunados se infectaron.

Con 370 mil gérmenes de la misma cepa, el 77,7 % de los testigos y ninguno de los vacunados adquirieron la infección.

En otra experiencia, empleando siempre la misma cepa, se obtuvo 100 % de infección tanto en los testigos como con los vacunados, inoculando una dosis de 100 millones de gérmenes. Con 26 millones de gérmenes se obtuvo 91,6 % de infección en los testigos, y 52,3 % en los vacunados.

Estas experiencias demuestran la importancia de la dosis a emplearse en la evaluación de un agente inmunógeno, como asimismo que la inmunidad conferida por la cepa 19 puede ser vencida cuando los animales vacunados son expuestos a dosis masivas de una cepa virulenta.

•CONTROL DE LA BRUCELOSIS SUINA

La brucelosis suina si bien no tiene la trascendencia económica de la brucelosis bovina, es de mucha importancia desde el punto de vista de salud pública.

No hay hasta el presente un plan del gobierno federal americano de erradicación de la brucelosis suina. Las dificultades del diagnóstico

de la infección brucélica en el cerdo y los resultados poco favorables obtenidos con distintos agentes de inmunización, no han permitido establecer un plan de lucha semejante al de la brucelosis bovina.

En los últimos años, sin embargo, los trabajos hechos por la Universidad de California y la de Purdue (Indiana), han demostrado que la brucelosis suina puede ser eliminada de un establecimiento, en un breve plazo, en el término de un año más o menos.

Los métodos que elaboraron Camerón y colaboradores en California, y Hutchings y colaboradores en Indiana, son parecidos. Consisten ellos en considerar todo el rodeo donde se han encontrado animales reaccionante como infectado y en aislar los lechones recién destetados (se recomienda destetarlos a las ocho semanas) con reacción negativa sobre un terreno virgen. Los lechones son periódicamente sometidos a la sueroaglutinación hasta la cubrición y la primera preñez, eliminándose los reaccionantes.

En cuanto la progenie pueda sustituir al rodeo original infectado, éste es eliminado, debiéndose tomar todas las medidas de higiene y de desinfección, donde se encontraban los animales infectados. Este método no significa mayor sacrificio económico, pues la producción no es interrumpida aunque los resultados más favorables se obtienen con la eliminación más rápida del rodeo original infectado. El inconveniente más grande de este procedimiento son las estrictas medidas de aislamiento que hay que mantener entre el lote infectado y el libre. Este procedimiento se basa en el hecho de que pocos lechones recién destetados —aunque susceptibles— estén infectados y de que la cadena de infección de los cerdos infectados a las lechonas preñadas queda rota, como asimismo la reinfección de los animales adultos por las lechonas que abortan.

El estado de California ha adoptado un programa oficial de erradicación de la brucelosis suina, basado en un procedimiento similar al expuesto y otorgando —como estímulo— un certificado de “libre de brucelosis suina” a todo criador de cerdos que ha logrado eliminar la infección.

La Conferencia de Investigadores en Brucelosis Suina, realizada en la Universidad de Purdue, Lafayette, Indiana, en abril de 1949, ha resuelto que, en vista de que la profesión veterinaria posee actualmente los suficientes conocimientos y armas para encarar la lucha contra la brucelosis suina, se recomienda a la U. S. Livestock Sanitary Association que adopte un plan general para el control de esta enfermedad.

LA VACUNACIÓN DE SUINOS

La vacunación contra la brucelosis suina ha sido intentada por distintos investigadores. En 1945, Holm y colaboradores (Estación Experimental de Idaho) dieron a conocer un informe según el cual la cepa 19 daría una buena protección contra la brucelosis suina. Las cerdas vacunadas y luego expuestas a una dosis masiva (10 mil millones de gér-

menes) de una cepa virulenta, han tenido pariciones normales en un 88,8 %, mientras solamente el 22 % de los testigos parieron normalmente. El estudio bacteriológico de estos autores se ha limitado solamente al examen de los fetos. Estos resultados aparentemente promisorios, no han podido ser confirmados por otros autores. Manthei (Bureau of Animal Industry) inoculó la cepa 19 a quince lechonas de cuatro a cinco meses de edad y seis meses después, estando éstas preñadas, las expuso a una cepa virulenta de Br. suis, junto con once testigos. Por el estudio bacteriológico se ha comprobado que el 80 % de los vacunados y el 81,8 % de los testigos quedaron infectados.

Kernkamp y Roepke (Universidad de Minnesota) han hecho ensayos de campo con la cepa 19, llegando a la conclusión de que esta vacuna no tiene poder protector para los cerdos.

Cameron (Universidad de California) está tratando actualmente de adaptar la cepa 19 al cerdo, por pasaje en serie en esta especie, para luego ensayarla como agente inmunógeno.

Manthei (Bureau of Animal Industry) ha ensayado una cepa atenuada de Br. suis (King N^o 8) como agente protector en lechones. A los nueve meses después de la vacunación, estando los animales preñados, se les administró una cepa virulenta de Br. suis. Durante la parición se comprobó que el 20,8 % de las vacunadas y el 66 % de los testigos estaban infectados. La persistencia del título aglutinante y de la bacteriemia después de la exposición, era considerablemente menor en el grupo vacunado. Ensayos ulteriores con la misma vacuna, tienden —sin embargo— a demostrar que la protección conferida es de una duración limitada. Animales a los cuales fué administrado el virus de prueba a los dos años de la vacunación, quedaron infectados en un 96 %, mientras los testigos no vacunados, en un 100 %. Por otra parte no hay tampoco pruebas de que la cepa King 8 sea estable en su virulencia atenuada, por lo que su empleo podría ser peligroso.

En la Conferencia de Investigadores sobre Brucelosis Suina, se ha acordado emprender ensayos sobre la eficacia de la vacuna mucoide de Huddleson en la brucelosis suina. Estas experiencias se llevarán a cabo simultáneamente en California, Beltsville, Md., y en la Universidad de Purdue, Indiana.

Con respecto a la inmunidad antibrucélica en los suinos, es conveniente recordar aquí las experiencias de Hutchings y colaboradores (Universidad de Purdue, Indiana) sobre infección y reinfección en cerdos, que demuestran que una primera infección, tanto natural como artificial, no da la suficiente protección para evitar una reinfección, pero sí puede conferir una apreciable resistencia contra el aborto.

TERAPÉUTICA

Diferentes agentes terapéuticos, compuestos químicos y antibióticos, o la combinación de ambos, han sido ensayados en estos últimos años, tanto contra la brucelosis humana como animal.

Por la asociación de estreptomycin y sulfadiazina, se ha podido modificar, en un plazo breve, el cuadro clínico de la brucelosis aguda y subaguda en la especie humana. Si bien se observa una mejoría, la infección brucélica no es completamente eliminada.

En la especie bovina, tratando con estreptomycin-sulfadiazina varias vacas que eliminaban *Brucella* por la leche, se ha notado que mientras duraba el tratamiento no se podía recuperar el germen de la leche, pero que éste reaparecía al poco tiempo de dejar de suministrar el medicamento a los animales.

En la Universidad de Purdue se han conducido ensayos en cerdos con la combinación de estreptomycin y sulfadiazina, llegándose a la conclusión que si bien la infección parece disminuir, como lo demuestra el menor número de aislamientos de *Brucella* en los órganos de los animales tratados en comparación con los testigos, la completa curación no es frecuente.

Los pocos ensayos hechos con aureomicina, no han dado hasta el presente resultados satisfactorios. La toxicidad de este antibiótico no permite, por ahora, el empleo de dosis altas.

Otros antibióticos están siendo ensayados en distintos laboratorios. En la Universidad de Maryland se ha ensayado el ácido paraaminobenzoico en cobayos, ya sea solo, ya sea en combinación con estreptomycin, con resultados aparentemente satisfactorios. Las experiencias hechas en otros laboratorios con el ácido paraaminobenzoico (PABA) no han permitido confirmar su eficacia.

Algunas de las sulfonamidas han dado resultados promisorios en animales de laboratorio y su estudio es motivo de ulteriores investigaciones.

Por lo expuesto se puede concluir que hasta el presente no hay ninguna medicación eficaz contra la brucelosis animal.

BACTERIOLOGÍA

Sobre el metabolismo del género Brucella.— El crecimiento de *Brucella* en un medio líquido (caldo triptosa, por ejemplo) en recipientes incubados estáticamente, es reducido, a menos que el medio de cultivo se encuentre en capas finas. Glassman y Elberg (Camp Detrick, Maryland) han estudiado la influencia de la aeración y de la agitación sobre el cultivo de *Brucella* en medio líquido. A tal efecto, han diseñado un aparato que permite una aeración continua del medio de cultivo. Empleando caldo triptosado bajo una aeración de 1,15 de volumen de aire por minuto por volumen del medio de cultivo, estos investigadores obtienen un crecimiento máximo más o menos a las 65 horas de incubación, con un conteo de bacterias viables de $1 \text{ a } 2 \times 10^{10}$ por 1 c.c. para *Br. suis*. Para *Br. abortus* y *Br. melitensis*, las cosechas son un poco menores. Estos investigadores han demostrado también que la simple agitación mecánica del medio o por gases inertes (nitrógeno) no es suficiente para sostener la multiplicación de *Brucella*. Asimismo

se ha comprobado que el agregado de 10 % de ácido carbónico por volumen de aire suministrado al cultivo, no acelera la multiplicación microbiana cuando se trata de *Br. suis*. Este método, que permite el cultivo en columnas profundas de un medio líquido y que permite obtener grandes cosechas, no afecta aparentemente la virulencia ni provoca disociación.

Agregando a estos cultivos (de *Br. suis*) agentes estabilizadores tales como dextrina o ácido ascórbico o ambos, se puede mantener durante dos meses a la temperatura de 20° a 25° el contaje original de bacterias viables. A los 175 días a 20-25° estos cultivos líquidos retienen aún el 25 % de su contaje inicial y la completa virulencia.

Huddleson y colaboradores están trabajando hace varios años en determinar los efectos de los gases atmosféricos sobre la multiplicación y el metabolismo de *Brucella*. Estas investigaciones comprenden el estudio de los sistemas de enzimas de las especies del género *Brucella*.

Gerhardt y Wilson (Universidad de Wisconsin) han elaborado un medio de cultivo simple y químicamente definido para el cultivo de *Brucella*. Consiste este medio de sales minerales, cuatro factores accesorios de crecimiento (hidrocloruro de tiamina, ácido nicotínico, pantotenato de calcio y biotina), lactato, glicerina y la DL-asparagina, como única fuente de nitrógeno. La asparagina puede ser sustituida con éxito por el ácido L-glutámico o por L-histidina. Este método fué elaborado para estudiar las exigencias nutritivas de la cepa 19 de *Br. abortus*. Veintiocho otras cepas de las tres especies de *Brucella*, fueron ensayadas en este medio. Cuatro cepas no cultivaron, mientras las veinticuatro restantes acusaron distintos grados de desarrollo, desde un cultivo apenas visible a muy abundante. Cepas de *Br. abortus* que exigen una tensión aumentada de ácido carbónico, no se desarrollan en este medio.

A los medios selectivos para *Brucella* que contienen colorantes, hay que agregar el descrito por Elberg, Edwards y Swanson, que contienen tirotricina (0,025 mg. por 1 c.c. del medio) y nitruro de sodio (0,0125 miligramo por 1 c.c. del medio), que ha permitido en manos de estos investigadores el aislamiento directo de *Br. suis* de materias fecales de cerdos. Este medio no inhibe completamente las bacterias contaminantes, por lo que es necesario repicar las colonias sospechosas de *Brucella* y luego identificarlas.

Composición química y fracciones antigénicas.— Prosiguen los estudios sobre la composición química y las fracciones antigénicamente activas del género *Brucella*. La correlación exacta de los preparados de los distintos investigadores no es posible, por el hecho de que los métodos empleados son diferentes y por la falta de seguridad de que los productos obtenidos sean realmente nativos de la célula bacteriana. Si bien se han observado diferencias químicas entre las diferentes especies de *Brucella*, se puede, no obstante, observar diferencias aún entre distintas cepas de la misma especie.

Disociación.— La disociación en el género *Brucella* ha despertado gran interés entre los investigadores. En cuanto a morfología colonial,

se distinguen en *Brucella* las siguientes variantes generalmente aceptadas: *S*, lisa; *I*, intermediaria; *R*, rugosa; *M*, mucoide.

La variación microbiana no se expresa solamente en la morfología de la colonia, sino que puede afectar muchas otras características de la célula microbiana (morfología celular, propiedades fisiológicas, propiedades antigénicas, etc.). Los últimos trabajos en este campo tienden a demostrar que estas variaciones son independientes. Por ejemplo, una colonia puede haber sufrido una variación en sus propiedades antigénicas, conservando sin embargo la morfología cultural *S*. Braun y Bonestrell aplican la prueba de acriflavina (tripaflavina) para descubrir estos cambios independientes en colonias aisladas de *Brucella*. Así en una población pura de *R* o de *M*, se puede observar el establecimiento de colonias que morfológicamente en nada se distinguen de colonias *S* y que sin embargo aglutinan con la acriflavina, es decir se comportan como *R* o *M*. Según parece, las pruebas de la actividad antigénica in vivo son paralelas a los resultados obtenidos con la prueba a la acriflavina.

Braun ha hecho un estudio sobre los factores responsables en la disociación de *Brucella*. Estudiando diferentes cepas de *Brucella*, ha notado que la tendencia a la disociación no es igual en todas ellas. Para medir ese "potencial" de disociación con fines comparativos, ha establecido el "índice de disociación", que consiste en encontrar el porcentaje de colonias variantes en placas de agar, sembradas con cultivo en caldo de diez días obtenido, a su vez, por la siembra de una colonia *S* de una cepa dada. Con el fin de confirmar la existencia de un factor inherente, que tiene influencia sobre el grado de la disociación microbiana, Braun ha recurrido a la técnica de aislamiento de células microbianas individuales, lo que le ha permitido hacer ese estudio con líneas puras (clones). Los estudios de este autor indicarían que las diferencias entre clones, en cuanto a índice de disociación, son estadísticamente muy significativas. Con este método, Braun ha podido establecer cepas con un índice alto y bajo de disociación que mantenían esta característica si se les conservaba a bajas temperaturas. Claro está que todos estos ensayos comparativos se han hecho en condiciones standardizadas, tratando de que no hubiera ningún cambio ambiental que pudiera influenciar las experiencias.

Los estudios de Braun demostrarían también que los cambios ambientales, especialmente los que afectan el grado de multiplicación y la viabilidad microbianas, pueden modificar el índice de disociación inherente a cada clon.

El pH (una acidez ligera, pH 6,6 por ejemplo, favorecería la disociación, mientras un pH alto la inhibiría), potencial de oxidación-reducción (medios de cultivo con un potencial O/R reducido, disminuye el porcentaje de disociación), temperatura y otros factores alteran el índice de disociación que es característico de un clon. En términos generales, todo factor que disminuye el grado de multiplicación microbiana,

disminuiría también el índice de disociación. Los clones con diferentes índices de disociación, tendrían asimismo diferentes índices de multiplicación microbiana.

Según las conclusiones que Braun saca de sus estudios, la disociación en el género *Brucella*, como en cualquier otra especie microbiana, sería la aparición espontánea de variantes por mutación y su establecimiento subsiguiente que depende de factores inherentes y ambientales que rigen la dinámica de crecimiento de la población microbiana.

Siguiendo sus estudios sobre los factores que influyen en la disociación, Braun ha notado que pequeñas cantidades de suero normal inhiben la aparición de variantes *R* y *M* en cepas de *Brucella* que usualmente manifiestan un alto índice de disociación. El factor o los factores del suero normal que tienen ese efecto supresor sobre la disociación, es independiente del complemento, ya que sueros inactivados o filtrados tienen la misma propiedad. La fracción de gamma-globulina del suero normal, es la que contiene el factor inhibidor de la disociación. La sangre de animales no susceptibles a la brucelosis, carecería de este factor. En los animales vacunados el efecto selectivo del plasma quedaría alterado.

Jones y Berman (Universidad de Wisconsin) hacen un estudio del efecto de la estreptomycinina sobre la morfología colonial de variantes de *Brucella* resistentes a esta droga. Obtienen cultivos resistentes a la estreptomycinina por selección de colonias de tres cepas de *Br. abortus*. Cepas que eran sensibles a 0,001 mg. de estreptomycinina, son sembradas en una serie de placas de agar con una concentración creciente del antibiótico. Las colonias que aparecen en las placas con la mayor concentración del antibiótico, muestran el mismo desarrollo al repicarlas en ausencia de estreptomycinina o en su presencia a la concentración de 2 mgs. por 1 c.c. Observan estos autores, que colonias mucoides que resisten a la estreptomycinina, toman un carácter rugoso en presencia de este antibiótico. Las colonias estreptomycinorresistentes *S* y *R* —en cambio— conservan su morfología en presencia de la droga. A pesar de que la variante estreptomycinorresistente de *Br. abortus* no es afectada por este antibiótico en su desarrollo, parecería que esa droga interferiría con la producción de características mucoides.

Huddleson dedica especial atención al estudio de las variantes mucoides. Este investigador reconoce actualmente quince diferentes fases o formas de la variante mucoide de *Br. suis*; diez en *Br. abortus* y diez en *Br. melitensis*. Algunas de estas formas mucoides derivan directamente de colonias *S*, otras son el producto de disociación ulterior de formas mucoides. Las diferentes formas mucoides son designadas por Huddleson por números, precedidos por la letra *M* (mucoide) y la primera letra de la especie de *Brucella* (por ejemplo: *Ma* 1, quiere decir mucoide de *Brucella abortus* N° 1, *MS* 3, mucoide de *Br. suis* N° 3) y se distinguen por características morfológicas, formación de colonias hijas (formación o no, tiempo de aparición, número de colonias hijas) y otras características.

Huddleson pudo observar (comunicación personal) en varias oportunidades, variantes mucoides y rugosas de *Brucella* directamente aisladas del organismo animal y sostiene que la disociación in vivo ha de jugar un papel importante en el proceso de la recuperación espontánea del animal de la enfermedad. Según Huddleson, el factor de la presión de la población microbiana no tendría mayor influencia sobre la disociación. Él ha observado muy poca disociación o ninguna en cultivos en caldo continuamente agitados, con un crecimiento en población muy alto (180 mil millones por 1 c.c.). Sostiene, en cambio, que son los productos metabólicos del cultivo que estimulan la disociación.

ESTUDIOS EN PATOGENIA

Proliferación intracelular.—El hecho observado por T. Smith de que la *Brucella* puede proliferar intracelularmente (encontró estos gérmenes dentro del citoplasma de las células del corion de la placenta de animales que abortaron), al cual se ha prestado poca atención al principio, ha sido motivo de investigaciones en los últimos años que confirman los hallazgos de ese investigador.

Goodpasture y colaboradores, y luego Buddingh y Womack, observan la multiplicación de *Brucella* dentro del citoplasma de células del embrión de pollo. Según Buddingh y Womack la *Br. abortus* y *Br. suis* tienen tendencia a parasitar células de origen mesodérmico, mientras que la *Br. melitensis* tiene preferencia por las del ectodermo. La multiplicación de las tres especies se observa dentro del citoplasma de los macrófagos.

K. F. Meyer observó la presencia de *Brucella* dentro de células del parénquima del riñón de un paciente humano infectado con *Br. suis*. El parasitismo intracelular de *Brucella* explicaría las dificultades en el tratamiento terapéutico de la enfermedad.

Trasmisión cruzada de especie de Brucella.—La infección de bovinos en los EE. UU. por *Br. suis* y *Br. melitensis* ha sido comprobada. Generalmente estas infecciones no provocan abortos. Desde el punto de vista de salud pública este hecho es de mucha importancia, desde que las especies mencionadas son mucho más patógenas para el hombre que la *Br. abortus*. En varias oportunidades se ha podido demostrar casos de infección humana debidos al consumo de leche de vacas que eliminaban *Br. suis*. Beattie y Rice han dado cuenta de una epidemia con treinta casos humanos debidos al consumo de leche contaminada con *Br. suis*. Otra epidemia, con origen similar, fué descrita por Berts y colaboradores. Huddleson, trabajando en la tipificación de cepas remitidas de distintas partes del país, comprueba que en muchos estados del sur se encuentran bovinos infectados por *Br. suis*.

La trasmisión de *Br. suis* de suinos a bovinos en condiciones naturales, no es completamente clara. Elder (Universidad de Missouri) no pudo demostrar la trasmisión de la infección de cerdos infectados a bovinos, mantenidos en estrecho contacto en pastoreo común. Algunas

de las vacas expuestas, acusaron títulos bajos y transitorios de aglutinación, pero en ningún momento se pudo aislar *Br. suis*.

Cameron (Universidad de California) ha intentado infectar bovinos con *Br. suis*, por vía conjuntival, obteniendo resultados negativos.

Washko y colaboradores (Universidad de Purdue, Indiana) han ensayado diferentes vías de exponer bovinos a *Br. suis*. Cinco vacas fueron expuestas a un estrecho contacto con suinos infectados, no pudiéndose observar en ningún momento que la enfermedad se haya podido establecer en los bovinos. La reacción serológica en estos bovinos fué de título bajo y de poca duración y los exámenes bacteriológicos negativos. A seis vacas, preñadas y no preñadas, se les administró en los alimentos fetos y envoltura de cerdas que abortaron. De la placenta de una sola vaca de este grupo se pudo aislar *Br. suis*, a pesar de tener reacción negativa durante la parición. En general las pariciones eran normales, el título aglutinante bajo y transitorio y, excepto en el caso indicado, no se pudo aislar el germen de exposición. Dos vacas que fueron expuestas con *Br. suis* por la piel escarificada, dieron resultados negativos al examen bacteriológico y un título bajo y transitorio a la prueba serológica. Otro grupo consistente de cinco vacas, fué expuesto con cultivos de *Br. suis*, ya sea directamente en las cisternas lácteas, o en el orificio del pezón. En todo este grupo la infección se estableció en los cuartos mamarios expuestos, eliminando *Br. suis* en la leche durante un largo período de tiempo, manifestando además un alto y prolongado título aglutinante. La exposición por vía mamaria ha provocado además una mastitis aguda, que persistió durante dos a tres semanas. Los investigadores de la Universidad de Purdue sugieren —en base de esta experiencia— que la infección de vacas por *Br. suis* podría originarse, como en las mastitis a cocos, por vía ascendente, tomando como puerta de entrada el orificio de los pezones.

Como dijimos más arriba, *Br. melitensis* ha podido ser aislada también de bovinos en el medio oeste de los Estados Unidos. Existe la posibilidad de que esta infección haya sido traída con las vacas importadas de Méjico, que en su país de origen estaban expuestas a caprinos infectados.

Br. melitensis ha sido también aislada de suinos. En Iowa se ha encontrado un criadero naturalmente infectado con *Br. melitensis*, siendo las características de la enfermedad, similares a la infección con *Br. suis*.

Hasta ahora se había considerado que el cerdo no era susceptible a *Br. abortus*. Mc Cullough y Eisele (Universidad de Chicago) examinaron, en los frigoríficos de Chicago, 5.000 cerdos, haciendo cultivos de un solo ganglio de cada uno, hallando que el porcentaje de infección entre *Br. abortus* y *Br. melitensis* iguala al de *Br. suis*.

El informe de estos investigadores a la Conferencia de Investigadores en Brucelosis Suina en la Universidad de Prudue, Indiana, ha causado sumo interés, pues la infección a *Br. abortus* se descartaba en el cerdo y la mayoría de los investigadores no cultivaba, por esa razón, los materiales de cerdos bajo una tensión especial de CO₂, como se requiere para el aislamiento de *Br. abortus*.

Infección por vía respiratoria.— Muchos investigadores han hecho observaciones de casos humanos que les hizo sospechar que la vía respiratoria podría ser una de las vías de entrada de *Brucella*. Los trabajos sobre la enfermedad natural o experimental debida a la inhalación del germen, son muy escasos. Elberg y Henderson (Camp Detrick, Md.) han hecho ensayos de exposición en cobayos, por vía aérea, con *Br. suis* y *Br. melitensis*. Estos autores llegan a la conclusión que la susceptibilidad de los cobayos a la infección por inhalación, no es mucho menor que por inoculación subcutánea, si se la mide por el D_{50i} (50 % de dosis infectante, o mejor dicho, el número de gérmenes requeridos para infectar el 50 % de animales inoculados). La regularidad con que se obtuvo la infección en cobayos, expuestos a aerosoles, exime ulteriores investigaciones sobre la importancia de la inhalación en la infección humana y animal. Las lesiones encontradas en los cobayos infectados por vía respiratoria, son similares a las obtenidas por vía subcutánea, con la diferencia de que generalmente los ganglios linfáticos bronquiales y a menudo los cervicales posteriores están aumentados de volumen y muchas veces abscedados y de que el epidídimo es raramente afectado. Un hecho interesante es que no se han comprobado lesiones pulmonares atribuibles a *Brucella*, lo que indicaría que ese germen se disemina rápidamente por esa vía de entrada.

ESTUDIOS SOBRE LA PERSISTENCIA Y VÍAS DE ELIMINACIÓN

Manthei (Animal Disease Station, Beltsville, Md.) dió a conocer en la Conferencia de Investigadores de *Brucelosis Bovina*, diciembre 1948, en Chicago, los siguientes resultados obtenidos sobre la persistencia y vías de eliminación de *Br. abortus*, en 18 vaquillonas artificialmente infectadas. Al mes de la infección se obtuvieron hemocultivos en el 100 % de los animales, a los seis meses en un 55 %, a los doce meses en un 22 % y a los veintiún meses había todavía animales (11,1 %) de los cuales se aislaba aún el germen de la corriente sanguínea. La infección urogenital tuvo un curso parecido. Del exudado vaginal se pudo aislar el germen durante los veintiún meses, de tres animales (16,65 %). Uno de estos tres animales abortó el primer ternero y desde entonces se mostró estéril. De este animal se aislaba, en forma intermitente, *Brucella* del exudado vaginal.

Esto demuestra de que la recomendación de aislar los animales infectados por una o dos semanas después del parto o aborto, del resto del rodeo, no es siempre una garantía suficiente contra la difusión de la infección.

En los veintiún meses del estudio, se comprobó una persistente infección mamaria en trece de los dieciocho animales. Todos los animales menos uno han abortado en la primera gestación.

Es interesante también el estudio hecho en vaquillonas de un año, que fueron expuestas a la infección natural. Seis de las veinticinco

vaquillonas mostraron un título aglutinante de 1/200 o más y cinco de las reaccionantes desarrollaron una infección mamaria antes de ser servidas. Una de las vaquillonas daba hemocultivos positivos, en forma intermitente, durante 34 meses.

Los ensayos hechos en la Universidad de Purdue y en la Animal Disease Station del Bureau of Animal Industry, demuestran que cerdos de ambos sexos y de toda edad son susceptibles a la infección con Br. suis. En contraposición de lo que pasa en la especie bovina, se ha encontrado que la infección puede establecerse en lechones mamonos. Manthei (Bureau of Animal Industry) informó que de 127 lechones mamonos alimentados por hembras que eliminaban Brucella en su leche, 10 adquirieron la infección y que de 103 lechonas mamonas mantenidas en las mismas condiciones, 17 se infectaron.

Es un hecho conocido, que el macho juega un papel preponderante en la trasmisión de la brucelosis suina. En un estudio hecho por Manthei, sobre las localizaciones de Br. suis, ha podido demostrar que de los machos que quedaron infectados, ya sea por exposición natural o artificial, el 94,6 % albergó el germen en el tracto genital. En los machos infectados a consecuencia de la exposición natural, se aisló Br. suis en el 33,3 % de los testículos, en el 22,2 % de los epidídimos, en el 44,4 % del bulbo uretral, en el 33,3 % de la vesícula seminal, en el 22,2 % de la próstata, en el 22,2 % de los ganglios linfáticos de la cabeza, en el mismo porcentaje de los ganglios viscerales, en el 33,3 % del bazo, en el 11,1 % de las articulaciones, en el 33,3 % de la orina y en el 11,1 % de la sangre. Br. suis puede albergarse en la mayor parte de los tejidos del cerdo. Los localizaciones más frecuente en las hembras, según este estudio, eran los ganglios linfáticos. En el 77,3 % de las hembras infectadas se aisló el germen de los ganglios linfáticos de la cabeza (mandibulares, suprafaríngeos y parotídeos), con el 68,1 % de los ganglios viscerales, en el 29,5 % del bazo, en el 23,2 % de la columna vertebral, en el 18,6 % de los órganos urogenitales y en el mismo porcentaje del hígado.

Br. suis puede ser eliminada, en los suinos, por la orina, el semen, el flujo vaginal y la leche. De los estudios hechos por Manthei, parecería que el porcentaje de machos que eliminan el germen por el tracto genital, es mayor que el de las hembras.

Hembras infectadas por vía conjuntival o vaginal, mostraban una bacteriemia que duraba por lo menos ocho meses, como término medio. Una infección urogenital se estableció en el 58 % de las hembras expuestas por vía conjuntival, con una duración de uno a treinta y un meses y en el 47,8 % de las inoculadas por vía vaginal. El aislamiento de Br. suis de la orina o de la vagina no dependía del ciclo sexual o de la descarga del flujo vaginal.

En la Universidad de Purdue se han hecho ensayos en cobayos con Br. suis. De 51 cobayos machos inoculados, por distintas vías, se pudo aislar Br. suis del semen en 30 animales. La concentración del germen en el semen era alta. Un macho eliminaba aproximadamente seis millones de gérmenes por 0,1 c.c. del semen.

ESTUDIOS EN MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

La reacción del anillo.— (ABR, Br. abortus Ring Test.) En la mayor parte de las estaciones experimentales y universidades de los EE. UU. se está estudiando la posibilidad de la aplicación de la reacción del anillo a la leche como método diagnóstico en la brucelosis bovina.

La prueba del anillo fué descrita por primera vez por Fleischhauer, en Alemania, y fué luego perfeccionada en Suecia y Dinamarca. En este último país la reacción del anillo fué incorporada, desde noviembre de 1947, entre los métodos oficiales de diagnóstico.

La reacción del anillo consiste en mezclar a 1 c.c. de leche una gota de un antígeno de Br. abortus teñido por la hematoxilina. Al término del período de incubación, una reacción positiva se manifiesta por la formación de un anillo azul violeta en la capa de crema, quedando la columna de leche descoloreada; en una reacción negativa, la capa de crema queda blanca y la columna de leche azul violeta.

El mecanismo de esta reacción aunque no está completamente conocido, se produciría de la siguiente manera: las aglutininas específicas que se encuentran en la capa de proteína alrededor de los corpúsculos de grasa, aglutinarían con el antígeno, englobando los corpúsculos de crema. Al subir la crema, arrastraría consigo los gérmenes teñidos aglutinados (el antígeno), dando al anillo de crema el color azul violáceo y dejando sin color a la columna de leche. Si no hay aglutininas específicas en la leche, el antígeno queda repartido en la columna de leche, quedando ésta teñida mientras el anillo de crema está descoloreado.

La sensibilidad de la reacción es muy grande, es decir, si una leche positiva le diluimos muchas veces su volumen, una muestra tomada de la leche diluida seguirá dando reacción positiva. Esta sensibilidad explica su aplicación práctica. Al tomar muestras de leche de los tarros en los puntos de concentración de este producto, de una cierta zona (plantas de pasteurización, cremerías, etc.), se puede —de este modo— localizar los establecimientos infectados. El ahorro de tiempo y de personal sería enorme. Según los extensos trabajos hechos en Dinamarca, la eficiencia de esta prueba en la ubicación de establecimiento infectados sería del 78 al 87 %. Además de otros factores que reducen la eficacia de la prueba, hay algunos naturales que la limitan, tales como en los casos cuando los únicos animales infectados en un establecimiento son vacas secas, toros o vaquillonas.

En Estados Unidos, extensas investigaciones sobre la prueba del anillo han sido iniciadas por Roepke de la Universidad de Minnesota, y se han extendido actualmente a casi todo el territorio de la Unión. Roepke ha hecho un estudio comparativo en la reacción del anillo y la sueroaglutinación sanguínea en 6.116 establecimientos de siete condados de Minnesota, obteniendo los siguientes resultados: en el 96,5 % de los casos hubo acuerdo entre las dos pruebas, en el 3,5 % desacuerdo. Los casos de desacuerdo estaban compuestos de 173 establecimientos con

sueroglutinación negativa y reacción de anillo positiva y 73 establecimientos donde la suerorreacción era positiva y la reacción del anillo negativa. De los 73 establecimientos en los cuales la prueba del anillo ha fallado en descubrir la infección, 41 de ellos contenían reaccionantes (generalmente uno por establecimiento) que no estaban en producción, sobre todo vacas secas y vaquillonas. En otros casos los reaccionantes estaban en el último período de lactación, a punto de secarse, lo que ha determinado una dilución muy alta de la leche positiva en la mezcla de la leche negativa. Esta limitación natural de la prueba del anillo puede ser corregida, repitiendo las pruebas con unos seis meses de intervalo. De los ensayos hechos, Roepke llega a la conclusión de que esta prueba es eficiente en localizar los establecimientos infectados, en un 75 % de los casos.

Debido al amplio uso que se ha hecho de la vacunación con la cepa 19 en los EE. UU., se debe también tomar en cuenta que falsas positivas a la prueba del anillo pueden ser originadas por esta circunstancia, especialmente en los casos de vacunación de adultos, donde la aglutinación tiende a persistir a alto título y por largo tiempo.

La experiencia de los investigadores americanos confirma la de los dinamarqueses, de que la prueba del anillo aplicada individualmente a cada animal da un margen de errores mucho más alto que en el caso de aplicarla a muestras de leche que representa un conjunto de animales (seis a diez animales).

Finalmente cabe decir que los estudios que se han realizado últimamente sobre métodos diagnósticos, otros que la sueroaglutinación y la reacción de anillo, no han arrojado hechos nuevos. Tal es el caso también de los ensayos sobre procedimientos de diagnóstico diferencial entre animales infectados y vacunados, que sigue interesando a varios núcleos de investigadores.