

Progresos en la vacunación contra la brucelosis bovina

(ABORTO INFECCIOSO)

Por José J. Bohórquez.
Médico Veterinario.

Con el nombre de Brucelosis se conoce una enfermedad infecciosa, contagiosa, de curso crónico, que ataca tanto al hombre como a los animales domésticos y es determinada por 3 especies diferentes de gérmenes, que producen en cada especie un cuadro clínico diferente. Tenemos que la *Brucella melitensis* (Hughes) fue la primera especie del género, aislada por Bruce en 1887, que tiene como huésped primario la cabra y como huésped secundario al hombre. Esta especie es principalmente importante en el hombre por determinar en él la fiebre ondulante o del Mediterráneo, aunque tanto la *Br. suis* como la *Br. abortus* determinan en él una infección sistemática o focal semejante.

En segundo lugar fue aislada y descrita por

Bang en 1897 la *Brucella abortus* (Bang), germen causante del aborto infeccioso en los bovinos, que se encuentra en todas partes del mundo, y ha sido recobrada también de otros animales y de hombre; su huésped primario son los bovinos y secundario el hombre y caballo especialmente.

Finalmente en 1914 fue aislada por Traum la *Brucella suis* de fetos abortados de cerdos. Esta especie determina en los porcinos, entre otros síntomas, el aborto.

Mediante el siguiente cuadro podemos ver la susceptibilidad del hombre y los animales a las tres especies de *Brucellas*, que es bastante diferente.

ESPECIES	BR. ABORTUS	BR. MELITENSIS	BR. SUIS
Hombre	+	+++	+++
Bovinos	+++	+	++
Equinos	++	—	++
Porcinos	—	—	+++
Caprinos	++	+++	—
Conejo	+++	+++	+++
Curi	+++	+++	+++
Oveja	+	++	—
Aves	+	+	+
Perro y Gato	+	+	+

Morfológicamente las tres especies son sensiblemente iguales, pero difieren antigénica y fisiológicamente y así se pueden distinguir v. gr. mediante la producción de HS, la acción bacteriostática de ciertos colorantes sobre ellas, la utilización de la glucosa, reducción de nitratos a nitritos, etc.

En el presente artículo quiero hacer referencia exclusivamente a la Brucelosis en los Bo-

vinos, o sea el aborto infeccioso de Bang, y de manera especial a la vacunación en la misma de tal suerte que las generalidades anteriores son suficientes a manera de introducción.

Actualmente hay pocas enfermedades de los animales domésticos, que juegan un papel tan importante, directa o indirectamente, en el bienestar del hombre, como la Brucelosis, ya que afecta la salud y productividad del ganado, cer-

dos y cabras, tres de los principales productores de alimentos de origen animal. Por otra parte es una enfermedad que afecta directamente al hombre, pues es bien sabido que las tres especies después de invadir el tejido, determinan en el ser humano una enfermedad de carácter febril que tiende a hacerse crónica por naturaleza.

Mientras las tres especies de *Brucella* infectan al ganado, solamente la *Br. abortus* ha sido demostrado ser altamente infecciosa para la vaca, las otras dos han sido recuperadas de la leche de la misma en sólo pocos casos. El agente infeccioso penetra por vía digestiva o a través de la piel, teniendo predilección por la ubre, y úteros grávidos y determinando un proceso de naturaleza insidiosa.

El aborto infeccioso en el ganado probablemente causa pérdidas económicas tan grandes, como ninguna otra de las enfermedades de los animales domésticos, las cuales se traducen por el aborto en las hembras preñadas, esterilidad en la matriz, considerable baja en la producción de leche, por los cambios histológicos que conseqüente al aborto y procesos inflamatorios determina en la ubre, caracterizados por una mastitis crónica intersticial. En los machos hay lesiones focales en el epidídimo y testículos, que parecen tener un marcado efecto inhibitorio en la espermatogénesis, siendo entoces inaptos para la reproducción. Sin embargo como dice Hallman y otros (3) es evidente que las pérdidas debidas a la baja producción de leche excede a las determinadas por el aborto y la esterilidad.

Hasta la fecha no hay curación para *Bruce*llosis del ganado, (como veremos en seguida está en estudio un tratamiento al parecer con bastantes probabilidades de éxito), pero son posibles su control y erradicación. Existen dos métodos de control, impedir su propagación y emplear la inmunización por medio de la vacunación. La vacunación que ha merecido más estudio que cualquier otra fase de la *Brucel*losis, es un adyuvante bajo ciertas condiciones, pero no es la solución del problema. Aglutinación para detectar los enfermos, segregación de los mismos y medidas sanitarias, están más de acuerdo en el programa de control; la prueba de la aglutinación es indispensable, pero hay que usarla inteligentemente. Tales son las ideas expresadas por B. J. Killham (4), al hablar de

los proyectos de control. Sin embargo como veremos al final hay en estudio una vacuna que al parecer está llamada a ser la solución de tan magno problema.

En la prevención y erradicación de otras enfermedades infecciosas hay en general tres caminos a tomar separada o combinadamente: 1º Uso de drogas u otros agentes que curen la enfermedad. 2º Descubrir y sacrificar rápidamente todos los animales infectados. 3º El uso de un agente inmunizante en los animales no infectados y al mismo tiempo sacrificio de aquellos que muestren por la prueba de aglutinación estar infectados. En relación con la *Brucel*losis hasta ahora han fracasado los tratamientos curativos (2); sin embargo en la actualidad está en estudio un tratamiento a base de suero normal y sulfadiazina o sulfamerazina, con señaladas posibilidades de éxito.

A una vaca se administran 10 grs. diarios de sulfa, con esta pequeña cantidad se puede tener una concentración de 1 mg. % en la sangre, el cual es suficiente para estimular el sistema anticuerpo-complemento por el término de siete días consecutivos, por vía oral, que se puede adicionar de una pequeña cantidad de bicarbonato de sodio. Después de la primera dosis se aplica una inyección endovenosa de plasma sanguíneo aproximadamente en cantidad de 2 cc. por libra de peso vivo o 2.5 cc. de sangre total, transfusión que puede repetirse al 6º o 7º día. Antes de iniciar el tratamiento se hizo prueba de aglutinación y luego durante el mismo y por un tiempo posterior se han hecho otras pruebas, las cuales han mostrado una acentuada baja en el título de las aglutininas, o sea señal de mejoría. (5). Dicho sistema de tratamiento está en estudio experimental por parte del Laboratorio de *Brucel*losis, del Michigan State College.

En lo humano se está usando de manera extensiva, al parecer con muy buenos resultados, "Una mejoría en el paciente puede ser notada dentro de las 24 horas después de la transfusión" (6).

Durante los últimos 11 años, la mayoría de los Estados (en los Estados Unidos) en cooperación con el Gobierno Federal han utilizado el sistema de detectar los animales enfermos y sacrificarlos, con esta medida se han logrado algunos progresos e inclusive el establecimiento de gran número de hatos libres de la enfer-

medad; sin embargo es un plan bastante difícil de seguir y limitado en su aplicación.

El tercer camino señalado es quizás el más práctico, o sea la prevención de la enfermedad, por la inmunización de los animales susceptibles, con una vacuna apropiada, y al mismo tiempo sacrificio de los infectados.

Durante los pasados 40 años se han usado toda clase de bacterinas y vacunas. En 1906 Hang empleó bacterias muertas en la vacunación, los resultados no fueron muy halagadores. Buch y Creech no lograron tampoco obtener una buena protección con vacunas hechas con bacterias muertas (bacterinas). En aquellos tiempos al preparar dichas vacunas, buscaban prevenir el aborto, o sea uno de los síntomas de la enfermedad, pero no la enfermedad misma, y esta contribuyó a que no se lograran mayores progresos. Por algún tiempo no sólo se usó la Br. abortus en la preparación de dichas vacunas sino también cultivos vivos de Br. suis lo cual indudablemente determinó la infección en miles de cabezas (1).

Estudios con miras a obtener una vacuna que reúna las mejores condiciones para la inmunización, han sido llevados a cabo entre otros muchos por Stockman, Hadley, Jensen, Smith, etc., los cuales han suministrado varios datos y considerable estímulo para trabajos posteriores. Merecen sin embargo especial mención los del "Bureau of Animal Industry" y "Laboratorio de Brucellosis del Michigan State College" (Agricultural Experiment Station).

Tenemos que en 1911 se llevó a cabo por Giltner, en dicho laboratorio, el primer intento para inmunizar al ganado contra la Brucellosis, pero no se obtuvieron mayores informaciones (8). En 1916 se inició un estudio preliminar, para determinar si había diferencias patogénicas entre varias Cepas de Br. abortus; por dicha época no se completó el estudio; pero éste se reanudó de nuevo en enero de 1920, con las mismas y otras cepas adicionales (7).

Se emplearon 21 Cepas en total, de las cuales 3 eran de Bruc melitensis, usadas para establecer comparación. Dicho estudio mostró que gran número de Cepas de Br. abortus, después de varias generaciones de cultivo en medios artificiales, pierden la propiedad de producir lesiones en Curies inoculados experimentalmente. La mayoría de las Cepas deja de ser virulenta en el término de un año después de su

aislamiento. En estas conclusiones estaba dado el primer paso, ya que antes de iniciar experiencias para determinar la eficacia de tales bacterias como agentes vacunantes, era fundamental determinar su virulencia por medio de inoculaciones a Curies.

Un segundo ensayo fue hecho por Giltner, Hallman y Cooledge. "El uso de cultivos vivos de *Bacterium abortus* en hembras no preñadas, fue aplicado en unos pocos hatos con el fin de observar su progenie y efectos inmunizantes". Este ensayo se llevó a cabo por los años de 1917 a 1920, para lo cual emplearon diferentes clases de vacunas, algunas aplicadas inclusive por vía intravaginal. No se puede dar mucha significación a estos experimentos en el sentido de prevenir la infección, por el hecho de no haber sido bien controlados bacteriológicamente y no es conocido el grado de virulencia de los cultivos usados en las vacunas (8).

Por otra parte de 1917 a 1921 se prestó especial cuidado al estudio de las propiedades bioquímicas y patogénicas de varias Cepas de Br. abortus en nuestro Laboratorio (Huddleson), hallando Cepas de baja o ninguna patogenidad para el curi, y además que cultivos vivos de una de estas cepas no virulentas lo protegía del aborto y sus lesiones características, cuando se exponía a la infección artificial de cultivos virulentos. De aquí se procedió a estudiar dicha cepa en el ganado".

El empleo de cultivos vivos no virulentos en la vacunación preventiva, fue introducido originalmente por Jenner en el control del Smallpox, basados en los mismos principios se obtuvieron vacunas para el control de los carbones bacteriano y sintomático y de la Rabia, y ahora se obtenía una más, para la Brucellosis.

En esta vacuna se logró no llevar la enfermedad al ganado vacunado y proporcionarle cierto grado de inmunidad.

En 1929 Giltner y I. F. Huddleson, escribían que se había determinado finalmente, que animales experimentales pueden ser protegidos contra una infección artificial masiva de Brucellosis, por un período mayor de 2 años, y que usando una cepa no virulenta, espontáneamente aglutinable, se ofrecía una oportunidad para inmunizar el ganado contra el aborto de Bang, sin la producción de aglutininas, la presencia de las cuales causa confusión, cuando los animales son posteriormente testados para la pre-

sencia o ausencia de la infección por la prueba de la aglutinación.

Una cepa que no produzca dichas aglutininas y sea avirulenta, principia a ser estudiada, para determinar su capacidad inmunizante (9).

El estudio de esta cepa fue llevado a cabo por parte del B. A. I. y de "Michigan Agricultural Experiment Station", en realidad era una continuación de las observaciones llevadas a cabo con la cepa en experimentación desde 1921. Durante dichos estudios se vio que vacuna preparada con dicha cepa no determinaba efectos dañinos en cuanto a la reproducción o producción de leche; además se probó que no era patógena para el sér humano. En cuanto a la efectividad de la vacuna se hicieron determinaciones matemáticas y se obtuvo un valor de 24,5; este número es una prueba de que hay una diferencia marcada en la incidencia de la infección entre los animales vacunados y los del grupo control. La presencia de inmunoposoninas en alto título, en la sangre de los animales vacunados indicó el grado de inmunidad activa contra la enfermedad de Bang (10).

Veamos ahora los trabajos más importantes, en este sentido, llevados a cabo por estos mismos años por parte del B. A. I. en su Estación Experimental de Bethesda.

Reconociendo que las vacunas preparadas con cepas virulentas solamente podían administrarse a hembras no preñadas, pues de lo contrario determinaban el aborto en corto tiempo, se procedió al estudio de cepas que pudieran ser administradas a toda clase de hembras; pero había que determinar cuando habían perdido su poder de reproducir la enfermedad, conservando su eficacia como agentes inmunizantes.

Las vacunas en cuestión fueron preparadas con tres cepas distintas de Br. abortus, denominadas 11, 19 y 484, que representaban tres grados diferentes de virulencia. La 11 había sido propagada en medios artificiales por 12 años, la 19 por 6 años y la 484 por 6 meses. En primer lugar se trabajó en curies y luego en ganado. La 484 produjo algunos disturbios locales, más marcados que los determinados por las otras dos. Se hicieron cultivos de la leche de las hembras inoculadas, e inoculaciones a curies con la misma, para determinar la presencia del germen. Las vacas vacunadas

con la cepa 484 (la más virulenta) eliminaron Br. abortus en su leche por varios períodos; con la Cepa 19, se observó presencia de gérmenes tan sólo en la leche de una vaca; con la Cepa 11 (la menos virulenta) no hubo dicha eliminación por la leche. Igualmente se llevaron a cabo experiencias en cuanto al poder inmunizante para las tres Cepas.

Las conclusiones fueron de que vacunas contra el aborto de Bang preparadas con cepas de reducida virulencia, como se probó por las inoculaciones a curies, dan una marcada evidencia de su eficacia como agentes inmunizantes, en vacas libres de la enfermedad y en terneras, cuando la vacuna es administrada subcutáneamente 2 meses o más, antes del servicio. El peligro de que por tales vacunas, aplicadas por vía subcutánea, se lleve la infección a la ubre, parece muy remoto; en cambio se demostró que aplicadas por vía intradérmica es casi segura la infección en la ubre (11).

Se hicieron otros experimentos, que en realidad eran continuación de los llevados a cabo en 1927 y 1928, con las Cepas nombradas, en esta ocasión se empleó un mayor número de animales y la Cepa usada fue la designada como 801, que había sido aislada en 1915 de leche de una vaca infectada y había recibido de 182 a 193 pases.

Se preparó una vacuna que fue administrada subcutáneamente a 3 vacas preñadas y 7 novillas igualmente preñadas; no fue patógena y su poder aglutinante no fue menoscabado. Uno o dos meses después de la vacunación los 10 animales fueron expuestos a Cepas virulentas de Br. abortus, a la vez que nueve controles.

La vacuna dio evidencia de conferir inmunidad contra la Brucelosis en un 40%, cuando sólo 11% de los controles resistían a la enfermedad experimental. Por otra parte no hubo ninguna evidencia de que la Brucella se localizara en la ubre de los animales vacunados (12).

De estos estudios se desprendió que la vacuna preparada con la Cepa 19, era la que ofrecía más ventajas, y fue así como nació la vacuna cepa 19 contra el aborto de Bang, que todos conocemos y es la que se aplica en la actualidad.

Un "test" de varias vacunas comerciales, hecho por el B. A. I. (13), en 1913, demostró que

algunas de ellas, no sólo contenían organismos de Br. abortus, sino también B. suis y gérmenes virulentos. Ante el peligro de la propagación de la enfermedad al ganado y al hombre, con tales vacunas, el B. A. I. en 1932 prohibió el uso de tales cepas y los cultivos de la Cepa 19 fueron aceptados como la sola fuente para las vacunas comerciales, desde entonces.

La vacuna Cepa 19 ha sido Standarizada de tal suerte que se produce en iguales circunstancias por todos los Laboratorios y el producto es además controlado por las entidades oficiales. (En V. S. por Animal Disease Station of Pathological Division-Beltsville, Maryland) lote por lote, para establecer sus condiciones de pureza, viabilidad, densidad, PH y disociación.

Hecho un examen por el B. A. I. de los cultivos Stock empleados por las casas productoras de vacunas, reveló en muchos casos avanzado estado de disociación bacterial, (que afecta la eficiencia de la vacuna) de ahí que dicho Bureau suministre a dichas casas la Cepa 19 seleccionada y transferida a intervalos regulares.

La vacunación del terneraje con la Cepa 19, tiene probado mérito, sin embargo no todos los animales vacunados son inmunizados, cuando se usa en terneraje de 4 a 6 meses, desarrolla suficiente inmunidad para proteger más o menos el 90% contra la enfermedad. La vacunación en vacas está muy en controversia y no es aconsejada (4). Estas vacunas tienen su limitación como la no aplicación en animales adultos, ya que en ellos determina la infección y el aborto. Por otra parte los animales que son vacunados después de los dos años de edad retienen una reacción positiva en su sangre (aglutininas) por períodos de 2 y más años, por lo cual es indispensable durante este tiempo, distinguir entre los vacunados y los infectados.

Por el año de 1936 se llevaron a cabo estudios por Jemes W. Scales e I. F. Huddleson (14), con el propósito de determinar el valor de tejidos infectados de Br. abortus como agentes inmunizantes, contra la infección por Brucella en el Curí. El bazo de Curies infectados exudados fetales infectivos fueron tratados para hacerles perder su poder infectivo y ver si tenían poder protectivo. Los resultados mostraron de manera concluyente, que cuando el bazo de un curí infectado y exudados de mem-

branas fetales de un feto bovino abortado son tratados con éter, cloroformo o formol, para hacerlos no infectivos, ellos permanecen sin valor como agentes inmunizantes contra la infección experimental de Br. abortus en el Curí.

En vista de la falta de eficacia absoluta de los productos empleados hasta ahora en la vacunación, especialmente la Cepa 19 en los últimos años, los experimentadores continuaron en su afán de encontrar una vacuna que eliminara dichas deficiencias, y prosiguiendo sus investigaciones con dicho fin el doctor Huddleson (15) halló, estudiando la disociación bacterial en las Brucellas, partiendo de cultivos lisos S. (Smouth) tres fases diferentes de disociación de tipo mucoides M. en la Br. abortus, dos fases del mismo tipo en la Br. suis y una en la Br. melitensis. Una de las fases M. de la Br. abortus y las dos de la Br. suis, dieron origen a su vez a colonias hijas Md. (Mucoid-Daughter), las cuales son semejantes en muchos aspectos a la fase S original.

En relación con el mismo estudio el autor (2) dirige sus investigaciones hacia la patogenicidad y antigenicidad de dichas variaciones, y encuentra que cuando una suspensión de células vivas de cierta fase mucoides de crecimiento de Br. suis y Br. melitensis, (Colonias Md) es inoculada al Curí o los bovinos, no produce en ellos ninguna manifestación patógena. Por otra parte los aglutininas específicas, están presentes después de su aplicación en ligero grado y sólo por un corto periodo de tiempo. Esto es quizás uno de los principales caracteres de estas cepas; así cuando se inyectaron vacunas preparadas con las mismas, por vía subcutánea con dos o tres veces las dosis máximas, rara vez pasó el título de las aglutininas en el suero sanguíneo de 1 x 100, y éste generalmente dentro de 60 a 90 días después de la vacunación.

El hecho de tener una baja patogenicidad y bajo título de aglutininas, que caracteriza dicha fase Md de crecimiento, dio fundamentos al autor (15) para iniciar trabajos experimentales a fin de determinar su posible valor como agente vacunante contra la Brucelosis. Dichos trabajos los inició en curies, por ser susceptibles a la infección, por requerir corto tiempo para completar una experimentación y finalmente por ser una de las especies en las cuales es más difícil producir una inmunidad ac-

tiva al frente de la Brucelosis. Cuando se inyecta a un curi cultivos vivos de dichas fases y en dosis apropiadas se obtiene un alto grado de inmunidad al frente de la inyección para cualquiera de las tres especies de Brucelosis, en cambio los curies controles inoculados al mismo tiempo son infectados.

También pudo observar el doctor Huddleson (15) que suspensiones de células de Br. suis M fase 2, después de irradiación con luz ultravioleta en grado suficiente para hacer la mayoría de las células, no viables en una dosis de 1 mgr., fueran igualmente capaces de producir un alto grado de inmunidad en Curies al frente de la infección experimental con Br. suis y Br. melitensis.

Experimentos para determinar el valor inmunizante, de vacuna preparada con estas nuevas Cepas, en el ganado, están en progreso, pero todavía no hay tiempo suficiente para justificar un análisis de su valor (2).

Vacuna preparada con una de las fases M de la Br. suis, está siendo aplicada por ahora en el ganado del Estado de Michigan y todavía desde un punto de vista experimental, en dosis de 1 cc. por vía subcutánea a hembras preñadas o nó. Dicha vacuna es preparada únicamente por el Laboratorio de Brucelosis del Michigan State College" y aplicada bajo su control. La preparación de dicha vacuna tiene sus dificultades, en cuanto se refiere especialmente al mantenimiento de la fase M escogida, sin que sufra cambios disociativos, ya que a la vez esta fase es el producto de disociación del tipo S. Por otra parte, por su mismo carácter mucóide, el germen no permanece en suspensión uniforme en las soluciones, sino que se sedimenta; algunos detalles de técnica en la preparación motivaron el retiro de la vacuna para su aplicación en meses pasados, pero el día 7 de marzo de 1948, decía el "State Yocuval" de Lansig (17). "El Michigan State College, Laboratory de Brucelosis reanudará la distribución de su vacuna Brucella "M" dentro de dos semanas.

La vacuna para la inmunización del ganado, contra la infección de Bang, fue retirada de la distribución recientemente cuando algu-

nos lotes en el Laboratorio desarrollaron una condición inestable.

El problema técnico del Laboratorio no se debió a que la vacuna fuera peligrosa cuando se inyecta a los animales, sino a la falta de estabilidad del producto.

El problema ha sido eliminado, dijo el doctor Huddleson Jefe del Laboratorio, y los progresos hechos ahora van hacia el completo éxito.

Tenemos pues que ha nacido una nueva vacuna, para combatir el Aborto de Bang, que a no dudarlo será superior a la Cepa 19 desde muchos puntos de vista.

Sumario.

Se hacen algunas observaciones generales acerca de la Brucelosis; como diferentes especies de Brucellas, susceptibilidad del hombre y los animales a las mismas, manera de diferenciarlas y enfermedades y pérdidas económicas que determinan. Luégo se ven las medidas de control aconsejadas para su erradicación, descripción de un nuevo sistema de tratamiento curativo a base de sulfas y suero normal, y especial mención de los diferentes tipos de Bacterinas y vacunas empleadas en su prevención, a partir de la Bacterina de Bang en 1906. En seguida a los trabajos llevados a cabo en el Laboratorio de Brucelosis del Michigan State College, con el fin de hallar una vacuna efectiva, a partir de 1911 hasta 1929 con la obtención de una vacuna que reunía ciertas condiciones favorables.

Por otra parte se ven los estudios llevados a cabo por el "Bureau of Animal Industry", hasta la obtención de la Cepa 19, por Cother, Buck y Smith en 1928, —que es la usada en la actualidad—. Nuevos ensayos del Laboratorio de Brucelosis del M. S. C. hacia 1936, para ver el efecto de tejidos infectados y tratados, como agentes vacunantes, sin obtener buenos resultados. Finalmente los trabajos de Huddleson en disociación bacterial del género Brucella, que dan origen a una nueva vacuna denominada "M", que reúne mayores ventajas que la Cepa 19 y está en la actualidad en experimentación en el Estado de Michigan, la cual indudablemente está llamada a reemplazar la Cepa 19.

Referencias citadas.

- 1: **I. F. Huddleson**.—"Brucellosis in man and animals". The Commonwealth Fum. 1943.
- 2: **I. F. Huddleson**.—"The relation of Brucellosis to Human Uejase". An. of the New York Sc. of Sc. April. 1947.
- 3: **E. T. Hallman, L. B.**—Sholl, A. L. Delez. Tech. Bul. N° 93 Michigan State College. 1928.
- 4: **B. J. Killham**.—Ext. Bul N° 110, M. S. C. January. 1947.
- 5: Informaciones personales en el Laboratorio de Brucellosis MSC. Marzo. 1948.
- 6: Treatment of Brucellosis in Humans by Means of Sulfanamides and Normal Human Blood Brucella Laboratory.
- 7: **J. F. Huddleson**.—"Tech. Bul. N° 55. M. S. C. 1922.
- 8: **I. F. Huddleson**.—"Tech. Bul. N° 65. M. S. C. 1924.
- 9: **Ward Giltner, I. F. Huddleson, L. T. Clark y A. S. Schlingman**.—Jour Ames. Med. Ass. Vol. 27, 1.92. (885).
- 10: **D. B. Meyer and I. F. Huddleson**.—"Tech Bul. N° 153. Nov. 1936. (B. A. I. and Agr. Exp. Sta. M. S.C.).
- 11: **W. E. Cotton, J. M. Buck, H. E. Smith**.—our, of Agr. Research. Vol. 46. (291). 1933.
- 12: **W. E. Totton, J. M. Buck, H. E. Smith**.—our of Agr. Res. Vol. 46 (315). 1933.
- 13: **E. Leland Love**.—"The Standardization and Control of Brucella Abortus vaccine". 1940.
- 14: **James W. Scaks and I. F. Huddleson**.—"Tech Bul. N° 149 (24). 1936.
- 15: **I. F. Huddleson**. — "The inmunization of Guinea Pis With Mucoid phases of Brucella". Amer. Jour. of Vet. Res. Vol. VIII (374) october. 1947.
- 16: **I. F. Huddleson**.—"The mucoid phases of the Genus Brucella". Ames. Jour. of Vet. Res. Vol. VII (5). 1946.
- 17: **The State Journal**. — "Lansing, March 7, 1948.