

# ANTIGENICIDAD CRUZADA EN BRUCELOSIS BOVINA

## Crossantigenicity in Bovine Brucellosis

Armando Hoet\*  
 Antonio Landaeta\*  
 Alexis Mendoza\*\*  
 José A. Aranguren\*  
 Homero Martínez\*  
 Dubraska Díaz\*  
 Joel Sol\*  
 Dorelis Partidas\*

\* Facultad de Ciencias Veterinarias  
 Universidad del Zulia, Apartado 526  
 Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela  
 \*\* Ministerio de Agricultura y Cría (MAC)  
 Trujillo, Venezuela

### RESUMEN

Con el objetivo de determinar la posible inducción de reacciones antigénicas cruzadas, se usaron 40 machos vacunos enteros entre 12 - 14 meses de edad probados serológicamente libres de Brucelosis (sin títulos); dichos animales fueron distribuidos al azar en 4 grupos de 10 individuos cada uno, a los cuales se les aplicó los siguientes tratamientos: Levamisol 7.5% en dosis inmunomoduladora, Bacterina Triple Concentrada (*Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* y *Pasteurella multocida*), Vacuna Anti-Aftosa oleosa (serotipos O<sub>1</sub> y A<sub>24</sub>), y control. A los 30, 60 y 90 días postratamiento se practicaron las pruebas Aglutinación Rápida en Placa (ARP), Aglutinación Lenta en Tubo (ALT), y 2-Mercaptoetanol (ME). Se observó la aparición de animales con títulos (reactores) en todos los grupos y fechas, cuyos títulos fluctuaron a lo largo de todo el ensayo, específicamente en las pruebas ARP y ALT. Ningún animal reaccionó al ME. No hubo diferencia significativa ( $P > .05$ ) entre ninguno de los tratamientos y la aparición de reactores. Se concluye que los tratamientos aquí probados no inducen la aparición de reacciones antigénicas cruzadas en las pruebas para el diagnóstico de Brucelosis Bovina.

**Palabras clave:** Brucelosis, antigenicidad cruzada, bovinos.

### ABSTRACT

To determine the possible induction of crossantigenicity reactions, forty [40] non castrated bulls between 12 and 14 months age and tested serologically free of Brucellosis (without titles) were assigned in groups of 10 each one to four treatments: Levamisole 7.5% in immunemodulator doses; Concentrated Triple Bacterin (*Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum*, *Pasteurella multocida*); foot and mouth disease oil vaccine (serogroups O<sub>1</sub> and A<sub>24</sub>) and control. Slide Agglutination Test (SAT), Tube Agglutination Test (TAT), and 2-Mercaptoetanol test (ME) were performed 30, 60 and 90 days after treatment. Animals with titles (reactors) were seen in each group and date, these titles fluctuated through the assay, specially in SAT and TAT. None animal was reactor in ME. There was not significant association ( $P > .05$ ) between any treatment and reactors. It was concluded, that the treatments here employed do not induced the apparition of crossantigenicity reactions in the tests for diagnosis Brucellosis Bovine.

**Key words:** Brucellosis, crossantigenicity reactions, bovines.

### INTRODUCCIÓN

La Brucelosis bovina o Enfermedad de Bang, es una enfermedad infecciosa zoonótica que afecta primariamente a bo-

vinos, cabras y cerdos. Es causada por una bacteria patógena intracelular del género *Brucella*. Generalmente se manifiesta en hembras con abortos a partir del último tercio de la gestación, retención placentaria, metritis, lesiones localizadas en varios tejidos e infertilidad. No obstante pueden aparecer con frecuencia vacas infectadas asintomáticas que suelen abortar sólo una vez dando posteriormente becerros débiles e infectados, los cuales permanecen indetectados hasta la pubertad representando una fuente constante de infección [5,7,15]. En machos, con igual riesgo de infección que las hembras, la enfermedad cursa con inflamación de órganos genitales y glándulas sexuales anexas, lo que compromete seriamente su fertilidad [1].

La Brucelosis es de carácter prevalente en la mayoría de los países del Mundo, causando elevadas pérdidas económicas [5], al respecto Hoet [7] calculó las pérdidas ocasionadas por un aborto bruceloso en el orden de Bs. 319.000 (U.S \$ 1.822) considerando el valor del becerro, lactancia y otros costos inherentes al manejo. Ello hace de esta enfermedad una de las mayores prioridades en investigación, especialmente en América Latina, donde la prevalencia es tradicionalmente alta. Para el caso venezolano, en la región zuliana del Municipio Rosario de Perijá [16] reportan que la gran mayoría de las fincas presentan antecedentes de brucelosis y abortos, poca o ninguna eliminación de hijas de vacas brucelosas, así como una alta proporción de fincas reaccionantes a la Prueba del Anillo (Ring Test), señalando acerca de la posibilidad de infecciones latentes en algunos animales.

Como célula bacteriana la *brucella* puede ser dividida en varias fracciones, todas mayoritariamente antigénicas, en donde la fracción lipopolisacárida (LPS) de la pared celular es el principal elemento antigénico activo que a su vez es usado para diferenciar las cepas de brucelas lisas, rugosas y mucosas [3, 6, 21].

El antígeno inmunodominante de la mayoría de las cepas de campo de *Brucella abortus* (cepas lisas), es el lipopolisacárido s-LSP, específicamente en su fracción denominada cadena O, cuya composición química es N - ACETIL - 4 - AMINO - 4.6 DIDEOXI - D - MANOSA, compuesto que ha sido responsabilizado de las reacciones cruzadas que con frecuencia se producen entre *brucella* y una gran cantidad de bacterias generalmente GRAM negativas que poseen afinidad bioquímica [3].

Para el diagnóstico de esta enfermedad se ha venido usando una serie de pruebas serológicas convencionales (Aglutinación Rápida en Placa (ARP), Aglutinación Lenta en Tubo (ALT)) y complementarias (2 - Mercaptoetanol (ME), Card Test o Rosa de Bengala, Rivanol, Prueba del Anillo) [4]; así como otras más sofisticadas y de mayor confiabilidad como Fijación de Complemento y ELISA [21]. Destacando que en Venezuela el diagnóstico oficial de Brucelosis se realiza a través de las pruebas ARP, ALT, y ME. [9].

En los últimos años se han presentado dificultades con las pruebas convencionales debido al tipo de antígeno que utilizan (células bacterianas completas o extractos celulares crudos), dada la fuerte tendencia de éstos a formar complejos inespecíficos (reacciones cruzadas) que redundan en la aparición de falsos positivos [2, 3, 5, 10, 12]. Tales reacciones se encuentran con cierta regularidad en los test de aglutinación y hemaglutinación indirecta, siendo estos resultados rara vez confirmados mediante otros test serológicos [18].

La aparición de falsos positivos radica en la existencia de otras fuentes inductoras de anticuerpos distintas a *Brucella abortus*, que reaccionan contra la s - LPS de la pared celular presente en los antígenos comúnmente usados en las pruebas diagnósticas antes mencionadas [5, 8, 15, 18, 21].

Fuentes inductoras de falsos positivos por la vía de la reacción antigénica cruzada han sido reportadas ampliamente en la literatura, entre ellas se encuentran: *E. coli* O:157, *E. coli* O:116, *Yersinia enterocolitica* O:9, *Vibrio cholerae*, *Salmonella kauffman - white*, *Salmonella landau*, *Salmonella godesberg*, *Francisella tularensis*, *Campylobacter foetus*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira pomona*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella bovis* y *Pasteurella* sp. [3, 5, 8, 11, 12, 19, 20, 21].

También es reportada la aparición de falsos positivos debido a la producción de anticuerpos naturales o normales, generados por actividad antigénica de tipo heteróloga la cual se incrementa con la edad [18, 21].

Una tercera fuente de aparición de falsos positivos es señalada por Parez y Guerin [13], quienes tratando de explicar repentinas e inesperadas reacciones serológicas positivas en toros y machos cabríos aislados en centros de producción de semen concluyeron que, tales reacciones obedecieron al uso de jeringas contaminadas con vacuna contra brucelosis. Esta situación representa un caso típico de malas prácticas de manejo, por lo que es frecuentemente sugerido la esterilización con calor de las jeringas usadas en la vacunación con Cepa - 19, si es que se prevé su uso continuado en las explotaciones.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la posible inducción de reacciones antigénicas cruzadas, en las pruebas de diagnóstico de Brucelosis Bovina, mediante la utilización de drogas de efecto inmunomodulador, como el Clorhidrato de Levamisol [14], y de productos biológicos como: Bacterina Triple (*Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* y *Pasteurella multocida*) y vacuna contra Fiebre Aftosa (O<sub>1</sub> - A<sub>24</sub>) en presentación oleosa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación

El ensayo se desarrolló en un área del sector denominado El Mecocal, Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela, la cual se describe ecológicamente como Bosque muy Seco Tropical. El área estuvo despoblada de animales de granja por un

lapso mayor de 5 años. Adicionalmente se usó la quema controlada de corrales y potreros a fin de garantizar la ausencia de fuentes de infección.

### Grupo Experimental y Manejo

Estuvo conformado por un total de 40 machos vacunos enteros, con edades comprendidas entre 12 - 14 meses. Todos los animales recibieron el mismo manejo y alimentación, que consistió en pasto guinea (*Panicum maximum*) a nivel de potreros. El agua de bebida fue suministrada a través de un tanque previamente acondicionado.

El rebaño fue organizado en 4 grupos al azar, de diez (10) animales cada uno. Todos los animales fueron diagnosticados libres de brucelosis (sin títulos) previamente al ensayo, mediante las pruebas: Aglutinación Rápida en Placa, Aglutinación Lenta en Tubo, y 2 - Mercaptoetanol.

### Tratamiento

Una vez conformados los cuatro grupos, fueron aplicados los siguientes tratamientos:

- Grupo A: vacuna oleosa contra fiebre aftosa (Aftovac B<sup>®</sup>) serotipos 01 - A24; 5 cc vía intramuscular, una sola dosis.
- Grupo T: bacterina triple (Bacterina Triple Concentrada<sup>®</sup>): *Clostridium chauvoei*, *Clostridium septicum* y *Pasteurella multocida*, 2 cc vía subcutánea, una sola dosis.
- Grupo L: se les colocó una dosis inmunomoduladora de clorhidrato de levamisol (Ripercol 7.5%<sup>®</sup>) de 3 mgs/kg p.v. vía intramuscular, una sola dosis.

- Grupo C: no se les colocó ningún tratamiento biológico o droga. Conformaron el grupo control.

Todos los grupos tuvieron el mismo manejo zootécnico.

### Pruebas diagnósticas

A cada grupo se le realizó un conjunto de pruebas diagnósticas para brucelosis a los 30, 60, y 90 días posteriores al tratamiento; éstas fueron: Aglutinación Rápida en Placa (ARP), Aglutinación Lenta en Tubo (ALT) y 2 - Mercaptoetanol (ME) [4].

Todas las pruebas fueron acompañadas de sueros controles positivo y negativo, siendo procesadas en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia.

Cuando los sueros presentaban títulos se procedía a confirmarlos repitiendo las diferentes pruebas.

### Procesamiento y análisis de datos

A objeto de recopilar los resultados en el laboratorio se diseñó una tabla general para tal efecto.

Una vez culminada la recolección de datos se procedió a clasificar a los individuos como machos sin títulos (No Reactores)(NR) y con títulos (Reactores) (R) [21], para cada tratamiento y período, usando para ello la relación de los resultados de las pruebas ARP y ALT; tal y como se expresa en la TABLA I. En los casos en que los títulos variaban en una sola dilución entre las dos pruebas, se tomaban los resultados de la ALT como definitivos, ya que entre ambas la prueba lenta es la más específica y sensible [21]. Si la diferencia era más de dos diluciones se eliminaba la muestra [21].

TABLA I

### CLASIFICACIÓN DE LOS MACHOS SIN TÍTULOS (NO REACTORES) Y CON TÍTULOS (REACTORES) EN BASE A LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ARP Y ALT

Resultados		Final	Clasificación	Diagnóstico
ARP	ALT			
-	-	-	No react.	Negativo
I 1/25	-	-	No react.	"
+ 1/25	-	-	No react.	"
+ 1/25	I 1/25	I 1/25	React. 1/25	"
+ 1/25	+ 1/25	+ 1/25	React. 1/25	"
I 1/50	+ 1/25	+ 1/25	React. 1/25	"
+ 1/50	+ 1/25	+ 1/25	React. 1/25	"
+ 1/50	I 1/50	I 1/50	React. 1/50	Sospechoso
+ 1/50	+ 1/50	+ 1/50	React. 1/50	"
I 1/100	+ 1/50	+ 1/50	React. 1/50	"
+ 1/100	+ 1/50	+ 1/50	React. 1/50	"
+ 1/100	I 1/100	I 1/100	React. 1/100	Positivo
+ 1/100	+ 1/100	+ 1/100	React. 1/100	"

Posteriormente dichos resultados serológicos eran interpretados usando las Tablas Internacionales para bovinos no vacunados [4], TABLA I.

De esta manera se simplificó los datos para poder determinar más fácilmente si los tratamientos inducían la aparición de títulos de anticuerpos (animales reactivos) contra Brucelosis en animales sanos, y si en base a esos títulos podrían ser considerados negativos, sospechosos o positivos a la enfermedad.

Los datos obtenidos fueron analizados por distribución de frecuencias y por el método estadístico  $J^2$  (Chi - cuadrado), para lo cual se empleó el paquete estadístico computarizado SAS [17].

## RESULTADOS

### Grupo A: (Tratamiento Aftosa)

Los resultados obtenidos para el grupo tratado con vacuna oleosa contra aftosa se muestran en la TABLA II.

Se observó dos (2) reactivos a los 30 días postratamiento; uno sospechoso, el cual posteriormente no presentó títulos a los 60 y 90 días consecutivamente; y otro que se clasificó como reactor negativo, el cual se mantuvo reaccionando a los 60 días y 90 días.

Es importante señalar que todos los animales salieron negativos al 2-Mercaptoetanol durante todo el ensayo.

### Grupo T: (Tratamiento Bacterina Triple)

Los resultados obtenidos para el grupo tratado con Bacterina Triple se muestran en la TABLA III.

A los 30 días se observan dos (2) animales reactivos (con títulos), pero negativos serológicamente a la enfermedad. El primero mantuvo sus títulos a los 60 y 90 días como reactor negativo; en cambio el segundo no volvió a presentar títulos (No Reactor).

A los 60 días postratamiento se detectó un (1) nuevo animal reactor negativos, el cual a los 90 días le desaparecen los títulos.

TABLA II

#### COMPORTAMIENTO SEROLÓGICO DEL GRUPO A

Nº Animales	30 días	60 días	90 días
157	NR	NR	NR
56	NR	*	*
145	NR	NR	NR
100	NR	NR	RN <sup>b</sup>
114	RN <sup>b</sup>	RN <sup>b</sup>	RN <sup>b</sup>
45	NR	NR	NR
93	NR	NR	NR
104	NR	NR	NR
105	RS <sup>a</sup>	NR	NR
107	NR	NR	NR

NR = No Reactor. RS<sup>a</sup> = Reactor. Sospechoso. RN<sup>b</sup> = Reactor Negativo. \* = Muestra perdida.

TABLA III

#### COMPORTAMIENTO SEROLÓGICO DEL GRUPO T

Nº Animales	30 días	60 días	90 días
101	NR	NR	NR
153	NR	NR	NR
166	NR	NR	NR
191	NR	RN <sup>b</sup>	NR
530	NR	NR	NR
53	RN <sup>a</sup>	RN <sup>a</sup>	RN <sup>a</sup>
110	NR	NR	NR
40	NR	NR	NR
172	RN <sup>a</sup>	NR	NR
109	NR	NR	NR

NR = No Reactor. RN<sup>a</sup> = Reactor Negativo.

TABLA IV

## COMPORTAMIENTO SEROLÓGICO DEL GRUPO L

Nº Animales	30 días	60 días	90 días
170	RS <sup>a</sup>	RN <sup>b</sup>	NR
135	NR	NR	NR
122	NR	NR	NR
293	NR	NR	NR
0189	NR	NR	NR
169	NR	RN <sup>b</sup>	NR
92	RS <sup>a</sup>	RS <sup>a</sup>	RN <sup>b</sup>
39	NR	NR	NR
159	RN <sup>b</sup>	NR	NR
26	NR	NR	NR

NR = No Reactor. RS<sup>a</sup> = Reactor Sospechoso. RN<sup>b</sup> = Reactor Negativo.

TABLA V

## COMPORTAMIENTO SEROLÓGICO DEL GRUPO C

Nº Animales	30 días	60 días	90 días
91	NR	NR	NR
71	NR	NR	NR
60	NR	NR	NR
21	NR	NR	NR
133	NR	NR	NR
15	NR	RN <sup>a</sup>	RN <sup>a</sup>
190	RN <sup>a</sup>	NR	NR
148	NR	*	NR
94	NR	RN <sup>a</sup>	NR
119	NR	NR	NR

NR = No Reactor. RN<sup>a</sup> = Reactor Negativo.. \* = Muestra perdida.

No aparecieron nuevos animales reactores a los 90 días; destacando que todos los animales salieron negativos al 2-Mercaptoetanol a lo largo del ensayo.

**Grupo L: (Tratamiento Levamisol)**

Los resultados obtenidos para este grupo se muestran en la TABLA IV.

A los 30 días postratamiento se detectaron tres (3) animales reactores, dos (2) sospechosos y uno (1) negativo a brucelosis según las pruebas; los dos primeros a los 60 días seguían reaccionando, pero uno era considerado negativo, mientras que el otro se mantenía como sospechoso; y el tercer animal no presentó títulos. A los 90 días sólo uno de los anteriores se mantuvo reaccionante.

Igualmente un (1) nuevo reactor negativo apareció a los 60 días; pero no así a los 90 días. También en este grupo ningún animal salió positivo al 2-Mercaptoetanol.

**Grupo C: (Control)**

Los resultados obtenidos para este grupo se ofrecen en la TABLA V.

En este grupo no debió aparecer reactores, sin embargo a los 30 días se detectó un (1) animal reactor negativo, cuyo título no perduró a los 60 y 90 días. Igualmente, a los 60 días aparecieron dos (2) nuevos reactores negativos, de los cuales uno reaccionó a los 90 días, mientras que el otro no.

**Proporción de Reaccionantes**

Tales valores se muestran en la FIGURA I.

Para el lapso comprendido entre 0 - 30 días, 8 (20%) animales resultaron reactores del total de 40.

A los 60 días, el número de animales reaccionantes fue de 8 (21,05%), en un total de 38, de los cuales cuatro (50%)

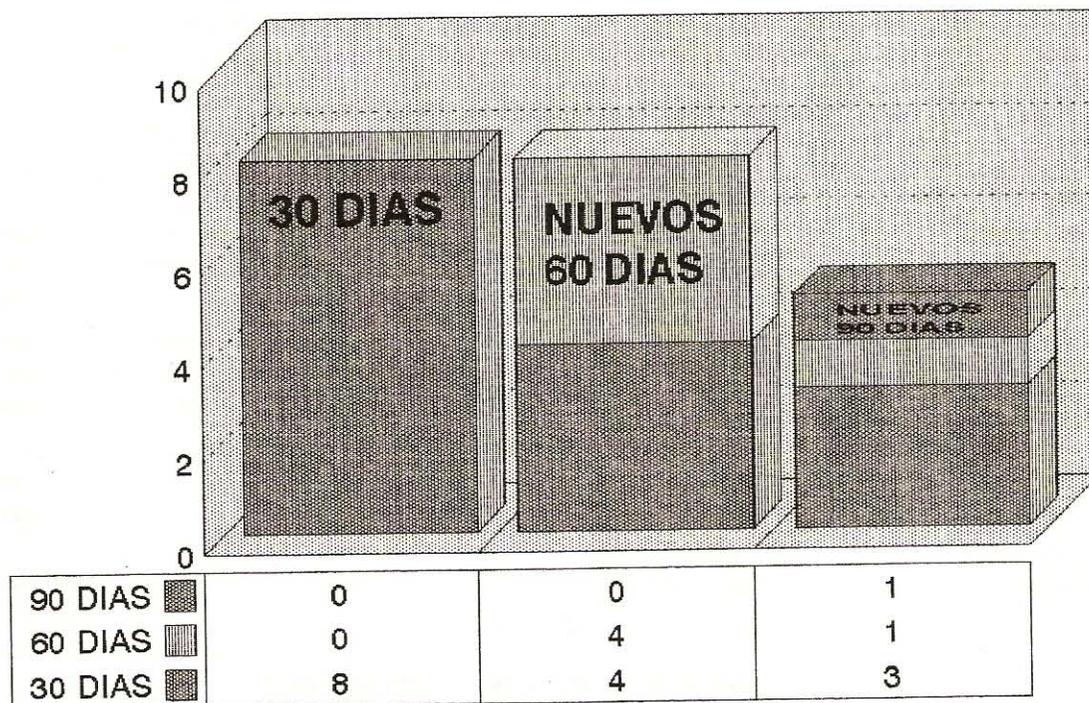


FIGURA 1. PROPORCIÓN DE REACTORES POR PERÍODO.

vienen reaccionando desde el lapso anterior y cuatro (50%) son nuevos reaccionantes.

A los 90 días, el número de animales reaccionantes disminuyó a 5 (12,82%) del total de 39. Resulta importante señalar que tres (60%) de éstos, fueron animales que se mantuvieron reaccionando desde el primer lapso; uno (20%) desde los 60 días, en tanto que sólo un reactor (20%) apareció en este último período.

#### Análisis estadístico

El test estadístico chi-cuadrado no arrojó asociaciones significativas ( $P > .05$ ) entre ningún tratamiento y la aparición de reactores totales, negativos o sospechosos.

#### DISCUSIÓN

Un rebaño de machos aislados no debería presentar ningún tipo de reacción antigénica (títulos de anticuerpos) a *Brucella abortus*, debido a la falta de contacto con el germen en forma natural (infección) o artificial (vacunación).

Sin embargo, en este ensayo fueron hallados un alto porcentaje de reactores (25%), es decir, machos con títulos contra brucelas detectados a través de las pruebas Aglutinación Rápida en Placa y Lenta en Tubo, algunos de los cuales llegaron a ser catalogados como sospechosos a la enfermedad. No obstante no existió ninguna asociación estadística entre la aparición de reactores y los tratamientos aplicados, coincidiendo con lo reportado por Saiduldin [18].

El descenso de los títulos en la mayoría de los animales en un breve período, llegando a desaparecer en algunos casos; la permanente negatividad a la prueba 2-Mercaptoetanol de todos los animales; y la irregularidad de la aparición de machos reactivos a lo largo del ensayo, no relacionado con los tratamientos; sugiere que existió algún factor que indujo la formación de anticuerpos que causaron reacción en las pruebas desarrolladas (ARP y ALT). Esto abre la posibilidad de que dichos reactores se deban a otras fuentes inductoras de anticuerpos distintas a la Brucela, las cuales no se pudieron estudiar en este trabajo y que fueron citadas en la introducción.

#### CONCLUSIONES

- Ninguno de los tratamientos (Vacuna Aftosa, Bacterina triple, Levamisol) pudo ser asociado estadísticamente como responsable de provocar reacciones antigénicas cruzadas.

- Existió un elemento no identificado que indujo a un alto porcentaje de animales a generar reacciones inmunes de tipo cruzada, que en condiciones prácticas y rutinarias hubiesen calificado falsamente a algunos machos como sospechosos a brucelosis.

- Cuando se requiere información diagnóstica, económica y rápida sobre un conjunto de antígenos, es comprensible el uso de células bacterianas completas o extractos crudos. Sin embargo, a medida que tanto las inquietudes científicas como las necesidades diagnósticas se hacen más complicadas y refinadas, los antígenos deben ser más selectivos. Es por ello que en la actualidad, las pruebas rápidas en placa y lenta

en tubo, no parecen tener la suficiente especificidad para tomar decisiones, en especial cuando se trata de animales de gran valor.

## RECOMENDACIONES

- Este ensayo ha generado más interrogantes que respuestas, las cuales deberían ser aclaradas a la luz de nuevos y exhaustivos trabajos en donde se consideren y afinen otros factores inductores; y a su vez se usen pruebas más específicas y sensibles como ELISA y Fijación de Complemento, para comparar con las pruebas rutinarias.

- Mejorar los antígenos usados en las pruebas ARP y ALT, a fin de incrementar la especificidad de éstas, manteniendo así su valor diagnóstico, por cuanto resultan pruebas rápidas y económicas.

- Establecer algún tipo de control sobre las posibles fuentes proveedoras de gérmenes involucrados en la producción de reacciones cruzadas, a fin de disminuir el número de casos falsos positivos que éstos pudiesen generar.

- Animales hallados reaccionantes en ARP y ALT deben ser verificados bajo la comparación con otras pruebas más específicas como las que prevé la Legislación de Sanidad Animal (Rosa de Bengala, 2-Mercapto-etanol) u otras más sofisticadas como Fijación de Complemento ó ELISA .

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al personal del Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. Así como al propietario y personal de la Hacienda Manantiales, y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por su apoyo al proyecto "Evaluación del Comportamiento de Mestizos F1 de Razas Cárnicas no Tradicionales", del cual fueron obtenidos los animales para este ensayo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Blood, D.C.; Henderson, J.A. y Radostits, O.M. Medicina Veterinaria. 6<sup>ta</sup> edición. Editorial Interamericana D.F. México. 662-674. 1986.
- [2] Carmichael, L.E. and Joubert, J.C. A Rapid slide agglutination test for the serodiagnosis of *Brucella canis* infection that employs a variant (M-) organism antigen. Cornell Veterinarian. 77 (1):3-12. 1987.
- [3] Cherwonogrodzky, J. y Mariño, J.O. Antígenos de *Brucella* y su posible aplicación en ensayos inmunoenzimáticos. Revisión de Literatura. Revista ICA. vol. 25. Nº 2: 99-111. 1990.
- [4] Estrada P. E. Procedimientos de diagnóstico de enfermedades infecciosas en los animales domésticos. 1<sup>era</sup> edición. Editorial de la Universidad del Zulia (EDILUZ). Maracaibo, Venezuela. 44-80. 1987.
- [5] Forero de Lleras, C.; Rueda de Clavijo, E.; De León, L.; Mariño, O.; y Montes de Gómez, V. Comparación de Metodologías para la purificación de Proteínas de Membrana Externa de *Brucella abortus*. Revista ICA. Vol. 25. No. 3: 193-201. 1990.
- [6] Gómez, G.; Moreno, L.A.; and Umana, G. Production of a Vaccine based on antigenic fractions of *Brucella abortus*. Networking in Brucellosis Research. Report of the United Nations University. Edited by Frank, J.F.J. United Nations University Press. 33 - 47. 1991.
- [7] Hoet, A. Pérdidas Económicas por Abortos Causados por *Brucellas* y *Leptospiras*. En: Ganadería Mestiza de Doble Propósito. Eds. Ninoska Madrid Bury y Eleazar Soto Belloso. Universidad del Zulia, Maracaibo, Zulia, Venezuela. 153-175. 1995.
- [8] Kirkman, D.; Watson, D.L.; Campbell, R.S.F.; and Mc Nicholl, L.G. Serological cross Reactivity in the diagnosis of Bovine Brucellosis in Northern Australia. Australian Veterinary Journal. 56(2): 93. 1980.
- [9] Ministerio de Agricultura y cría. Legislación de Sanidad Animal. Edit. por Departamento de Divulgación Pecuaria. Caracas. Venezuela. 76. 1987.
- [10] Mariño, O.; Gallego, M.; Sedano de L. Y Almansa, J. Comparación de técnicas serológicas en la evaluación de Bovinos infectados naturalmente por *Brucella abortus*. Revista ACOVEZ. 1491:27-32. 1987.
- [11] Nielsen, K.; Samagh, B.S.; and Stenshorn, B. Agglutination of *Brucella abortus* cells by sera from cattle experimentally infected with *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology. 5(2):123-134. 1980.
- [12] Nielsen, J.; Duncan, J.R.; Stenshorn, B. and Ruckerbaner, G. Relationship of humoral factors (antibody and complement) Immune Responsiveness, Resistance and diagnostic serology. In J.E. Buttler (edit.) The Ruminants immune System. Plenum Press. N.Y. 367-389. 1981.
- [13] Parez, M. and Guerin, B. Serological Reactions for Bovine Brucellosis in isolated groups of male animals due to contaminated syringes. Bulletin de L' Academie Veterinaire de France. 54(1):65-80. 1981.
- [14] Pedroso - Reyes, M. Inmunoestimulantes y su empleo en la profilaxis del Ternero. Centro Nacional De Sanidad Agropecuaria (CENSA). La Habana, Cuba. 103-117. 1989.

- [15] Richey, E.J. Eliminate Brucellosis from Beef Herds. Veterinary Medicine Extension. Circular 856. University of Florida. College of Veterinary Medicine. 11. 1992.
- [16] Rivera - Pirela, S.; Curiel, J.; Rojas de Guanipa, N.; Sangroni, I. y Urdaneta, N. Epidemiología Serológica de la Brucelosis Bovina en el Municipio Rosario de Perijá. (Zulia - Venezuela). Revista Científica F.C.V. - LUZ. Vol. V. N° 2: 117-124. 1995.
- [17] Statal Analysis System (SAS). Institute Inc. University North of California. Ver. 6.04. 1991.
- [18] Saiduldin, T.S. Influence of Normal Antibody on the Serological diagnosis of Brucellosis in Cattle. Veterinaria Mosow. USSR. N° 6: 68-70. 1983.
- [19] Stuart, F.A and Corbel, M.J. Identification of a serological Cross-Reaction Between *Brucella abortus* and *Escherichia coli* 0:157. Veterinary Record. 110(9): 202-203. 1982.
- [20] Szabo, R.; Todd, E.; Mckenzie, J.; Parrington, L.; and Armstrong, A. Applied and Environmental Microbiology. 56(11): 3546-3549. 1990.
- [21] World Health Organization. Joint FAO/WHO. Expert Committee on Brucellosis, Sixth Report. Technical Report Series. 740, 132 pp. 1986.