

ESTUDIO COMPARATIVO DE VARIOS ANTIGENOS PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS HUMANA

Carlos Julio Jaramillo A., M.V.Z.; Marta Luz Misas R., M.V.*

TECNIAGRO

NATURALEZA DEL PROBLEMA

La Brucelosis constituye en la actualidad un problema mundial difícil de afrontar tanto para la salud Humana como para la Salud Animal, y sus especiales características Ecológicas como Zoonosis de fácil difusión de los animales al hombre y de difícil diagnóstico clínico, hacen indispensable que medidas específicas como Inmunización en animales y diagnóstico precoz tanto en humanos como en animales sean requeridos para su control.

Desde hace muchos años y a través de los diferentes eventos de carácter nacional o internacional que se han realizado en todo el mundo, se viene llamando la atención y haciendo énfasis sobre la urgente necesidad de unificar patrones en cuanto

a Bilógicos y técnicas empleadas para el diagnóstico de la Brucelosis, sin embargo, la realidad no ha variado mucho y nuestro país no es una excepción si se tiene en cuenta que actualmente la Inmunización y el diagnóstico en animales se realiza con bilógicos producidos por Laboratorios Nacionales y cuya calidad es debidamente controlada por el Gobierno, por el contrario el diagnóstico en humanos se efectúa con productos importados o elaborados por laboratorios particulares y sin un control garantizado, lo que trae como consecuencias gran cantidad de reacciones inespecíficas y de poca sensibilidad que lo hacen altamente ineficaz. Esta situación agrava aún más el problema en nuestro medio si se tiene en consideración que la enfermedad, sin dejar de ser ante todo profesional, puede estar afectando a una cantidad considerable de nuestra comunidad, especialmente rural, habituada al consumo de leche cruda y sus productos y que en su mayoría no tienen acceso a los diferentes sistemas de prestación de servicios de salud.

* Este trabajo fué realizado como parte de los requisitos exigidos por la Escuela de Salud Pública para obtener el título de Magister en Salud Pública.

La situación descrita hace necesaria una revisión de la cantidad de los antígenos utilizados en el diagnóstico de la Brucelosis humana respecto a su grado de sensibilidad y especificidad, considerando que la concentración celular requerida para el antígeno utilizado en placa debe ser de un 11^o/o y teniendo en cuenta que varias investigaciones han demostrado que una gran mayoría de estos antígenos comerciales producidos en las Américas están entre 1^o/o y máximo 8^o/o de concentración celular, siendo muy frecuente la concentración del 2^o/o al 3^o/o.

Por tanto, se considera que reviste especial importancia el realizar una primera evaluación a algunos de los antígenos comerciales que se están utilizando en nuestro medio para hacer el diagnóstico de la Brucelosis en el hombre y que este estudio debe servir como base para futuras investigaciones que evalúen la totalidad de los antígenos utilizados en cada uno de los diferentes servicios de salud del país.

REVISION DE LITERATURA

DISTRIBUCION

La distribución de la Brucelosis en Hombre y Animales es mundial, con excepción de aquellos países que han logrado erradicarla, como son los países Escandinavos. Las cifras pueden engañar, porque en países donde se hace investigaciones activamente, la incidencia puede parecer alta, mientras que en otros países se pueden reportar pocos casos aún cuando la infección sea abundante (37).

La Brucelosis en Colombia como en otros lugares del mundo, es considerada como una enfermedad profesional. Mi-

randa Pérez, cita a Cleves que en su Tesis de Grado en 1935 reporta los primeros casos de Brucelosis Humana en Colombia. De acuerdo a los datos obtenidos por la OMS, en nuestro país el número anual de casos denunciados en el Cuatrenio de 1960 oscila entre 24 y 42. Estas cifras afectadas por el subregistro son susceptibles a elevarse a medida que se aumente la industria Pecuaria en el país.

Los estudios realizados en algunas regiones del país, dan cifras que oscilan entre 3^o/o y 10^o/o incluyendo población de alto riesgo y población general (20, 36).

INMUNOLOGIA

La infección por Brucela provoca tanto en el Hombre como en los Animales fenómenos Inmunológicos que pueden ponerse en evidencia mediante diversos recursos de laboratorio. Tanto en el hombre como en los animales, la infección natural va seguida de la aparición simultánea de Inmunoglobulinas M IgM e Inmunoglobulinas G ó IgG pero a diferencia de lo que sucede después de la vacunación disminuye únicamente la concentración de IgM y posteriormente, sobre todo en las etapas crónicas, la clase principal y muchas veces únicas, de Inmunoglobulinas presente es la IgG.

Es de notar que en el hombre se pueden observar anticuerpos no aglutinantes o "Incompletos", sobre todo en los casos crónicos, los cuales pueden descubrirse con la prueba de la Antiglobulina o prueba de Coombs. Para descubrir las Inmunoglobulinas IgG puede tratarse el suero con cisteína o con 2-Mercaptoetanol. También se ha reportado que de las tres aglutininas contra Brucela, asiladas del

suelo humano, las IgG fijan intensamente el Complemento, las IgM lo fijan moderadamente y las Inmunoglobulinas A, ó IgA, no lo fijan (18, 20, 27).

DIAGNOSTICO

Al hablar de antígenos, Vargas Tentori, (9) coordinador de los programas de la OPS/OMS, en Venezuela, hace énfasis en la composición antigénica de la célula bacteriana y en la cantidad de antígeno que ésta posee, la importancia de ellos para su diferenciación por medio de sueros monoespecíficos y recomienda una vez más la normalización de antígenos y de los diversos métodos de diagnóstico serológico para una mejor interpretación de resultados.

Después de muchos años de experiencia, se acepta universalmente que la prueba de aglutinación es de gran valor en el diagnóstico de la brucelosis tanto humana como animal. Sin embargo, en la práctica se tropieza con algunas dificultades debido a la falta de uniformidad en los antígenos y técnicas empleadas, así como al criterio usado para interpretar la prueba. Miranda Pérez cita a Carpenter y Hubber (20, 21) quienes afirman que la incidencia de la enfermedad en el hombre es difícil de determinar por falta de acuerdo entre el diagnóstico de Brucelosis por título aglutinante y la marcada variación en los resultados de las pruebas serológicas en diferentes laboratorios.

Por estas razones, muchas veces no coinciden ni los diagnósticos hechos en países distintos ni siquiera, los hechos en los laboratorios de un mismo país. Las consecuencias de esta situación son deplorables, ya que la diferencia en el diagnóstico,

desconcierta por igual a Médicos y enfermos.

El Tercer y Cuarto Congreso Interamericano de Brucelosis (Washington, 1950 y Lima, 1957), recomendaron que en cada país se designe una autoridad nacional centralizada, responsable de la uniformación de los reactivos empleados en las pruebas de seroaglutinación para la Brucelosis.

Mardock y colaboradores, en 1950-1951, (21, 23) tuvieron bajo los auspicios de la Oficina Sanitaria Panamericana, una evaluación de la prueba de Seroaglutinación, y con tal objeto analizaron 36 antígenos usados en las Américas, (17 para prueba en placa y 19 para prueba en tubo), procedentes de 20 laboratorios oficiales y particulares, de 12 países americanos y europeos. Los resultados obtenidos revelaron variaciones apreciables en la sensibilidad de los antígenos y en la forma de hacer e interpretar la prueba.

Se encontró: la pureza de los antígenos, con algunas posibles excepciones, pareció ser satisfactoria desde el punto de vista de su empleo. La concentración de las células de Brucela por volumen en los antígenos usados para la prueba común de placa, o prueba rápida varió de 0.70/o a 140/o con un promedio de 8.60/o. La concentración final de los antígenos, según las pruebas de tubo prueba lenta, varió de 0.0090/o a un 0.140/o, con un porcentaje medio de 0.0480/o de células por volumen. A juzgar por los resultados obtenidos en las pruebas de los 5 sueros mencionados, un alto porcentaje de los antígenos pareció indicar una capacidad normal de aglutinación. Los estudios efectuados indican que la uniformidad de

concentración de los antígenos y la técnica que se siga para las pruebas de aglutinación, podrían reducir sustancialmente la variabilidad de la sensibilidad relativa encontrada en los antígenos (21-23).

La oficina Sanitaria Panamericana reporta en uno de sus informes el estudio realizado en el Centro Panamericano de Zoonosis por Moya y colaboradores, 1963, (21) en el que se hizo una evaluación de la prueba de Seroaglutinación para el diagnóstico de la Brucelosis humana y de la animal, tal como actualmente se utiliza en los países Americanos. Este estudio comparativo fue similar al efectuado por Mardock y colaboradores en 1950-1951, (23) y tuvo por objeto estudiar las variaciones que todavía existen e investigar sus posibles causas. Los resultados de esta evaluación muestran una tendencia a las técnicas de elaboración de los antígenos de uso animal y de la ejecución de las pruebas respectivas, pero no ocurre lo mismo con los antígenos y pruebas empleadas en medicina humana. Por lo que respecta a los resultados de las pruebas de laboratorio, hechas comparativamente con el antígeno de referencia, el 71.40% de los antígenos de tubo, para uso animal, y el 47.30% para la placa, resultaron satisfactorios, en cambio, sólo el 14.30% de los antígenos para tubo y ninguno de los antígenos para prueba en placa, de uso humano, fueron aceptables de acuerdo con el standard (12).

Restrepo Isaza (33) expresa que las pruebas de laboratorio son definitivas para el correcto diagnóstico de la Brucelosis, sin embargo, no es fácil emitir concepto respecto a la calidad de los antígenos empleados en Colombia para el diagnóstico de esta enfermedad por la inexistencia

de criterios definidos y unificados en cuanto a la clase de antígenos empleados, además por las limitaciones de tipo económico los laboratorios de diagnóstico se ven obligados a utilizar indiscriminadamente una u otra marca comercial, lo que hace difícil efectuar un seguimiento sobre la calidad de los mismos. En Colombia la producción de la vacuna y la elaboración de antígenos para diagnosticar en tubo, placa, ring-Test, se efectúa en general, siguiendo los procedimientos internacionales, oficializados por los organismos y centros de referencia mundial (OMS, -FAO, -OIE).

Las reacciones antígeno-anticuerpo, depende del balance de antígenos y anticuerpos y existe una concentración óptima de ambos donde se producirá mejor la aglutinación. De modo que el exceso de uno o de otro puede llevar a que disminuya la reacción hasta hacerse negativa. No es lo mismo si se ha puesto una concentración celular alta que si se ha puesto baja; si se han puesto muchas células, se necesitará mucho anticuerpo para que se produzca el óptimo de la reacción. El modo que, sentitezado, una reacción será tanto más sensible cuanto menos antígeno haya, esto es cuanto más diluído sean los antígenos la prueba será más sensible; cuanto más anticuerpos existan, la prueba será también más sensible. (12, 35).

Hoy se ha estandarizado el antígeno en toda América según el sistema orgánico del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Un antígeno de tubo debe contener 0.0450% de células en fase perfectamente lisa, con sus aglutinógenos intactos y producidos por una cepa especial de *Brucella abortus*. Un 110% de concentración celular de antígeno de pla-

ca da resultados comparables con los que se obtienen en tubo.

Respecto al diagnóstico de Brucelosis en humanos, García Garrillo (10) expresa que algunas casas comerciales elaboran productos poco concentrados aprovechando la creencia errónea de muchos técnicos de que estos antígenos hipersensibles son de mejor calidad, cuando en realidad tienen el grave inconveniente de dar falsos reaccionantes. Las casas comerciales que existen en muchos países aprovechan el concepto de que un antígeno es bueno cuanto más sensible.

Producir un antígeno para placa con 110/o de concentración celular, que es lo que se necesita, sale muy caro, y no hay nada más fácil que agregar agua; ponerlo al 5 1/20/o y ganarse el doble. La mayoría de los antígenos comerciales examinados durante los últimos 5 años, estaban entre el 10/o y máximo el 80/o de concentración, siendo más frecuente la concentración del 30/o en antígenos para placa. El hecho es que estos antígenos no pueden dar las reacciones de un antígeno estandarizado y con la concentración apropiada. Por supuesto que estos antígenos presentarían más errores todavía, si además de Brucelas en fase lisa, existe otras en fase rugosa y otros microorganismos. (10, 12).

En lo referente al tiempo de duración de los antígenos, se puede afirmar que mientras se conservan en refrigeración se pueden mantener inalterables por muchos años, como lo demuestra el trabajo que realizaron en el año de 1949 Philipps y Suplee (30) en el "Animal Disease Stations" de Beltsville. Se eligieron antígenos preparados desde el año 1941 al 1948

y se utilizaron muestras de suero, habiéndose obtenido aglutinaciones de título igual para cada suero trabajando con los distintos antígenos. Esta inalterabilidad de los antígenos es de gran importancia ya que se comprende que es difícil obtener antígenos que sean completamente iguales en su aglutinabilidad y como su duración es larga se pueden preparar lotes grandes que se pueden repartir en los distintos laboratorios.

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación fue realizada en los Municipios de Medellín, Envigado y Caldas del Departamento de Antioquia y consigna los resultados de la evaluación hecha a varios antígenos utilizados en el diagnóstico de Brucelosis Humana.

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en el Centro de Diagnóstico ICA en Medellín y el Laboratorio Departamental del Servicio Seccional de Salud de Antioquia.

Se seleccionó personal de poblaciones definidas como "Alto Riesgo", tales como: Matarifes, Cargadores de Carne, Manipuladores de Industrias Cárnicas y Expendidores, además Médicos Veterinarios.

El tamaño de muestra se definió considerando que era suficiente un número mínimo de 200 y máximo de 250 muestras de sueros, teniendo en cuenta las prevalencias de reaccionantes positivos del 30/o al 100/o, en grupos de alto riesgo, obtenidas en varios estudios realizados en nuestro medio (19, 32, 33), con la seguridad de obtener índices de prevalencia semejantes.

La selección del personal se hizo en base a los siguientes criterios:

a— Que la persona estuviese en contacto directo con la Carne.

b— Que el tiempo de antigüedad en estas actividades no fuese menor de un (1) año.

1— TOMA DE MUESTRAS

Se sangraron todas aquellas personas que voluntariamente se sometieron al examen. Se obtuvo un total de 338 muestras distribuídas en la siguiente forma:

Grupo Donante	Número de Muestras
Manipuladores de Mataderos	207
Manipuladores de Industrias Cárnicas	68
Expendedores de Carne	24
Otros (*)	39
Total Muestras Tomadas	338
Deshechadas (Menos—	110
TOTAL MUESTRAS PROCESADAS	248

* Comprende Médicos Veterinarios, ordeñadores y personal vinculado a diferentes actividades ganaderas.

Fueron descartados 110 sueros por no reunir condiciones aptas para ser sometidos a las pruebas de aglutinación (Hemólisis, Contaminación, Cantidad insuficiente).

Las muestras de sangre se tomaron por venopunción, usando tubos al vacío (Venojet) de 10ml, perfectamente estériles, sin anticuagulante y agujas desechables (Venojet). A cada persona se le tomó una muestra de 10 mnl., la cual se identificó convenientemente en número de orden; se separó el suero por centrifugación a 2.500 r.p.m. y se envasó en forma ascépti-

ca en viales correctamente rotulados. Los sueros se guardaron en congelación.

A cada persona se le expidió, dentro de los 5 días siguientes al examen, su correspondiente certificado que comprendía: Ciudad y fecha de expedición, nombre completo, oficio específico, sitio de trabajo y título aglutinante.

2— TECNICA

Se utilizó la técnica de la "prueba rápida o en placa", según la técnica descrita por Alton y el Centro Panamericano de Zoonosis en su nota técnica No. 2 (1, 4).

Siguiendo las anteriores indicaciones se utilizó como patrón el antígeno de uso

veterinario preparado por la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios, VECOL, que elabora dichos antígenos de acuerdo a las normas técnicas del Centro Panamericano de Zoonosis, CEPANZO (17), igualmente y para su evaluación, se utilizaron 4 antígenos de uso humano de igual número de casas comerciales particulares, empleados actualmente en nuestro medio para el diagnóstico de Brucellosis en humanos. Dichos antígenos de suero fueron procesados de la siguiente forma:

La totalidad de los sueros se enfrentaron con el antígeno "Patrón" (VECOL) en el Laboratorio del Centro de Diagnóstico del ICA, de Medellín por los responsables directos de la investigación; ya procesados fueron enviados conjuntamente con los antígenos a evaluar (empleados para el diagnóstico en humanos), al Laboratorio Departamental del Servicio Seccional de Salud de Antioquia, donde las actividades estuvieron a cargo del personal de dicho Centro.

En esta forma los resultados obtenidos por el personal de uno de los laboratorios fue totalmente desconocida por el personal del otro hasta el momento de evaluación y análisis.

Se debe aclarar que por limitaciones de tipo económico no fue posible conseguir suficiente cantidad de antígeno para el

diagnóstico en humanos, por dicha razón aunque las pruebas con el antígeno "Patrón" fueron cuantitativas (Diluciones 1/25 - 25 UI/mmL. hasta 1/200 - 200 UI/mmL.), las efectuadas con el antígeno para el diagnóstico en humanos fueron cualitativas a un solo título (1/40 - 40mmL.)

RESULTADOS Y ANALISIS

PLAN DE ANALISIS

El análisis fundamental se hace confrontando los resultados de los exámenes hechos a los sueros humanos, con los antígenos comerciales utilizados para el diagnóstico de Brucellosis bovina que se utiliza en Colombia; con el fin de evaluar en dichos antígenos la sensibilidad y la especificidad.

Se considera que el antígeno para el diagnóstico de Brucellosis en bovinos utilizado por el ICA y controlado por el Laboratorio Nacional de Control de Drogas y Productos Biológicos de ese mismo Instituto, esta garantizado y que llena los requisitos de control exigidos por los Organismos Centros de Referencia Mundial (OMS, FAO, OIE). Este fue tomado como "Antígeno Patrón", ante el cual se enfrentaron los resultados obtenidos con los antígenos comerciales utilizados en las reacciones serológicas en Brucellosis humana. Ej:

$$\frac{a}{a + c} = \text{Personas con diagnóstico positivo y prueba positiva}$$

$$\text{Total de personas con diagnóstico positivo}$$

Especificidad de la prueba:

$$\frac{d}{b + d} = \text{Personas con diagnóstico negativo y prueba negativa}$$

$$\text{Personas con diagnóstico Negativo.}$$

Valor Predictivo:

$$\frac{a}{a + b} = \text{Personas con diagnóstico positivo y prueba positiva}$$

$$\text{Total de personas con prueba positiva.}$$

Valor discriminativo:

$$\frac{d}{c + d} = \text{Personas con diagnóstico negativo y prueba negativa}$$

$$\text{Total de personas con prueba negativa.}$$

En este orden de ideas se puede efectuar el análisis haciendo enfrentamientos pareados entre los resultados obtenidos en las reacciones de los sueros con cada uno de los antígenos "prueba" (test) de uso humano, y los obtenidos con el antígeno patrón o "diagnóstico" (de uso veterinario).

DIAGRAMA No. 2

ANTIGENO "PATRON"/ANTIGENO B AG' "PATRON"

RESULTADOS

		+	-	
Test	+	22	8	Total 30
	-	5	213	218
Total		27	221	248

$$\text{Sensibilidad} = \frac{22}{27} = 81.5\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{213}{221} = 96.3\%$$

$$\text{Falsos positivos} = 3.7\%$$

$$\text{Falsos Negativos} = 18.5\%$$

$$\text{Valor discriminativo} = \frac{213}{218} = 0.98\%$$

$$\text{Valor predictivo} = \frac{22}{30} = 0.73\%$$

$$X^2 = \frac{(8 - 5)^2}{(8 + 5)} = 0.6\% \quad (P > 0.5)$$

DIAGRAMA No. 3

ANTIGENO "PATRON"/ANTIGENO C

AG "PATRON"

RESULTADOS

	+	-	Total
Test +	10		10
-	18	220	238
Total	28	220	248

$$\text{Sensibilidad} = \frac{19}{28} = 67.8\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{142}{144} = 98.6\%$$

$$\text{Falsos positivos} = 1.4\%$$

$$\text{Falsos Negativos} = 32.2\%$$

$$\text{Valor Predictivo} = \frac{19}{21} = 0.90$$

$$\text{Valor discriminativo} = \frac{142}{151} = 0.94$$

$$X^2 = \frac{(2 - 9)^2}{2 + 9} = 4.85\% \quad (P < 0.5)$$

DIAGRAMA No. 4

ANTIGENO "PATRON"/ANTIGENO D.

AG' PATRON

RESULTADS

		+	-	Total
Test	+	10		10
	-	18	220	238
Total		28	220	248

$$\text{Sensibilidad} = \frac{10}{28} = 35.7\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{220}{220} = 100\%$$

$$\text{Falsos positivos} = 0$$

$$\text{Falsos negativos} = 64.3\%$$

$$\text{Valor predictivo} = \frac{10}{10} = 1.0$$

$$\text{Valor discriminativo} = \frac{220}{238} = 0.92$$

$$X^2 = \frac{(0.5 - 18.5)^2}{(0.5 + 18.5)} = 17.05 \quad (P < 0.001)$$

DIAGRAMA No. 5

ANTIGENO "PATRON" / ANTIGENO E.

AG' PATRON

RESULTADOS

		+	-	Total
Test	+	7		7
	-	16	65	81
Total		23	65	88

$$\text{Sensibilidad} = \frac{7}{23} = 30.4\%$$

$$\text{Especificidad} = \frac{65}{65} = 100\%$$

$$\text{Falsos positivos} = 0$$

$$\text{Falsos negativos} = 69.6\%$$

$$\text{Valor predictivo} = \frac{7}{7} = 1.0$$

$$\text{Valor discriminativo} = \frac{65}{81} = 0.8$$

$$X^2 = \frac{(0.5 - 16.5)^2}{(0.5 + 16.5)} = 15.05 \quad (P < 0.001)$$

TABLA RESUMEN DE LAS CUATRO COMPARACIONES DEL ANTIGENO "PATRON (DIAGNOSTICO) Y LOS ANTIGENOS PROBADOS, B,C,D,E.

Antígenos Comparados	Población No sueros	Sensibilidad	Especificidad	Falsos Positivos	Falsos Negativ.	Valor Predict.	Valor Discrim.	X ²
Ag' Patr./ Ag'B	248	81.50/o	96.30/o	3.70/o	18.50/o	0.73	0.98	0.690/o
Ag, "Patr/ Ag'C	172	67.80/o	98.60/o	1.40/o	32.20/o	0.90	0.94	4.450/o
Ag' Patr/ Ag'D	248	35.70/o	1000/o	0.00/o	64.30/o	1.0	0.92	17.050/o
Ag' Patr/ Ag'E	88	30.40/o	1000/o	0.00/o	69.60/o	1.0	0.80	15.05060

CONCLUSIONES

1. El único antígeno que presenta características de buena calidad, en comparación con el antígeno "patrón", en cuanto a sus atributos de sensibilidad y especificidad es el identificado como Antígeno B ($X^2 = 0.690/o$ $P > 0.5$)

2. Los antígenos C,D, y E, a pesar de presentar una especificidad muy alta, en comparación al "patrón" establecido, no reúne los requisitos de buena calidad

$$\begin{aligned} \text{Ag'C: } X^2 &= 4.450/o < P < 0.05; \\ \text{Ag'D: } X^2 &= 17.050/o, P < 0.001. \\ \text{Ag'E: } X^2 &= 15.050/o P < 0.001 \end{aligned}$$

3. Los antígenos C,D y E por su baja sensibilidad, presentan bajo porcentaje de falsos positivos, por lo contrario presentan muy alto porcentaje de falsos negativos, constituyendo así un gran problema para la prueba diagnóstica ya que se está ignorando un número alto de casos positivos a la enfermedad.

RECOMENDACIONES

1. Las conclusiones obtenidas en la presente investigación respecto a las de los antígenos evaluados, son válidas respecto al antígeno que en este caso se definió como "patrón (VECOL).

En consecuencia para poder hacer inferencias más amplias es necesario que los

sueros examinados con los antígenos (PRUEBA Y PATRON) sean enfrentados con el antígeno Patrón Internacional.

2. Para efectos de comparaciones más exactas:

2.1 Las reacciones serológicas con los antígenos a evaluar "prueba" deberán ser cuantitativas (1:40 hasta 1:320).

2.2 Las reacciones serológicas con el antígeno "patrón", además de hacerse cuantitativas desde 1:50 hasta 1:200, se deberán efectuar igualmente a diluciones de 1:40 hasta 1:320.

2.3 Estos dos conceptos anteriores deben ser igualmente aplicables con el antígeno Patrón Internacional.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTON, G.G. y JONES, L.M. Las técnicas de laboratorio de brucelosis. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. p. 9-65 (Serie de monografías.55).
2. BRUSCH, L.A. and PARKER, R.L. Brucellosis in the United States. Revista Zoonosis 14 (3): 289-294, Sep. 1972.
3. CARTER, G.R. Procedimientos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinaria, 5 ed. Zaragoza, Acribia, 1969, p. 128.
4. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS: Técnicas e interpretaciones de las pruebas de seroaglutinación para el diagnóstico de la brucelosis bovina. Nota Técnica 1 (1): 1-9, 1968.
5. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. Elaboración y normalización de antígenos para las pruebas de seroaglutinación de la brucelosis. Nota Técnica 3(3): 1-21, 1969
6. COLIMON, K.M. Fundamentos de epidemiología. Medellín, Colombia 1978. p. 401-432.
7. FERNANDEZ M. Epidemiología de la brucelosis en relación con la brucelosis humana. Boletín de Salud Pública, 5 (13): 23-26, Jul. 1971.
8. FERNANDEZ, M. Epidemiología de la Brucelosis. Aspecto humano. Revista del Instituto Nacional de Higiene, 7 (1-2): 59-61, Mar. Jun. 1974.
9. FOZTENA, A. Mesa redonda. Seminario Nacional de Brucelosis 1, Caracas, 1974. Revista del Instituto Nacional de Higiene 7 (1-2): 167-330.
10. GARCIA C., C., Métodos para el diagnóstico de la brucelosis. Gaceta Veterinaria, 32 (246): 661-667, Dic. 1970.
11. GARCIA C.C. Bacteriología de la Brucelosis Revista del Instituto Nacional de Higiene, 7 (1-2): 69-73, Mar. Jun. 1974.

12. GARCIA C., C. Métodos de diagnóstico de laboratorio. *Revista del Instituto Nacional de Higiene*, 7 (1-2): 177-182, Mar. -Jun. 1974.
13. GOMEZ, L.J. La Brucellosis. Medellín Publicación Solla. 1975. p. 1.4.12.
14. KAPLAN, M. Brucellosis. A world problem. In: *Interamerican Congress on Brucellosis*, 3, Washington, Section, p. 6-14 1950
15. KOURAN, M. MARTINEZ, R. y VASQUEZ A., Encuesta seroepidemiológica por Brucellosis en Panamá. *Boletín Oficina Sanitaria Panamericana*, 75 (1): 65-70, Jul. 1973.
16. KOURANI, M. Martínez R. y VASQUEZ A. Encuesta seroepidemiológica en Población de alto riesgo en Panamá. *Boletín Oficina Sanitaria Panamericana Washington* 79 (3); 230-236. Sep. 1975.
17. MALAGA A., Epizootiología de la Brucellosis. *Boletín epidemiológico* 10 (3); 130-134, Jul. Agos. Sep. 1956.
18. MANTHEI. Ch. Mesa Redonda. Seminario nacional sobre Brucellosis. Caracas 1974. *Revista del Instituto Nacional de Higiene* 7(1-2): 77-87 Mar. Jun. 1974.
19. MERCHANT. D. y PARKER R. *Bacteriología y Virología Veterinarias*. Sed. Zaragoza, Acribia, 1965. p. 377-396.
20. MIRANDA P., L.D. Prevalencia de Brucellosis humana en hatos bovinos infectados y en mataderos del departamento del valle del Cauca Tesis de grado. Bogotá U. Nal. Instituto Colombiano Agropecuario ICA 1973. p. 1-42.
21. MOYA. V. BLOOD, y SZYFRES B. Uniformación del diagnóstico de la brucellosis en las Américas. *Boletín de la Oficina Panamericana* 57 (5): 415-424, Nov. 1964.
22. MUÑOZ, O. et. al Seroepidemiología de la Brucellosis en la República Mexicana. *Gaceta Médica Mexicana* 3 (2) Feb. 1976.
23. MURDOCK M.F. et al. Studies of the physical properties and agglutinability of brucella antigens used in the Americas, In: *Inter American Congress on brucellosis*, 3. Washington, Editorial Section 1950, p. 122-132.
24. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Comité mixto FAO/OMS de expertos en Brucellosis. Tercer informe, Ginebra. 1958. p. 7-11 (serie de informes técnicos 148).
25. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. Comité mixto FAO/OMS de expertos Brucellosis. Quinto informe. Ginebra, 1972, p. 38-44 Serie de informes técnicos, 289).
26. ORGANIZACION DE LA MUNDIAL DE LA SALUD. Comité mixto FAO/OMS de expertos Brucellosis. Quinto informe. Ginebra, 1972, p. 38-44 Serie de informes técnicos, 464.
27. ORTIZ M., C. Brucellosis. Algunos aspectos de su epidemiología en México. *Boletín epidemiológico*, 10 (3): 113-125, Jul-Sep. 1956.
28. PEREZ, F.J. ESTUPIÑAN, A. J. JIMENEZ, T., Manual de normas y procedimientos. Subproyecto de Sanidad Animal. Programa Nacional de combate de la Brucellosis. Bogotá, ICA, 1973, p. 93. (Manual administrativo, 4).
29. PHILIPS. L.A. Diagnóstico bacteriológico y biológico de la Brucellosis. In: *Inter-American Congress on Brucelosis*, 3. Washington, 1950. p. 165-176.
30. RENOUX, G.E. Aspect of human Brucellosis. In: *Seminary of Zoonoses*. Viena 1952. Roma, FAO/OMS. *Advances in the controls of Zoonoses*. p. 61-70 (Monograph Series 19).
31. RESTREPO, L.M. Comunicación personal. 1978.
32. RESTREPO M. NOREÑA, G.J. y MARIACA P. Estudio de la Brucellosis en manipuladores de carne comparado con un grupo de población general en Antioquia. *Antioquija Médica* 20(10): 571-576, 1970.

**SECRETARIA DE AGRICULTURA
Y FOMENTO DE ANTIOQUIA**

**Registro Oficial
de Producción Leche
R. O. P.**

UNICO SERVICIO EN EL PAIS, QUE LE PERMITE AL
GANADERO CONOCER EN CUALQUIER MOMENTO LA
SITUACION REAL DE SU HATO.

6029 EJEMPLARES DE LAS RAZAS HOLSTEIN, AYRSHIRE
Y PARDO SUIZO ATENDIDOS EN 76 HATOS EN LAS
DIFERENTES ZONAS PRODUCTORAS

27 AÑOS DE ARDUA LABOR EN BIEN DE LA
INDUSTRIA LECHERA DEL DEPARTAMENTO