

CATEDRA DE MICROBIOLOGIA
Catedrático: Dr. S. OVEJERO DEL AGUA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA PRUEBA DEL ANILLO (RING-TEST) EN LA BRUCELOSIS OVINA Y CAPRINA

*Por el Prof. S. Ovejero
Dr. F. Rejas
Dr. F. Villalón*

Desde que en 1937 FLEISCHHAÜER describió por vez primera la técnica de la Prueba del Anillo, basándose en la reacción de *Scherrn-Gorli*, hasta nuestros días, las investigaciones realizadas en torno a la misma y a sus aplicaciones en el diagnóstico de la brucelosis en las diversas especies animales han sido extremadamente amplias.

La Prueba del Anillo, Abortus-Bang Ring Probe (ABR), de los franceses, o Ring Test (RT) de los anglosajones, ha sido y es utilizada con gran éxito en la erradicación de la Brucelosis bovina de casi todos los países del mundo, por la comodidad que representa poder realizar el diagnóstico en leches de mezcla, bien en el mismo establo o a la llegada de la leche a las Centrales Lecheras.

Comprobada la eficiencia de esta prueba en el diagnóstico de la Brucelosis bovina, se han realizado numerosos intentos para aplicar esta técnica al diagnóstico de la Brucelosis ovina y caprina.

Sin embargo, y a pesar de estos intentos, los resultados obtenidos en óvidos son contradictorios (cerca del 75 por ciento, BIGGI, FAO-OMS), y en cápridos —aunque en leches de mezcla la prueba es sensible—, con leches individuales se obtienen alrededor del 20 por ciento de resultados falsamente positivos (FAO-OMS).

A la vista de estos resultados contradictorios, del gran interés que tendría encontrar una técnica segura en el diagnóstico de la Brucelosis en estas especies de tan gran censo en España, y de la “necesidad de realizar nuevas investigaciones sobre este punto” (Comité Mixto FAO-OMS de expertos en Brucelosis, 1958), decidimos estudiar este problema.

Nuestros ensayos han sido realizados sobre ovejas y cabras en producción, infectadas experimentalmente y han sido comprobadas las técnicas más usuales de diversos investigadores, de las que haremos mención, así como de las modificaciones efectuadas.

En el transcurso de esta publicación citaremos en primer lugar la tecnología de la prueba y factores que la influyen, seguidamente la experiencia de diversos autores, para finalizar con nuestros resultados experimentales.

TECNOLOGIA DE LA PRUEBA DEL ANILLO Y FACTORES QUE LA INFLUENCIAN

La Prueba del Anillo se basa en que al poner en contacto un antígeno específico de brucelas teñidas, con leche con aglutininas brucelósicas, se forma el complejo antígeno-anticuerpo que absorbido por los glóbulos de grasa y arrastrado por los mismos en su marcha ascensional, dando lugar a un anillo coloreado en la línea de crema.

Parece ser que la reacción se realiza instantáneamente, pero para que sea visible es preciso que la crema ascienda a la superficie, dando lugar al anillo. Como la velocidad ascensional de los glóbulos de grasa, según la fórmula de Stokes, es directamente proporcional al tamaño de los glóbulos e inversamente proporcional a la viscosidad, los factores primordiales que influenciarán la Prueba del Anillo serán éstos. La realidad comprueba la teoría, pues la prueba marcha bien en especies con leche de viscosidad pequeña y glóbulos de grasa de gran diámetro (vacuno), y mal en especies con leche de gran viscosidad y con glóbulos de pequeño diámetro (óvidos y cápridos). Incluso en leche de bóvidos pueden encontrarse alteraciones en la reacción motivada por la raza, por

períodos de lactación, y por enfermedades, que modifican el tamaño de los glóbulos y la viscosidad.

La temperatura también influye en la prueba, siendo la óptima la de 37°. Temperaturas de 78° hacen perder a los glóbulos de grasa la facultad de fijar el complejo antígeno-anticuerpo.

El tiempo de incubación de la prueba es esencial para poder discernir sobre la positividad o negatividad de la misma. La formación del complejo aglutinina-antígeno es instantánea, pero para que la reacción se haga visible es preciso un período de tiempo determinado. Para FLEISCHHAÜER la reacción se manifiesta entre los 15 y 40 minutos; SEELEMANN y MANTOVANI opinan que son necesarios por lo menos 25 minutos; BENDTSEN asegura que a los 15 minutos empieza a ser visible la reacción. En general la mayoría de los autores están de acuerdo en que la reacción está terminada a la hora, y que a los 30 minutos está casi formado el anillo, con decoloración parcial de la leche.

El grado de frescura de la leche tiene gran importancia en la prueba, y a pesar de que los diversos investigadores no han estudiado a fondo la influencia de la acidez de la leche sobre la Prueba del Anillo están todos de acuerdo en admitir que la leche debe ser lo más fresca posible. A temperaturas de 4° puede conservarse bien y no interferir la prueba durante siete días. Conservar la leche en estas condiciones durante un lapso de tiempo más prolongado no es prudente, a pesar de que las aglutininas resisten bien durante seis meses (ERBIN). A veces pueden interferir la reacción los gérmenes de contaminación de la leche, pues los restos de tetrazol del antígeno los tiñen y se manifiestan con ligera coloración del anillo.

La naturaleza del antígeno puede influenciar la marcha y resultado final de la prueba, KLASTLI y BRUHN han encontrado diversos resultados con diferentes antígenos en una misma muestra. Es esencial que los antígenos no tengan las células lisadas, y no sean preparados a partir de cepas disociadas de brucelas.

EXPERIENCIA DE DIVERSOS AUTORES SOBRE LA PRUEBA DEL ANILLO EN OVEJAS Y CABRAS

SEELEMANN al objeto de rebajar la viscosidad de la leche de cápridos y óvidos y dotarlas de glóbulos de grasa más grandes, facilitando así la formación del anillo, mezcla a partes iguales leche de vaca nega-

tiva, con la leche de cabra u oveja problema. Esta técnica mejora notablemente la reacción.

DUBOIS acelera la formación del anillo con la ayuda de leche de vaca y mediante la fuerza centrífuga. La prueba resulta notablemente favorecida.

JEPSEN intenta mejorar la formación del anillo prolongado el tiempo de la reacción, incubando a 37° una hora y 12 horas más a 4°. Los resultados no son convincentes.

PARTE EXPERIMENTAL

Sobre un lote de ovejas y cabras en producción lactea, infectadas experimentalmente, nos propusimos comprobar las experiencias realizadas por los autores citados anteriormente e investigar sobre algunos puntos que consideramos de interés. Estos puntos fueron los siguientes:

Influencia de la fuerza centrífuga.

Influencia del tiempo de incubación.

Influencia de diversos disolventes de grasa, y modo de empleo de los mismos.

Influencia de la acidez de la leche.

Relación entre títulos de suero-aglutinación y la Prueba del Anillo y sus variantes.

Aplicación a las leches de mezcla, de las pruebas que resultasen positivas en leches individuales.

En este ensayo hemos utilizado antígenos coloreados Bendtsen-Tretazolium y de Hematoxilina, cedidos amablemente por los Doctores A. THOMSEN, de Copenhague, A. W. STABLEFORTH, del Central Veterinary Laboratory de Weybridge, y el Profesor Dr. SEELEMANN, del Institut für Milchygiene de Kiel. A ellos nuestro agradecimiento por su gentileza.

PRUEBA DEL ANILLO

Técnica.—Depositar 1 cc. de leche en tubo de hemolisis lo suficientemente estrecho para que la altura de leche sea de uno y medio a dos centímetros. Agregar una o dos gotas de antígeno. Emulsionar sin formación de espuma. Incubación a 37° una hora.

Lectura e interpretación:

Ovejas.—Positiva fuerte: Anillo coloreado de dos a tres milímetros de espesor, masa de la leche totalmente decolorada y fondo decolorado con ligeros precipitados coloreados.

Positiva débil: Anillo coloreado de uno o dos milímetros de espesor, masa de la leche parcialmente decolorada, fondo con ligeros precipitados coloreados.

Negativa: Anillo blanquecino, masa y fondo uniformemente coloreados.

Cabras.—Positiva fuerte: Anillo blanquecino o coloreado de uno o dos milímetros de espesor, masa decolorada, fondo con gruesos flóculos coloreados.

Positiva débil: Anillo blanquecino, masa parcialmente decolorada con gruesos flóculos coloreados, a veces, fondo con flóculos coloreados.

Negativa: Idéntica a oveja.

Resultados y discusión:

Leches individuales.—Como se ve existen fuertes diferencias en esta prueba entre las leches de oveja y cabra, en las primeras en caso positivo siempre aparece anillo, mientras que en las segundas generalmente se manifiestan con fondos positivos, y solamente con títulos de SA (suero-aglutinación) muy altos (1/5120 en adelante) aparecen anillos coloreados. El origen del antígeno tiene influencia sobre este punto, los que con más frecuencia nos han dado anillo, han sido el antígeno de tetrazolium y uno de hematoxilina de origen danés.

Con títulos de SA de 1/40-1/80 la Prueba del Anillo es negativa tanto en ovejas como en cabras. Comienzan a ser positivas con títulos de SA de 1/160 en adelante.

Leches de mezcla: La Prueba del Anillo da resultados positivos en ovejas hasta diluciones en leche negativa del 1/5, 1/10 y 1/20 con títulos de SA (en la oveja infectada) de 1/640, 1/2560 y 1/5120 respectivamente. En cabras la prueba es positiva hasta diluciones del 1/20, 1/40 y 1/80, con títulos de SA de 1/1280, 1/5120 y 1/10240 respectivamente.

Como se puede apreciar en los datos anteriores, la Prueba del Anillo es muy poco sensible para detectar aglutininas brucelósicas en leche de mezcla de ovejas y poco sensible en las de cabra, necesitándose títulos de SA muy elevados para poder detectarlas en leches de mezcla de cualquier rebaño.

PRUEBA DEL ANILLO MODIFICADA, SEGUN SEELEMANN

Técnica: Depositar medio centímetro cúbico de leche de oveja o cabra, más medio centímetro cúbico de leche de vaca negativa en tubo de hemolisis, añadir una o dos gotas de antígeno. Emulsionar sin espuma. Incubar a 37° una hora.

Lectura e interpretación:

Ovejas.—Se manifiesta exactamente igual que en la Prueba del Anillo, considerándola positiva si aparece el anillo coloreado y la masa de la leche se decolora, y negativa la no aparición del anillo y la no decoloración de la leche.

Cabras.—Las pruebas positivas se caracterizan por aparición del anillo coloreado, masa de la leche total o parcialmente decolorada, y fondo decolorado o con flóculos coloreados en títulos de SA de 1/160 en adelante. Las negativas aparecen con anillo blanquecino, y masas y fondos coloreados.

Resultados y discusión:

Leches individuales: Esta técnica favorece indudablemente la reacción al disminuir la viscosidad de la leche y aportar glóbulos grasos de mayor tamaño con la adición de leche de vaca negativa.

En ovejas y cabras con títulos de SA de 1/40-1/80, en los que la Prueba del Anillo fracasa, con esta técnica se logran resultados positivos aunque no positivos netos, pues a pesar de formarse el anillo la masa de la leche no queda totalmente decolorada. Esto es lógico, pues no debemos olvidar que al añadir la leche de vaca diluimos al 50 por ciento la concentración de aglutininas.

Leches de mezcla: En ovejas con títulos de SA de 1/640 en que la Prueba del Anillo da resultados positivos hasta una dilución de la leche de 1/5, se logran con esta modificación resultados positivos hasta diluciones del 1/15. En cabras mejora también la reacción, dando resultados positivos hasta diluciones de leche del 1/50, con títulos de SA del 1/1280, en los que la Prueba del Anillo es positiva hasta diluciones del 1/20.

Si consideramos nuevamente que al añadir leche de vaca negativa, diluimos al 50 por ciento la tasa de aglutininas, tenemos que reconocer el gran papel que juega en esta reacción la disminución de la viscosi-

dad y aumento del tamaño de los glóbulos de grasa, al lograr que se manifiesten como positivas leches de mezcla triplemente diluidas en las que fracasa la Prueba corriente del Anillo.

PRUEBA DEL ANILLO MODIFICADA, SEGUN DU BOIS

Técnica: Depositar medio centímetro de leche de oveja o cabra, más medio centímetro de leche de vaca negativa, y una o dos gotas de antígeno en tubo de hemolisis. Emulsionar. Incubación a 37° una hora en baño maría o estufa. Centrifugar a 500-1.000 rpm. durante cinco minutos.

Lectura e interpretación:

Ovejas.—Las pruebas positivas se manifiestan después de la incubación, con anillo coloreado, masa de leche total o parcialmente decolorada y fondo no coloreado. Después de la centrifugación el anillo coloreado es más neto, la masa suele estar totalmente decolorada y en el fondo suele aparecer un característico precipitado coloreado. Si es negativa la prueba, el anillo es blanquecino, la masa de la leche coloreada, decolorándose parcialmente después de la centrifugación, con aparición de precipitado coloreado en el fondo.

Cabras.—La reacción se manifiesta exactamente igual que en las de oveja, excepto en los casos positivos con títulos de SA de 1/160 en adelante, en que en los fondos aparece una masa amplia de flóculos coloreados.

Resultados y discusión:

Leches individuales: En esta prueba la acción de la leche de vaca se auna con la fuerza centrífuga para conseguir una gran velocidad ascensional de los glóbulos de grasa.

Con títulos de SA de 1/40-1/80, con pruebas del Anillo negativas, esta técnica da resultados positivos netos. Conviene no confundir los precipitados coloreados que suelen aparecer en los fondos por efecto de la fuerza centrífuga, con la masa de flóculos coloreados que además del anillo suelen presentar las leches de cabra con título de SA superior a 1/160.

Leches de mezcla: En ovejas con títulos de SA de 1/640 dan con esta técnica resultados positivos netos hasta una dilución del 1/15, frente

al 1/5 que da la Prueba del Anillo. En cabras mejora también la reacción permitiendo obtener resultados positivos con SA del 1/1280 hasta diluciones del 1/50, frente al 1/20 de la Prueba del Anillo.

PRUEBA DEL ANILLO MODIFICADA UTILIZANDO DISOLVENTES DE GRASAS

Inspirados en la modificación de ANCZYKOWSKI a la prueba de la lacto-aglutinación en bóvidos y cápridos, mediante tratamiento previo de la leche con cloroformo al objeto de descremarla, pensamos que quizá los disolventes de las grasas pudieran jugar un importante papel sobre la Prueba del Anillo en cápridos y óvidos, por lo que decidimos investigar ampliamente sobre el empleo de estos disolventes en la reacción.

Hemos encontrado dos técnicas de trabajo con disolventes, denominadas por nosotros pruebas "lenta" y "rápida" con disolventes, con las que se consiguen resultados excelentes, mejorando ampliamente la Prueba del Anillo.

Los disolventes empleados en estas pruebas fueron cuatro: Cloroformo, tetracloruro de carbono, xilol y éter. Con los dos primeros encontramos idéntico comportamiento y mejora de la reacción. Con el xilol se consiguen reacciones muy variables, y numerosas veces las interfiere. El éter no es útil por volatilizarse rápidamente.

Técnica de las Pruebas:

Prueba lenta con disolventes de grasas.—Depositar en un tubo de hemolisis un cc. de leche de oveja o cabra, más 0,2 cc. de cloroformo o tetracloruro de carbono. Agitar. Reposo a 37° durante 24 horas. Hacer Prueba del Anillo.

Prueba rápida con disolventes de grasas.—Depositar en tubo de hemolisis un cc. de leche de oveja o cabra, más 0,2 cc. de cloroformo o tetracloruro de carbono. Agitar. Hacer Prueba del Anillo.

Lectura e interpretación:

En ambas pruebas las reacciones positivas se manifiestan tanto en ovejas como en cabras, con un fondo con disolvente, anillo coloreado en el límite de disolvente y leche, y masa de leche total, o parcialmente

te decolorada, presentando a veces grumos coloreados. En los casos negativos no aparece anillo coloreado en el límite de disolventes y leche, permaneciendo ésta uniformemente coloreada.

Resultados y discusión:

Los fundamentos físico-químicos del empleo de los disolventes no son muy claros. En nuestras técnicas "rápida" y "lenta", probablemente el disolvente al estar en contacto con la leche, disuelve parte de los glóbulos de grasa, arrastrando al complejo antígeno aglutinina y depositándolo en el límite del disolvente y leche.

Leches individuales: Las pruebas lenta y rápida con disolventes, en especial esta última mejoran la reacción, dando resultados positivos en leches de oveja y cabra, con título de SA de 1/40-1/80, con Prueba del Anillo negativa.

Leches de mezcla: Ambas pruebas mejoran de tal forma la Prueba del Anillo, que se pueden conseguir resultados positivos netos sobre muestras de leche de oveja (SA 1/640) diluidas con leche negativa al 1/30, frente a Pruebas de Anillos positivas hasta dilución al 1/5. En leches de cabras (SA 1/1280), se logran pruebas positivas hasta diluciones de 1/60, frente a Pruebas de Anillo positivas hasta el 1/20.

Como se advierte esta prueba se comporta mejor en leches de oveja que en leches de cabra.

PRUEBA DEL ANILLO MODIFICADA POR LA FUERZA CENTRIFUGA

Técnica: Depositar un cc. de leche de oveja o cabra más una o dos gotas de antígeno sobre tubo de hemolisis. Emulsionar. Incubar una hora a 37°. Centrifugar a 500-1000 rpm, cinco minutos.

Lectura e interpretación:

Idéntica a la Prueba del Anillo modificada según DUBOIS. En cabras después de centrifugar manifiesta un anillo ligero que se hace neto con título de SA de 1/640 en adelante.

Resultados y discusión.

La acción de la fuerza centrífuga aumentando la velocidad ascensional de los glóbulos grasos hace suponer que lograría una mejora de resultados en la Prueba del Anillo. Así sucede en efecto, pero la me-

jora es tan ligera que predispone a pensar que existen otros factores tan fundamentales o más que éste en la marcha de la reacción.

Leches individuales: Tanto en ovejas como en cabras con títulos de SA de 1/40-1/80; con Prueba del Anillo negativa, se logran resultados positivos ligeros.

Leches de mezcla: En leches de oveja, (con título SA 1/640 y Prueba del Anillo positiva hasta dilución 1/5), se logran resultados positivos hasta diluciones al 1/10. En leches de cabra, con títulos de SA 1/1280 y Prueba del Anillo positiva hasta dilución 1/20, se consiguen resultados positivos hasta diluciones del 1/50.

PRUEBA DEL ANILLO MODIFICADA POR LA ADICION DE SUERO SANGUINEO

Técnica: Agregar a un cc. de leche de cabra o de oveja, 0.1 cc. de suero sanguíneo del mismo animal. Realizar sobre esta mezcla la Prueba del Anillo.

Lectura e interpretación:

Ovejas.—La reacción positiva presenta anillo coloreado, masa decolorada, y fondos con flóculos coloreados. En casos negativos no se marca el anillo, la masa de leche aparece uniformemente coloreada igualmente que el fondo.

Cabras.—Las reacciones positivas se manifiestan con masas de leches decoloradas y fondos con flóculos coloreados. Cuando el índice de SA es del 1/640 en adelante suelen presentarse con frecuencia anillos coloreados. Las reacciones negativas se manifiestan igual que las de oveja.

Resultados y discusión:

El aporte de aglutininas a la leche permite presentar como positivas leches que en la Prueba del Anillo aparecen como negativas, tanto en ovejas como en cabras con títulos de SA de 1/40-1/80, dan Pruebas del Anillo positivas con esta técnica.

Conviene resaltar que en ovejas aparecen siempre flóculos coloreados en el fondo, comportándose en parte la prueba como una reacción corriente de aglutinación.



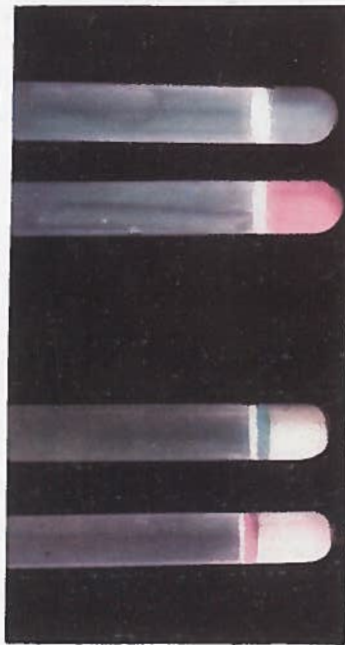
Prueba del Anillo en leche de cabras. (Título SA alto). Tubos 1.º y 2.º prueba positiva. Tubos 3.º y 4.º prueba negativa.



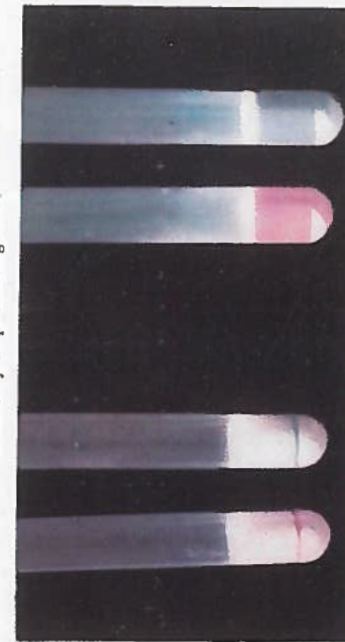
Prueba del Anillo en leche de ovejas. Tubos 1.º y 2.º Prueba positiva (antígeno tetrazol y hematoxilina). Tubos 3.º y 4.º Prueba negativa.



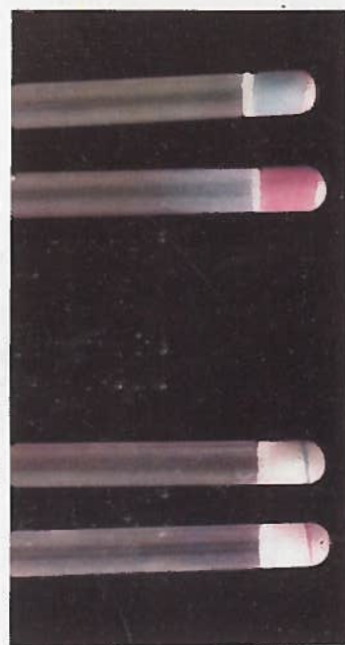
Modificación de Seelenmann. Leche de cabras. Tubos 1.º y 2.º positiva. Tubos 3.º y 4.º prueba negativa.



Modificación de Seelenmann. Leche de ovejas. Tubos 1.º y 2.º prueba positiva. Tubos 3.º y 4.º prueba negativa.



Modificación original con disolventes de grasas. Leches de Cabras. Tubos 1.º y 2.º Prueba positiva. Tubos 3.º y 4.º Prueba negativa.



Modificación original con disolventes de grasas. Leche de Ovejas. Tubos 1.º y 2.º Prueba positiva. Tubos 3.º y 4.º Prueba negativa.

Este método ha sido utilizado por diversos autores para investigar aglutininas en sueros sanguíneos, con buenos resultados. Así THOMSEN, en sangres de bóvidos alteradas por el calor, agrega una gota a un cc. de leche y realiza después la Prueba del Anillo. ERBIN utiliza pequeñas cantidades de suero problema sobre leche de vaca negativa, y realiza la Prueba del Anillo. FLEISCHHAÜER y CANIC, en bóvidos agregan suero a la leche y hacen una Prueba rápida del Anillo: 10 minutos, seguida de centrifugación.

PRUEBA DEL ANILLO MODIFICADA POR AGENTES TENSOACTIVOS

Los resultados obtenidos con el empleo de disolventes de grasas y con la fuerza centrífuga, corroboró nuestra idea primitiva de que en el mecanismo de esta reacción, además de los factores viscosidad y tamaño de los glóbulos de grasa, intervienen otros hasta ahora desconocidos. Pensando en facilitar la adsorción del complejo antígeno-anticuerpo a los glóbulos de grasa, probamos a adicionar a las leches diferentes concentraciones de cloruro de alquil-dimetil-bencil-amonio y bromuro de cetil-trimetil-amonio, agentes rebajadores de la tensión superficial y de poder mojante elevado. Las concentraciones en leche fueron del orden del 1/100, 1/500 y 1/1000. Con la primera tanto las leches de cabra como las de oveja se coagulan, y las segundas no modifican ni mejoran la reacción.

INFLUENCIA DE LA ACIDEZ

La generalidad de los autores preconizan que la leche en la que se realice la Prueba del Anillo deberá ser lo más fresca posible, pero no concretan sobre este punto.

Hemos creído de interés estudiar la influencia de la acidez sobre la Prueba del Anillo y las Prueba Modificadas, debido al alto contenido en ácido láctico de las leches en España, a causa de la deficiente refrigeración y falta de higiene en el ordeño.

A partir de una acidez de 2,5 gramos de ácido láctico por litro, en las Prueba del Anillo y la modificada por centrifugación, se inter-

fiere la reacción dando pruebas negativas tanto en leches individuales como en las de mezcla. Las pruebas modificadas por SEELEMANN, DUBOIS y disolventes de grasas resisten hasta concentraciones de cinco gramos de ácido láctico por litro, cosa presumible en las primeras por la dilución que sufre el ácido láctico con la mezcla con leche de vaca.

INFLUENCIA DE CONSERVADORES DE LA LECHE EN LA PRUEBA DEL ANILLO

Con el fin de evitar que la leche adquiriera una acidez excesiva durante el traslado al laboratorio y permanencia en el mismo, e interfiera los resultados, hemos probado la adición de pequeñas cantidades de formaldehído a muestras de leche de cabra y de oveja.

La adición de 1-2-3 gotas de formol al cuatro por ciento a 10 cc. de leche, no afectan ni interfieren la reacción, permitiendo conservar la leche con acidez baja durante dos o cuatro días a temperatura de laboratorio.

Rossi ha empleado con este mismo fin soluciones de bicloruro de mercurio al 1/500 y 1/1000, agregando un cc. de la solución a 10 cc. de leche, con lo que consigue conservar durante 4 días la leche de vaca en condiciones perfectas para la Prueba del Anillo.

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACION

Hemos observado que en general en todas las pruebas es suficiente una hora de incubación para que las mismas se manifiesten como positivas o negativas.

Con leches fuertemente positivas a los 30 minutos de incubación se manifiestan ya como positivas débiles, habiendo terminado la reacción antes de los 60 minutos.

En leches débilmente positivas, algunas veces mejora la reacción ligeramente prolongando la incubación otros 60 minutos más.

Hemos comprobado, que a pesar de dejar la prueba incubando 12-24 horas en estufa, o tras de una incubación a 37° una hora y 12-24 horas más a temperatura ambiente o en nevera, los resultados no mejoraban en absoluto, permaneciendo negativas a la Prueba del Anillo

leches de ovejas y cabras con títulos de SA de 1/40-1/80. Las lecturas se hicieron con intervalos de una hora hasta las 12 horas, con una lectura final a las 24 horas. Las pruebas que permanecieron a 37° y temperatura ambiente, en general, presentan la leche coagulada y completamente decolorada a partir de las 12 horas.

RESUMEN

Con leches de ovejas y cabras en producción, infectadas experimentalmente con *Brucella abortus*, hemos realizado una investigación sobre la Prueba del Anillo.

La prueba citada fracasa en leches de estas especies, cuando el título de SA es igual o menor a 1/80, probablemente debido a la gran viscosidad de la leche, pequeño tamaño de los glóbulos grasos, y otros factores no identificados.

La mezcla de leches de ovejas y cabras con leche de vaca negativa, el empleo de la fuerza centrífuga, la adición de determinados disolventes de las grasas, y el enriquecimiento en aglutininas por adición de suero sanguíneo positivo, permiten obtener pruebas positivas en leches de oveja y cabra con títulos de SA del 1/40-1/80.

En leches de mezcla la Prueba del Anillo es poco sensible, manifestándose como positivas en ovejas con títulos de SA 1/640 hasta dilución al 1/5, y en cabras con título de SA del 1/1280 hasta diluciones del 1/20.

Mediante el empleo de leche de vaca negativa, fuerza centrífuga y especialmente con disolventes de grasas, se consiguen pruebas positivas con leches de mezclas del 1/10 al 1/30 en ovejas, y del 1/50 al 1/60 en cabras.

Reconociendo el valor limitado de estas pruebas en leches de ovejas y cabras, particularmente en sus resultados como detectoras de la infección en rebaños (leche de mezcla), es de señalar que mejora su valor diagnóstico la técnica "lenta" o "rápida", que se propone, utilizando el cloroformo o tetracloruro de carbono.

La acidez de la leche interfiere enormemente la Prueba del Anillo, manifestándose como negativa a partir de concentraciones de 2,5 gramos de ácido láctico por litro. La adición de leche de vaca negativa y el tratamiento con disolventes de grasas permiten el desarrollo de la

prueba hasta concentraciones de cinco gramos de ácido láctico por litro.

Para evitar una excesiva acidez de la leche se puede utilizar el formol como conservador, ya que a las concentraciones usuales no interfiere la marcha de la prueba y permite conservar la leche en perfecto estado 48-96 horas a temperatura ambiente.

Es de gran interés para los países mediterráneos el seguir el estudio de los métodos de diagnóstico de la Brucelosis ovina y caprina, al objeto de encontrar una técnica segura y sencilla que permita el descubrimiento de los animales enfermos, base de la lucha contra una de las zoonosis más peligrosas para el hombre.

RESUME

Avec des laits de brebis et de chèvres en production, infectés expérimentalement avec du Brucellos abortus, nous avons réalisé une étude au sujet de l'épreuve de l'Anneau.

L'épreuve indiquée échoue avec des laits de ces espèces, lorsque le titre de SA est égal ou inférieur à 1/80. Ceci est probablement dû à la grande viscosité du lait, petite taille des globules gras, et autres facteurs non identifiés.

Le mélange de laits de brebis et de chèvres avec du lait de vache négatif, l'emploi de la force centrifuge, l'addition de certains dissolvants des graisses, et l'enrichissement en agglutinines par addition de sérum sanguin positif, permettent d'obtenir des épreuves positives sur des laits de brebis et de chèvres avec des titres de SA du 1/40-1/80.

Sur des laits de mélange l'épreuve de l'Anneau est peu sensible, se manifestant comme positifs sur des brebis avec des titres de SA 1/640 jusqu'à une dilution au 1/5, et sur celui de chèvres avec titre de SA du 1/1280 jusqu'à des dilutions au 1/20.

En employant du lait de vache négatif, force centrifuge et spécialement avec des dissolvants de graisses, on obtient des épreuves positives, avec des laits de mélanges du 1/10 au 1/30 sur des brebis, et du 1/50 au 1/60 sur des chèvres.

En tenant compte de la valeur limitée des ces épreuves sur des laits de brebis et de chèvres, particulièrement en ce qui concerne leurs résultats comme détectrices de l'infection dans des troupeaux (lait de mélange), il faut remarquer que sa valeur diagnostique est améliorée

par la technique "lente" ou "rapide", que l'on propose, en utilisant le chloroforme ou le tetrachlorure de carbone.

L'acidité du lait trouble énormément l'épreuve de l'Anneau, en se manifestant comme négatif à partir de concentrations de 2,5 gr. d'acide lactique par litre. L'addition de lait de vache négatif et le traitement avec des dissolvants de graisses permettent le développement de l'épreuve à des concentrations de 5 gr. d'acide lactique par litre.

Pour éviter une excessive acidité du lait, on peut utiliser le formol comme conservateur, puisque les concentrations habituelles n'agissent pas sur le processus de l'épreuve et il permet de conserver le lait en parfait état 48-49 heures à la température ambiente.

Il est de grand intérêt pour les pays méditerranéens de poursuivre l'étude des méthodes de diagnostic de la Brucellose ovine et caprine, afin de trouver une technique sûre et simple, qui permette de déceler les animaux malades, base de la lutte contre une des zoonoses des plus dangereuses pour l'homme.

SUMMARY

We have experimented with the ring-test for sheep and goat milks infected experimentally with Brucella Abortus.

Such test fails with these milks when the titre of Blood Serum Agglutination is equal to or less than 1/80. We think it probably comes from the great viscosity of milk, from the small size of fat-globules and from other factors not defined.

The mixture of sheep and goat milk with negative cow milk, the use of centrifugal force, the addition of certain fat-solvents and the enrichment in agglutinins by addition of positive blood serum, make it possible to obtain positive tests with sheep and goat milk with titre of Blood Serum Agglutination 1/40-1/80.

With mixed milks, the ring-test is not capable of very accurate results but it gives positive reaction with sheep milk with titre of 1/640 Blood Serum Agglutination (to a dilution of 1/5) and with goat milk with titre of Blood Serum Agglutination 1/1280 (to a dilution of 1/20).

Using negative cow milk, centrifugal force and especially fat-solvents positive tests are developed with a proportion of 1/10 to 1/30 for the sheep milk and with a proportion of 1/50 to 1/60 for goat milk.

Bearing in mind the limited range of such tests with sheep and goat milks, and more especially the value of their results in detection of cattle infection (mixed milks), we would draw the attention to the fact that the diagnostic value is improved by practising the "slow" or "rapid" method, and employing chloroform and tetrachloride of carbon.

The milk acidity greatly interferes in the ring-test giving a negative result with a concentration of 2.5 grs of lactic acid by litre.

The addition of negative cow milk and a treatment with fat-solvents allow the development of the ring-test with up to concentration of 5 grs. of lactic acid by litre.

To avoid an excessive acidity in the milk, formol can be used to stabilize it, since the usual concentration do not prevent the progress of the test and allow the milk to be kept in perfect conditions for 48-96 hours at the atmosphere temperature.

It is of great importance for Mediterranean countries to keep up-to-date with methods of diagnosing Brucellosis in sheep and goats with the objet of finding a reliable and simple technique for detecting the infected animals, as a basis of the fight against one of the zoonosis most dangerous to man.

TABLA I

Leches individuales

Comparación de resultados de las diversas pruebas

	OVEJAS	CABRAS
Título suero-aglutinación	1/40-1/80	1/40-1/80
Prueba del Anillo	negativa	negativa
Prueba según Seelemann	débilmente positiva	débilmente positiva
Prueba según Dubois	positiva	positiva
Prueba disolventes lenta	positiva	positiva
Prueba disolventes rápida ...	positiva	positiva
Prueba por centrifugación ...	positiva	positiva
Prueba con adicción de suero.	positiva	positiva

TABLA II

Leches de mezcla

Comparación de resultados de las diversas pruebas

	OVEJAS			CABRAS		
	1	1	1	1	1	1
Título suero-aglutinación ..	5120	2560	640	10240	5120	1280
Prueba del Anillo	1/20	1/10	1/5	1/80	1/40	1/20
Prueba según Seelemann ..			1/15			1/50
Prueba según Dubois			1/15			1/50
Prueba disolvente lenta ...			1/30			1/60
Prueba disolvente rápida ..			1/30			1/60
Prueba por centrifugación.			1/10			1/50

* Las mezclas expresadas son de leches positivas de oveja o cabra, en leches negativas de la misma especie.

BIBLIOGRAFIA

- ANCZYKOWSKI, F. 1957.—Off. internat. Epizoot. 47, 685.
 BENDTSEN, H. 1952.—*Abortus-Bang-Ringproven med vitalfavot antigen*. Diss. Kobenhavn.
 BIGGI, P. y FARINA, R. 1952.—Ann. Facol. Med. Vet. Pisa, 5.
 BRUHN, P. A., JEPENS. 1951.—Nord. Vet. Med., 3609.
 ERBIN, I. E. 1955.—Rev. Path Comp. 171, 1139.
 FAO-OMS. 1953.—(Ser. Rapp. techn.), 17.
 FAO-OMS. 1958.—(Ser. Rapp. Techn.), 148.
 KASTLI, P. 1955.—Milchw., 10, 3, 48.
 KOCH, O. S. 1956.—F. I. L., 54.
 ROSSI, P. 1953.—Bull. Acad. Vet. Fr., 26,217.
 ROSSI, P. y otros. 1954.—Bull. Acad. Vet. Fr., 269.
 SEELEMANN, M. y MANTOVANI. 1940.—Milchw Forch, 20, 95.
 SEELEMANN, M., BÖRGER, K. 1954.—Msschrft. Tierheilk, 6201.