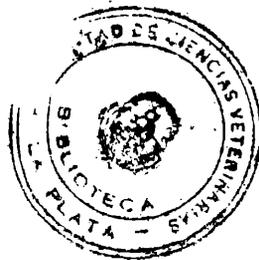


UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS

DE LOS ANTICUERPOS AGLUTINANTES Y NO AGLUTINANTES PRODUCIDOS

EN LA BRUCELOSIS BOVINA

(TESIS)

CARLOS GUILLERMO SANTISTEBAN

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD

NACIONAL DE LA PLATA

RECTOR:

Dr. GUILLERMO G. GALLO

SECRETARIO GENERAL:

Odont. TOMAS C. FUCINI

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Dr. JORGE ALFREDO BOLZAN

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA:

Cñor. JUAN CARLOS AREVALO

SECRETARIO DE EXTENSION CULTURAL Y DIFUSION:

Arq. JOSE MARIA MARQUINEZ

GUARDASELLOS:

Dr. JOSE MARIA MAINETTI

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DECANO:

Dr. JOSE H. FERNANDEZ DE LIGER

VICE-DECANO:

Dr. JORGE E. LED

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Dr. FEDERICO CARLOS DEL CASTILLO

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA:

Sr. OMAR HUGO RAMIREZ

DIRECTORA DE ENSEÑANZA:

Sra. HAYDEE C. R. de PERETTO

DIRECTORA DE BIBLIOTECA:

Srtita. HEBE PEDEBNERA

DIRECTOR ECONOMICO-FINANCIERO:

Sr. HECTOR S. MOREIRA

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA"

ANGULO, Eusebia	Investigadora
CARRCZZA, Jesús S. W.	Int. a la Biofísica
ERRECALDE, Jorge E.	Microbiología
ETCHEVERRIGARAY, María E.	Virología
MARTIN, Alcides A.	Anat. y Fisiología Patológica
MENENDEZ, Néstor A.	Patología de Aves y Filíferos
QUINTEROS, Indalecio R.	Genética y Biometría
ZACCARDI, Eduardo M.	Fisiología

PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiología Especial
ALBERDI, Cecilio	Tec. y Sanid. de los Alimentos
ANDREAITTA, Jorge N.	Semiología y Propedéutica
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos I y II
BERTOLINI, José M.	Anatomía Comparada
DELPRATO, Ismael O.	Anatomía Descriptiva y T.
JENSEN, Alicia D.	Bioestadística
LED, Jorge E.	Parasit. y Enf. Parasitarias
MANZULLO, Alfredo	Inmunología I y II
MAROTTA, Eduardo G.	Zootecnia Espec. I (o.s y c.)
OCHOA, Mario E.	Director Ins. Santa Catalina
OTTINO, Julio F.	Histología y Embriología
PENNIMPEDE, Enrique F. F.	Inmunología Gral. y Aplicada
PRACCA, Lydia C.	Clínica de Eq. Animales
RODRIGUEZ, Benjamín R.	Zootecnia Especial II (b. y e.)

PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiología Aplicada
ALBERDI, Cecilio	Tec. y Sanid. de los Alimentos
DURANTE, Eduardo G.	Patología Quirúrgica y Pod.
ERRECALDE, Jorge E.	Enfermedades Infecciosas
GIMENO, Emilio J.	Higiene, Epidem. y S. Pública
ISEAS, Fortunato B.	Patología Médica
MARTINO, Olindo A. L.	Salud Pública
OSTROWSKI, Jorge E. B.	Patología de la Rep. y Obst.
PANZONI, Erico Emir	Economía Agraria
PEROTTI, Rodolfo M.	Zootecnia Especial III (A. y P)
RUAGER, Jorge	Patología General
SARACHU, Alberto N.	Genética Microbiana
SCIAMMARELLA, Alfredo M.	Medicina Operatoria

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA"

BOCCIA, Francisco O.	Clín. de Peq. Animales
IDIART, Julio R.	Anat. y Fisiol. Patológica
LAGRECA, Liliana	Zootecnia Gral. y Agrost.
LASTA, Jorge A.	Higiene, Epidem. y S. Púb.
MONINA, Marta I.	Clínica de Grand. Animales

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

BRANDETTI, Eugenio	Patología de Aves y Pilíf.
CHAMPREDONDE, Hugo N.	Patología General
DIBBERN, Alberto R.	Zootec. Especial II (B y E)
DURANTE, Eduardo J.	Servicio Central de Cirugía
ERRECALDE, Jorge O. (h)	Farmacología F. y Terap.

FELDMAN, Raquel E.	Parasitología Comparada
FERNANDEZ, Enrique J.	Enfermedades Infecciosas
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología II
MAGGI, Nilda B.	Servicio Central de Cirugía
MARTINO, Juan J.	Microbiología
NOIA, Miguel A.	Int. a la Biofísica
ORTEGA, César F.	Semiología y Propedéutica
PENNIMPEDE, María T. del Amor	Tec. y Sanidad de los Alimnt.
PIOVANO, Nicolás Miguel	Int. a la Bioquímica
REINCOSO, Enzo M.	Micología Médica e Ind.
RUAGER, Jorge	Anat. y Fisiol. Patológica

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BACIGALUPO, Néstor R.	Tec. y Sanid. de los Alimentos
BAIGUN, Roberto	Patología de la Rep. y Obste.
BRANDETTI, Eugenio	Parasitología y Enf. Parasit.
FERNANDEZ de LIGER, José H.	Clínica de Grandes Animales
FINOCHIETTO, Héctor D.	Patología Médica
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología Gral. y Aplicada
GRILLO, Virginia E.4	Zootecnia Especial III (A. y P.)
LASTA, Jorge A.	Microbiología Aplicada
MAGGI, Nilda B.	Patología Quirúrgica y P.
MALIANDI, Florestán S. (h)	Higiene, Epidemiología y S.P.
MOISO, Alejandro C.	Microbiología
NOVARINI, Miguel A.	Farmacología F. y Terapéutica
OLIVA, Graciela A.	Virología
PRIO LOPEUDO, Graciela E.	Zootecnia Especial III (A. y P.)
REHNER, Juan E.	Clínica de Grand. Animales

ROJAS, Edmundo R.	Fisiología
RUTTER, Bruno	Patología de la Rep. y Obst.
TARSIA, Elba E.	Int. a la Biofísica
TESORIERO, Catalina	Física y Química Aplicada
VENTURINI, Lucila M.	Parasit. y Enf. Parasitarias
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos I parte
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos II parte
YANNARELLA, Francisco G.	Parasitología y E. Parasitarias

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS

DE LOS ANTICUERPOS AGLUTINANTES Y NO AGLUTINANTES PRODUCIDOS

EN LA BRUCELOSIS BOVINA

(TESIS)

CARLOS GUILLERMO SANTISTEBAN

DIRECTOR DE TESIS: Prof. Dr. Alberto E. Parma

Trabajo de investigación realizado en el
Laboratorio de Inmunquímica, Instituto de Biología, Facultad de
Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de -
la Provincia de Buenos Aires.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Alberto E. Parma por su dirección y colaboración constante durante todo el desarrollo de este trabajo.

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata por autorizarme a realizar este trabajo fuera de la Facultad.

A las autoridades de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires y de su Facultad de Ciencias Veterinarias por el apoyo recibido.

A todos mis compañeros de laboratorio por la colaboración prestada en la ejecución de este trabajo.

A mis hijas Lilia Marina, María Elina y María Paz, y a mi esposa por su constante estímulo y apoyo durante la realización de este trabajo.

A la memoria de mi padre, por su ejemplo de hombre de bien, y dedicación al estudio que me legó.

ABREVIATURAS

AcH ₁₀₀	: unidad anticuerpo hemolítico 100%.
agl.	: aglutinante.
CH ₁₀₀	: unidad complemento hemolítico 100%.
c.p.m.	: cuentas por minuto.
DEAE	: dietilaminoetil.
DO:	: densidad óptica.
DNP	: dinitrofenol.
$E_{1\%}^{1\text{cm}}$: coeficiente de extinción porcentual.
e.v.	: endovenosa.
F (ab') ₂	: fragmento bivalente con actividad anticuerpo <u>provenien</u> te de una molécula de Ig G.
Fc	: fragmento cristalizabile sin actividad anticuerpo <u>prove</u> niente de una molécula de Ig G.
GRC	: glóbulos rojos de carnero.
IIE	: índice de infección esplénica.
Ig G	: inmunoglobulina G.
Ig M	: inmunoglobulina M.
K	: índice de fagocitosis.
K _o .	: constante de asociación intrínseca promedio.
log.	: logaritmo.
mg	: miligramo.
ml	: mililitro.
mmol	: milimol.
nm	: nanómetro.

r.p.m. : revoluciones por minuto.
SSE : solución salina estabilizada.
 μ ci : microCurie.
 μ g : microgramo.

I N D I C E

	<u>Página</u>
Introducción	15
Materiales y Métodos	25
Resultados	47
- Propiedades inmunoquímicas	49
- Propiedades biológicas	56
Discusión	74
Conclusiones	79
Resumen	80
Bibliografía	82

INTRODUCCION

El contacto de bovinos con Brucella abortus ya sea por vacunación o infección, despierta mecanismos inmunológicos humorales y mediados por células.

Sin embargo, trabajando con la cepa 19 de este microorganismo, no se ha podido demostrar correlación en la evolución de ambas respuestas (1 - 3).

Es conocido el hecho que la Brucella abortus tiene la propiedad de sobrevivir y replicarse en el citoplasma de células fagocíticas (4, 5), estando en esas condiciones resguardada de los anticuerpos humorales.

La eliminación de esas bacterias requiere participación de linfocitos dependientes del timo (linfocitos T) que segregan una variedad de factores no - inmunoglobulínicos llamados linfoki-

nas (6, 7).

Esto, de ningún modo significa que la inmunidad humoral no juegue un rol activo en distintos mecanismos de agresión a Brucella células.

Así, Cunningham (10) reporta que la transferencia de anticuerpos calostrales protegen a terneros expuestos a Brucella abortus al nacimiento (secreciones uterinas) y posteriormente alimentados con leches infectadas. Observa que los anticuerpos maternos protegen al 85% de los terneros en experimentación.

Trabajos previos indicaban que la transferencia pasiva de sueros de animales inmunes a Brucella abortus no confería inmunidad a animales adultos normales ni detenía la infección en bovinos enfermos (8, 9).

Más recientemente, Bascoul y colaboradores, muestran — que la administración de sueros inmunes puede inhibir el desarrollo de Brucellas dentro de un organismo (11). Confirmando protección a ratones no inmunes contra brucelosis experimental.

Con respecto a la clase de inmunoglobulinas que aparecen en suero como consecuencia de la vacunación o de una infección se han realizado numerosos estudios.

La vacunación con cepa 19 en bovinos induce la formación de Ig M a los cinco días, alcanzando su máximo nivel a los trece días. Anticuerpos de la clase Ig G aparecen más tarde haciendo un pico a los 28-42 días.

El nivel de la Ig M declina aunque no siempre desaparece, mientras que la Ig G disminuye temprano.

Tanto en el hombre como en los animales, la infección natural va seguida de la aparición de Ig M e Ig G, pero contrariamente a lo que sucede después de la vacunación, desciende únicamente la concentración de la Ig M (12),

Beh (13) demuestra que muchos de los anticuerpos anti Brucella abortus que aparecían en suero siguiendo la vacunación de vacas y terneras con cepa 19 pertenecía a las clases Ig M e Ig G₁. En terneras los niveles de anticuerpos de la clase Ig M se incrementaban rápidamente después de la vacunación llegando a un pico máximo entre los días 14-16. En contraste los anticuerpos de tipo Ig G₁ se elevaban más lentamente llegando a valores picos entre 16 y 32 días. En animales adultos esos picos de anticuerpos fueron menos pronunciados.

En animales adultos y terneros los anticuerpos anti Brucella abortus asociados a Ig G₂ fueron producidos en menor cantidad.

Beh encuentra en vacas clasificadas serológicamente como infectadas, que la mayoría de los anticuerpos séricos fueron de la clase Ig G₁, con pequeñas cantidades presentes de Ig M.

Beh (14) por un lado y Patterson y colaboradores (15) por otro, encuentran que la actividad fijadora del complemento del suero está asociada con la Ig G₁ e Ig M, estando ausente en -

la Ig G₂ .

La actividad aglutinante se encontró asociada a las — tres clases de inmunoglobulinas: Ig M ; Ig G₁ e Ig G₂ .

En suero de animales infectados se han detectado anticuerpos precipitantes que reaccionan con antígenos diferentes a a aquellos que lo hacen con los aglutinantes (44).

El suero de personas y animales brucelosos suelen mostrar reacciones de aglutinación negativa, debida a anticuerpos — existentes en él, que bloquean al antígeno e impiden la aglutinación.

La presencia de esos anticuerpos bloqueadores ha sido — señalada por varios autores, entre ellos Taylor y Lisboune, quienes en 1935, los llamaron "sustancias inhibidoras" de la aglutinación.

Griffiths demostró que pueden existir en personas brucelósicas donde el serodiagnóstico es negativo (16).

En el año 1945 Coombs (17) describe la prueba que lleva su nombre para detectar la presencia en suero de esos anticuerpos y fue aplicada por otros investigadores en el diagnóstico de la brucelosis en el hombre y los animales (18 - 22).

Forget y Borduas (23) hallaron anticuerpos coaglutinantes en suero de pollos inoculados repetidamente con Brucella abortus cepa 19. Esos sueros, inyectados a pollos pequeños previo a —

las bacterias vivas, provocaron un incremento en la proliferación de los gérmenes en el bazo.

Mc Cutchan y colaboradores observaron un incremento de anticuerpos con actividad bloqueante en infecciones a gonococos - (24).

También fue hallado este tipo de anticuerpos en humanos con Tripanosomiasis americana (25) y en ratas infectadas experimentalmente con Trichinellas spiralis (26).

En animales estimulados repetitivamente con antígenos - solubles, aparece un tipo de anticuerpo, que si bien se puede hallar en los precipitados antígeno anticuerpo, es incapaz de producir la precipitación por sí solo.

Heidelberger y Kendall (34) en 1935 fueron los primeros en describir en sueros precipitantes de conejos ese tipo de anticuerpos.

Por no producir la precipitación por sí solos pero co-precipitar sobre los complejos antígeno - anticuerpos, fueron llamados co-precipitantes y considerados univalentes para justificar su comportamiento de acuerdo a la teoría de la precipitación en enrejado (35).

Fiset (36), trabajando en zona de equivalencia con anticuerpos de conejo anti seroalbúmina bovina y anti ovoalbúmina, halló que al ir reemplazando partes crecientes de anticuerpos precipitantes por su homólogo coprecipitante, la masa de precipitado -

obtenido al incubarlos con el antígeno correspondiente iba decreciendo a medida que crecía la relación anticuerpo coprecipitante/ anticuerpo precipitante, pero siempre la cantidad de precipitado era mayor a la obtenida sin agregar la dosis de co-precipitante.- Esto está diciendo que estos anticuerpos se unen al antígeno específico y coprecipitan, pero no son capaces de iniciar la precipitación.

Con respecto a la imposibilidad de los anticuerpos no precipitantes de iniciar y producir la precipitación del antígeno se elaboraron distintas hipótesis para explicarla:

a) Los anticuerpos no precipitantes serían hemimoléculas.

b) Poseerían un número mayor de puentes disulfuro entre las cadenas H (pesadas), de manera de restar flexibilidad a la molécula, dificultando la unión a un segundo grupo antigénico.

c) Tendría muy baja afinidad por el antígeno y se elaboraría al comienzo de la inmunización.

d) Los fragmentos Fc de estos anticuerpos tendrían carga que causaría repulsión y dificultaría la precipitación.

En 1972, Margni y Binaghi aportaron argumentos que desechan esas posibilidades (33). Así, trabajando con poblaciones purificadas de anticuerpos precipitantes y co-precipitantes de conejo con especificidad para ovoalbúmina y DNP, demostraron identidad entre ellos y con Ig G normal de conejo, mediante inmunoelectroforesis e inmunodifusión radial.

Empleando anticuerpos co-precipitantes de conejo marcados con ^{125}I demuestran que el tamaño molecular es el mismo que el de la Ig G normal, como quedó demostrado al coincidir el pico-eluido de Sephadex G - 200 determinado por medida de la densidad-óptica (DO) a 280 nm y por medida de radioactividad.

Una baja afinidad por el antígeno queda desechada luego de estudios de la medida de K_0 (constante de asociación intrínseca promedio) por equilibrio de diálisis con coprecipitantes Ig G₁ e Ig G₂ de cobayo (37).

El fragmento F (ab')₂ de anticuerpos coprecipitantes no produjo precipitación con el antígeno, con lo cual también se descarta la participación de Fc en ese impedimento.

Utilizando Ig G₁ coprecipitante de oveja, se determinó que la valencia de esos anticuerpos es dos, con distinta afinidad de combinación por el antígeno (38).

En cambio, con Ig G₁ precipitante se demuestra la presencia de dos sitios de combinación de igual afinidad.

Todo esto habla de la presencia de un sitio de combinación de alta y otro de baja afinidad en la molécula de estos anticuerpos.

En cuanto a sus propiedades biológicas, las Ig G precipitantes y coprecipitantes de conejo se mostraron capaces de desencadenar anafilaxia cutánea pasiva en cobayo, a pesar que la dosis mínima requerida de coprecipitante fue mayor (33). Sólo la de

tipo precipitante fijó complemento.

En equinos inoculados con DNP - gammaglobulina humana, se aislaron y purificaron anticuerpos precipitantes y coprecipitantes correspondientes a tres de las sub-clases de Ig G (Ig G_a, Ig G_b e Ig G_o) (39).

Ambos tipos de anticuerpos, precipitantes y coprecipitantes, de conejo, cobayo y oveja, con especificidad a DNP, fueron ensayados en su capacidad para mediar citotoxicidad (51). Empleando como células blanco glóbulos rojos de esas tres especies, dinitrofenolados y marcados con ⁵¹Cr, como células efectoras linfocitos periféricos, los anticuerpos precipitantes y coprecipitantes de las diferentes especies mostraron capacidad para mediar citotoxicidad siempre que no existiera homología entre células efectoras y anticuerpos.

En lo que a fagocitosis atañe, únicamente los anticuerpos precipitantes favorecen la depuración sanguínea de antígeno, siendo inefectivos los coprecipitantes.

En trabajos realizados en nuestro laboratorio con conejos estimulados repetitivamente con antígenos particulados T-dependientes (*Salmonella typhimurium*), se ha demostrado que se sintetizan anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes contra el antígeno. (41)

Los anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes fueron de la clase Ig G. Los estudios de filtración por geles demuestran

que ambos anticuerpos tienen el mismo tamaño molecular, lo que — descarta la posibilidad de que los anticuerpos que no aglutinan — pudieran ser hemimoléculas univalentes.

Con respecto a la capacidad de activar el complemento, — los anticuerpos coaglutinantes se mostraron inefectivos, mientras que los aglutinantes lo hicieron.

Los ensayos sobre fagocitosis mostraron marcadas diferencias entre los dos tipos de anticuerpos. Los aglutinantes favorecieron la depuración antigénica, mientras que los coaglutinantes no indujeron esta depuración o lo hicieron en menor grado.

En ensayos de protección en ratón, los anticuerpos no aglutinantes requirieron dosis superiores a la de los anticuerpos-aglutinantes para ejercer un efecto equivalente (42).

Pocos autores se han ocupado del estudio de los mecanismos humerales de inmunidad en brucelosis bovina, otorgándole atención e importancia sólo a nivel diagnóstico, no habiéndose realizado hasta el momento trabajos sobre los anticuerpos coaglutinantes producidos con intención de dilucidar su comportamiento biológico in vivo e in vitro, razón por la cual lo abordaremos en esta tesis.

Considerando el comportamiento particular de los anticuerpos coaglutinantes aislados de conejos estimulados repetidamente con un antígeno particulado, — ineficacia en el favorecimiento de la fagocitosis, en la fijación y activación del complemento, en la protección del huésped a la infección experimental, —

y el hecho de haberse demostrado su presencia en sueros de pacientes con parasitosis crónicas (chagas, triquinosis), y bacterianas (brucelosis, gonococcia), este trabajo estudia el comportamiento-biológico e inmunológico de anticuerpos coaglutinantes producidos por bovinos inyectados repetitivamente con Brucella abortus - cepa 19 y de aquellos obtenidos de casos de animales infectados - en forma natural, con el fin de tratar de interpretar el papel - que podrían tener en los mecanismos de iniciación y/o establecimiento de la cronicidad de la enfermedad.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología (Instituto de Biología) dependiente de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Los animales de experimentación fueron cedidos por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Se contó con la ayuda económica proveniente de subsidios de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno utilizado. Se empleó como tal una suspensión - de Brucella abortus cepa 19 en fase lisa, gentilmente cedida por el Centro Panamericano de Zoonosis.

Los microorganismos fueron cultivados en agar papa durante 48 - 76 hs. a 37° C en estufa.

El medio de cultivo fue preparado de la siguiente manera: lavar y pelar algunas papas crudas y sanas, cortar 250 g en finas rodajas y, evitando en lo posible su exposición al aire, introducir las en 1.000 ml de agua destilada. Hervir la mezcla durante 30 minutos. Filtrar después por gasa.

Reconstituir el filtrado con agua destilada hasta 1.000 ml y añadir los siguientes ingredientes: cloruro sódico, 5 g; peptona 10 g; extracto de carne de buey, 5 g y agar 30 g. Calentar la mezcla para que se funda el agar (1 hora en corriente de vapor).

Agregar 20 ml de glicerina y ajustar el medio a un pH de 7, añadiendo una solución de hidróxido de sodio al 10%. Poner por último el medio en autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 120 ° C.

Los microorganismos cultivados fueron recogidos en solución salina estabilizada con fosfatos en pH 6,3, preparada de la manera siguiente: disolver 0,5 g de fosfato monosódico dihidratado ($\text{Na H}_2 \text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$); 0,22 g de fosfato disódico anhidro ($\text{Na}_2\text{H PO}_4$); y 8,5 g de cloruro de sodio, llevando a 1.000 ml con agua destilada. Controlar el pH y esterilizar.

El número de gérmenes por mililitro de suspensión terminada se determinó empleando el método de recuento de gérmenes viables del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, descrito a continuación: para preparar las diluciones necesarias se emplean cuatro frascos de Pyrex con tapón de caucho o tapón roscado. En tres de los frascos se vierten 99 ml de solución peptonada estéril (solución al 1% de peptona y 0,5% de cloruro de sodio en agua destilada), y en el cuarto frasco se vierten 90 ml.

Con pipeta se introduce 1 ml de la suspensión de gérmenes perfectamente resuspendida en el frasco N° 1 que contiene 99 ml de solución peptonada y se agita la mezcla durante un minuto. Se pasa 1 ml de esta suspensión al frasco N° 2 y luego de agitarse repite la operación con el N° 3.

Después de agitar el frasco N° 3 se transfieren 10 ml -

al frasco N° 4, que contiene 90 ml de solución peptonada, agitando de la misma manera como se hizo con los tres primeros frascos. Para cada traslado se emplea una pipeta nueva. Los frascos Nros. 1 y 2 se desechan porque sus diluciones son demasiado bajas para hacer un recuento satisfactorio.

Se preparan dos placas de agar-papa, recibiendo cada una 0,1 ml de la dilución procedente del frasco N° 3.

Para obtener una dispersión uniforme se extienden las placas con una varilla de platino o de cristal. Del mismo modo, en cada una de cuatro placas de agar papa se extiende el mismo volumen de la dilución del frasco N° 4. Para conseguir la máxima exactitud se preparan siempre varias placas con cada dilución. Las placas sembradas se colocan boca abajo y se incuban durante 4 días a 37° C, después de lo cual se cuenta el número de colonias. Se hace el conteo del número de colonias por placa, si se sembraron varias se hace un promedio. Luego se multiplica por la dilución sembrada y esto nos da el número de gérmenes de nuestra suspensión original en 0,1 ml que fue la cantidad que se sembró. Por simple regla de tres se calcula la cantidad de gérmenes por mililitro.

La suspensión microbiana que se utilizó para inocular los animales fue ajustada a una concentración de 10×10^9 microorganismos viables por mililitro, utilizando solución salina establizada con fosfatos como diluyente.

Previo a su utilización se le hicieron los siguientes -

controles;

Pruebas de identidad:

a) se hicieron extendidos en portaobjetos, coloreándose por el método de Gram. Se observó la presencia exclusiva de cocobacilos Gram negativos.

b) Siembra en agar papa en tubo inclinado, incubación a 37° C durante 4 días y observación del aspecto peculiar y característico de las colonias.

Pruebas de disociación: Se cultivó una muestra del lote en agar papa o en agar tripticasa soja y examinó bajo iluminación reflejada oblicua. Se utilizó el método de tinción con cristal — violeta. La solución madre del colorante se preparó disolviendo — 2g de cristal violeta certificado en 20 ml de alcohol absoluto y 0,8 g de oxalato amónico en 80 ml de agua destilada; una vez que se han disuelto por completo ambas soluciones, se las mezcla para formar la solución madre. Inmediatamente antes de emplearla debe diluirse a 1 : 40 en agua destilada.

Las placas se cubrieron con la dilución del colorante — durante 15 a 20 segundos, y después de verter éste en un frasco — con desinfectante se examinaron inmediatamente con un microscopio estereoscópico. Las colonias lisas no toman el colorante; las disociadas se tiñen en distintos tonos de rojo y violeta y en su superficie pueden presentarse grietas radiales. Se utilizaron suspensiones de Brucelas con 95% o más de colonias pertenecientes a la variedad lisa (27).

Animales e inoculación: Una ternera de raza Hereford de seis meses de edad, no vacunada con anterioridad contra brucelosis, y dos hembras de cuatro años, vacunadas contra brucelosis — cuando terneras, sanas y también de raza Hereford, fueron inoculadas quincenalmente, durante doce meses, por vía subcutánea con 5 ml de la suspensión microbiana usada como antígeno en una concentración de 10×10^9 bacterias / ml. Previo a cada inoculación los animales fueron sangrados de la vena yugular y los sueros obtenidos analizados por separado.

Se tomaron muestras de sangre de animales enfermos naturalmente (50 muestras), entre ellos, de un toro con diagnóstico de brucelosis crónica.

Muestras de suero de varios animales infectados experimentalmente en el Centro Panamericano de Zoonosis, nos fueron gentilmente cedidas.

Dosaje de anticuerpos aglutinantes. Se efectuaron aglutinaciones en tubo usando 0,2 ml de diluciones seriadas de suero en razón dos, e igual volumen de suspensión antigénica. Como suspensión antigénica se utilizó la misma empleada para inocular los animales, pero en este caso las bacterias fueron muertas por calor sometiénolas durante 1 hora a 95°C en bañomaría. Luego de tres lavados con solución salina estabilizada se ajustó a una concentración celular de 0,135%

La mezcla de las diluciones seriadas de suero y antígeno fue incubada a 37°C durante 60 minutos. Luego se efectuó la -

lectura a ojo desnudo y con luz transmitida. Se expresó como título la inversa de la máxima dilución aglutinante.

Dosaje de anticuerpos no aglutinantes. En todos aquellos tubos de las series correspondientes al dosaje de anticuerpos aglutinantes, que no dieron aglutinación directa, se investigó la presencia de anticuerpos no aglutinantes fijados a las bacterias, mediante reacción de Coombs (17). Para ello las suspensiones bacterianas fueron lavadas con solución salina estabilizada (SSE; Na Cl 0,15 M, fosfatos 0,01 M, pH 7,4) y puestas en contacto con suero de conejo anti gammaglobulinas de bovino, en concentración adecuada e incubadas a 37° C durante 60 minutos. El título de anticuerpos totales, al igual que con los anticuerpos aglutinantes, fue considerado como la inversa de la máxima dilución que deba aglutinación. La diferencia entre éste y el de anticuerpos aglutinantes, permitió obtener el título de los no aglutinantes.

Obtención del suero de Coombs. El suero anti gammaglobulinas de bovino empleado fue preparado en conejos de la siguiente manera: se inyectó subcutáneamente en las caras internas de las patas 1 ml de gammaglobulina bovina (10 mg/ml) mezclado con igual volumen de adyuvante de Freund completo. Una semana después se preparó idéntica mezcla e inyectó cuatro dosis de 0,5 ml a lo largo de la columna vertebral. A las tres semanas se repitió una inyección igual a la primera. Los animales fueron sangrados a blanco cuando sus sueros mostraron un título adecuado. La gammaglobulina bovina se obtuvo por precipitación salina con sulfato de amoníaco.

nio a partir de un conjunto de sueros normales. Para ello se agregó lentamente y con agitación continua un volumen de solución saturada de sulfato de amonio (760 g / l - pH 7) a un volumen de -- suero bovino. El precipitado se separó por centrifugación durante 30 minutos a 5.000 r.p.m., en centrífuga refrigerada y fue redi--uelto en un volumen de agua destilada igual a la mitad del ini--cial de suero. El mismo volumen de solución de sulfato de amonio--a 2/3 de saturación se adicionó al anterior, de manera de obtener una concentración salina correspondiente a 1/3 de saturación. Luego de separar el precipitado por centrifugación y redisolverlo en agua destilada, se repitió tres veces la operación anteriormente--descripta. La solución de gammaglobulinas fue dializada contra --SSE hasta que el líquido de diálisis diera reacción negativa de --sulfatos mediante agregado de gotas de cloruro de bario al 5% y --su concentración fue medida por lectura espectrofotométrica a 280 nm, previa centrifugación a 5.000 r.p.m. durante 30 minutos, para eliminar la proteína desnaturalizada. Para las conversiones de --densidad óptica (DO) a mg/ml se utilizó un coeficiente de extin--ción ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$) de 13,7 (28). La DO, a 280 nm de longitud de onda, --multiplicada por $1 / E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ da los g % de esa proteína.

Si en cambio, la DO es multiplicada por $10 / E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ o --bien por 0,73 , se obtendrán los mg de gammaglobulina bovina por--ml de solución.

Este factor se empleó cada vez que fue necesario medir--la concentración de anticuerpos en soluciones puras.

Homogeneizado de Brucella abortus. Treinta ml de una — suspensión en SSE de Brucella abortus vivas de $1,2 \times 10^{11}$ bacte— rias/ml fueron homogeneizadas por sonicación con un desintegrador ultrasónico Megason, durante 60 minutos en máxima potencia (300 W) y en baño de hielo.

Los microorganismos que resistieron el tratamiento y — fragmentos de ellos, se separaron por centrifugación a 10.000 r.p m. durante 20 minutos. Este antígeno se empleó en el estudio de — la capacidad precipitante de las poblaciones purificadas de anti— cuerpos.

Ensayo de bloqueo. Diluciones no aglutinantes de suero— pero capaces de dar reacción de Coombs positiva fueron puestas en contacto con la suspensión antigénica (bacterias al 0,135%) e in— cubadas a 37° C durante 60 minutos. Previa centrifugación y lava— do, esta suspensión fue utilizada para medir la capacidad aglutj— nante de los sueros en ensayo. Paralelamente se efectuó otra se— rie de reacciones similares a la anterior en la que el suero en — el que se investigaba anticuerpos no aglutinantes fue sustituido— por SSE. La capacidad bloqueante fue establecida por la diferen— cia entre los títulos aglutinantes de ambas series.

Determinación de la clase de inmunoglobulina en que es— taba la actividad anticuerpo. Fue realizada por inmunolectrofore— sis, utilizando suero de conejo anti gammaglobulinas de bovino co— mo reactivo precipitante (29). Los productos a analizar provenían de la disociación de los anticuerpos fijados a las suspensiones —

bacterianas puestas previamente en contacto con diluciones de sueros aglutinantes y no aglutinantes (pero con Coombs positiva).

Esta disociación fue hecha por tratamiento con solución amortiguadora glicina - HCl 0,1 M - pH 3, neutralizando inmediatamente los productos obtenidos con Tris 0,2 M (30, 31).

La inmunoelectroforesis se efectuó en gel de agar (Agar Noble - Difco) al 1,5%, empleando solución estabilizadora de Veronal sódico, fuerza iónica 0,05 - pH 8,4. La corrida se desarrolló durante 60 minutos con una intensidad de corriente de 6 V/cm.

Tras la precipitación y lavado, las bandas se colorearon con Amido - Schwartz. La solución colorante estaba constituida por:

Amido schwartz 10 B	0,100 g
Metanol	45 ml
Agua destilada	50 ml
Acido acético	5 ml

La solución decolorante empleada tenía la misma composición que la anterior, pero sin el agregado del colorante.

Los preparados fueron secados a 37° C en estufa con circulación forzada de aire.

Aislamiento de los anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes. Se utiliza el método descrito para aislamiento de anticuerpos precipitantes y coprecipitantes (32, 33). Para ello fueron con altos títulos aglutinantes por un lado y de no aglutinan-

tes (por prueba de Coombs) por otro, se incubaron con sucesivas alícuotas de antígeno, correspondientes a 1/20 de la cantidad de bacterias necesarias para la adsorción total de los anticuerpos.

La suspensión bacteriana usada en las inmunoadsorciones estaba constituida por una suspensión densa de Brucella abortus - Cepa 19 inactivadas por calentamiento a 95° C en bañomaría durante 60 minutos.

Cada agregado de bacterias fue seguido de una incubación a 36° C durante 1 hora en un baño de agua con agitación continua (New Brunswick Scientific). Luego de 1 hora a 4° C, se centrifugó a 3.500 r.p.m. - 15 minutos y se agregó una nueva alícuota de inmunoadsorbente al sobrenadante, conservándose en heladera el sedimento, repitiendo la operación hasta que los sobrenadantes no aglutinaran las bacterias pero dieran positiva la reacción de Coombs. A dichos sobrenadantes se les añadió entonces un exceso de suspensión bacteriana para adsorber los anticuerpos remanentes. Las suspensiones bacterianas que tenían adsorbidos los anticuerpos aglutinantes fueron reunidos y lavados con SSE, procediéndose de igual modo con la suspensión que contenía los anticuerpos sólo detectados por reacción de Coombs.

Ambas suspensiones fueron tratadas con glicina - HCl // 0,1 M pH 3 a los fines de lograr la desorción de los anticuerpos fijados.

Estos sobrenadantes se neutralizaron inmediatamente con Tris, 0,2 M (Tris hidroximetil - metil amina 0,2 M).

Purificación de anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes. Ambas soluciones conteniendo los anticuerpos aglutinantes y no aglutinantes se dializaron contra solución de fosfatos 0,005 M pH 8. Para esto las soluciones con los anticuerpos se colocaron dentro de tripas de celofán semipermeable previamente hervidas en agua destilada.

Luego de la diálisis se pasaron por una columna de DEAE Sephadex A-50 de 10 X 220 mm, estabilizada en la misma solución reguladora. La elución se realizó mediante gradiente continuo de fosfatos (0,005 - 0,300 M) (50).

Se probó la identidad de las inmunoglobulinas purificadas por medio de inmunolectroforesis, (29), empleando suero de conejo anti gammaglobulina bovina como reactivo precipitante.

Inmunodifusión radial. Se realizó con el propósito de estudiar la capacidad precipitante de los anticuerpos anti Bruce-lla, utilizando como antígeno el sonificado de una suspensión de bruce-llas.

Siguiendo la técnica descripta por Ouchterlony (43), se dispuso en una caja de Petri de 6 cm de diámetro una doble capa de agar Noble - Difco en SSE, la inferior constituida por 2 ml al 2% y la superior por 4 ml al 1%. Empleando sacabocados se efectuaron en la capa superior siete cavidades de 6 mm de diámetro, teniendo como fondo a la capa inferior de agar y dispuestas de manera que una de ellas estuviera rodeada de las seis restantes y la distancia entre sus centros fuera de 10 mm. La cavidad central —

fue destinada al sonicado de Brucella abortus y en las otras se colocaron distintas diluciones de suero bovino adsorbido con bacterias enteras y sueros sin adsorber.

Luego de dejar a 25° C durante 24 horas en cámara húmeda, se procedió a lavar con SSTE la proteína precipitada, durante otras 24 horas. La coloración, lavado y secado se efectuaron en las condiciones indicadas para inmunoelectroforesis.

Dosaje de anticuerpos precipitantes. Se efectuaron precipitaciones en tubo usando 0,5 ml de diluciones seriadas en razón dos de suero sin adsorber e igual cantidad del homogeneizado de Brucella abortus como antígeno. Luego de incubar 1 hora a 37°C y 24 horas a 4° C, se hicieron las lecturas a ojo desnudo y con luz transmitida.

Obtención de hemolisina. Se preparó por inmunización de un conejo adulto de 3 Kg de peso, usando como antígeno glóbulos rojos enteros de oveja o sangre total, según el siguiente plan de estimulación (45):

<u>día</u>	<u>antígeno</u>	<u>dosis</u>	<u>vía</u>
1	sangre total ovino	0,5 ml	s. c.
3	" " "	0,5 ml	"
5	" " "	1,5 ml	"
7	" " "	2,0 ml	"
9	" " "	2,5 ml	"
12	glóbulos rojos al 20%	1,0 ml	e.v.
14	" " " "	1,0 ml	"
16	" " " "	1,0 ml	"
18	sangría exploratoria		

Quando el título fue el adecuado, el animal fue sangrado a blanco y el suero separado y titulado.

Obtención del complemento. Como fuente de complemento se empleó una mezcla de sueros provenientes de 20 cobayos. Previa titulación fue fraccionado, liofilizado y conservado a -80° C.

Titulación de la hemolisina. Fue hecha con lectura de 100% de hemólisis. En todos los casos se empleó como diluyente solución estabilizadora de Mayer.

Solución estabilizadora concentrada de Mayer (45):

NaCl	83 g
Veronal sódico	10,19 g
Agua destilada	1.500 ml
(llevar a pH 7,5 con HCl 1 N)	
Soluc. $MgCl_2$ 1 M - $Ca Cl_2$ 0,3 M	5 ml
Agua destilada c. s. p.	2.000 ml

Solución de trabajo de Mayer; diluir la anterior 1/5 — controlando el pH. Debe ser preparada en el día.

El protocolo seguido fue el indicado en el cuadro I.

Luego de agitar, se incubó 30 minutos a 37° C con agitaciones periódicas. Los sobrenadantes de los centrifugados fueron leídos en espectrofotómetro a 530 nm, ajustando a DO cero (0% de hemólisis) con el correspondiente al tubo 20.

El 100 % de hemólisis estaba representado por la lectura del sobrenadante 21.

CUADRO I

Tubo	H 1/100 (ml)	H 1/100 (ml)	Soluc. Mayer (ml)	GRC 5% (ml)	Suero Cobayo 1/30 . (ml)
1	0,30	-	0,70	0,50	0,50
2	0,25	-	0,75	0,50	0,50
3	0,20	-	0,80	0,50	0,50
4	0,15	-	0,85	0,50	0,50
5	0,10	-	0,90	0,50	0,50
6	-	0,80	0,20	0,50	0,50
7	-	0,70	0,30	0,50	0,50
8	-	0,65	0,35	0,50	0,50
9	-	0,60	0,40	0,50	0,50
10	-	0,55	0,45	0,50	0,50
11	-	0,50	0,50	0,50	0,50
12	-	0,45	0,55	0,50	0,50
13	-	0,40	0,60	0,50	0,50
14	-	0,35	0,65	0,50	0,50
15	-	0,30	0,70	0,50	0,50
16	-	0,25	0,75	0,50	0,50
17	-	0,20	0,80	0,50	0,50
18	-	0,15	0,85	0,50	0,50
19	-	0,10	0,90	0,50	0,50
20	-	-	1,00	0,50	0,50
21	0,50	-	0,50	0,50	0,50

El título hemolítico del suero se calculó por esta expresión:

Dilución suero

V

donde V es el volumen de suero diluido correspondiente al tubo — que contiene la mayor dilución capaz de dar hemólisis total.

Titulación del complemento. Se empleó uno de los métodos más usados basado en el efecto citotóxico del complemento sobre glóbulos rojos sensibilizados por hemolisina y medición de la densidad óptica producida por la hemoglobina liberada.

Se trabajó con la unidad hemolítica 100%, definida para nuestro sistema como la cantidad de suero capaz de hemolizar 1 ml de sistema hemolítico formado por volúmenes iguales de glóbulos rojos de carnero al 5% y hemolisina en concentración óptica — (5 CH_{100} /ml), en presencia de Ca^{++} y Mg^{++} , a 37° C durante 30 minutos en un volumen total de 2 ml (45).

El protocolo de la titulación fue el indicado en el cuadro II.

Luego de incubar a 37° C durante 30 minutos se determinó cuál era la mayor dilución de suero de cobayo capaz de hemolizar la totalidad de glóbulos rojos. El número de unidades CH_{100} / ml de suero se obtuvo por la relación:

30

V

donde 30 es la dilución original del suero de cobayo y V el volu-

CUADRO II

tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
suero cobayo 1/30 • (ml)	*	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
soluc. de Mayer (ml)	1,00	0,95	0,90	0,85	0,80	0,75	0,70	0,65	0,60	0,55	0,50
sistema hemolftico (ml)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

CUADRO III

tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Ac 100 microgramos/ml (ml)	0,025	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	-
<u>B. abortus</u> 0,22% (ml)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
suero cobayo dosis efect.								
1 CH ₁₀₀ / 0,4 ml (ml)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	-	0,40
solución de Mayer (ml)	0,475	0,45	0,40	0,30	0,20	0,10	0,40	0,50
	incubación 37° C - 60 minutos							
sistema hemolítico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	incubación 37° C - 30 minutos							
	lectura de los resultados							

men de la misma correspondiente al tubo que daba 100% de lisis.

Fijación del complemento. La actividad fijadora de complemento de los anticuerpos fue ensayada por determinación de — 100% de hemólisis (cuadro III).

El sistema hemolítico usado estaba formado por volúmenes iguales de glóbulos rojos al 5% y suero hemolítico 2 ACH_{100} / ml.

La dosis efectiva CH_{100} se ajustó de forma tal que la hemólisis en el tubo 8 fuera del 100%. Este criterio se adoptó — considerando la fijación inespecífica de complemento por parte de la suspensión bacteriana.

Las lecturas de DO se efectuaron a 530 nm, correspondiendo los tubos 7 y 8 al 0% y 100% de hemólisis, respectivamente

Velocidad de fagocitosis de Brucella abortus por el SRE del ratón. Para este ensayo se emplearon Brucellas abortus Cepa - 19 inactivadas con formol al 1% y marcadas con ^{131}I mediante la técnica del cloruro de iodo de Mc Farlane (46), como se describe más adelante. Los ratones (machos adultos cepa CH_1 convencional) recibieron por la vena caudal 0,1 ml de una suspensión de 1×10^9 bacterias/ml, radiomarcadas. A continuación cada ratón fue inoculado por vía retroorbital con 0,1 ml de distintas diluciones de — sueros de bovinos que presentaban títulos aglutinantes, con o sin título coaglutinante y de suero bovino normal.

Muestras de sangre de 50 microlitros, tomadas a distin-

tos tiempos de la otra cavidad retroorbital, fueron recibidas en 0,5 ml de solución de Na_2CO_3 al 0,1%, midiéndose la actividad en un contador de pozo Alfa Nuclear.

En todos los casos se incluyeron animales en que la inoculación de anticuerpos fue sustituida por SSE, los que fueron utilizados para establecer la radioactividad circulante al tiempo-cero.

Con los valores medidos de radioactividad (cpm) se calculó en cada caso el Índice de Fagocitosis según la fórmula:

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{t_2 - t_1} \quad (47,48)$$

en la que C_1 y C_2 corresponden a los valores de las cpm a los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente.

En el planeamiento de los experimentos de fagocitosis, el número de bacterias marcadas a emplear fue calculado de manera de no producir una rápida saturación del SRE por exceso, ni perder sensibilidad en la medición de los efectos producidos por los anticuerpos, por escasa radioactividad circulante.

Marcación de Brucella abortus con ^{131}I . Se efectuó por el método de Mc Farlane (46, 49).

Los reactivos empleados fueron;

- solución de reserva; se la obtuvo por disolución de - 150 mg (1 mmol) de NaI y 99 mg (0,5 mmol) de NaIO_3 en 2,5 ml de a

agua destilada y añadiendo gota a gota 2,4 ml de HCl concentrado.- A continuación se agregó 1 ml de CCl_4 para eliminar el I_2 libre de la fase acuosa, la que luego fue completada a 10 ml con agua destilada.

- solución glicina - NaOH 0,1 M - pH 9: una solución de glicina 0,1 M fue llevada a pH 9 con solución de NaOH 0,1 M. Esta solución se empleó para el lavado de las bacterias, las que finalmente fueron suspendidas en la misma solución a una concentración de 1×10^9 bacterias/ml.

- solución de trabajo: se la obtuvo añadiendo a 1 ml de la solución de reserva (ICl), 2 ml de solución de NaOH 1 N, llevando a 50 ml con NaCl 1 M, lográndose de este modo la formación de IO^- . Para la marcación, 0,3 ml de la solución de trabajo se volcaron en un tubo conteniendo 350 μCi de Na^{131}I (Comisión Nacional de Energía Atómica) (formación de $^{131}\text{I-I}$). Se añadió inmediatamente después 4 ml de la suspensión bacteriana y agitó durante 30 a 60 segundos.

Después de lavar rápidamente las bacterias tres veces con SSE se las resuspendió en un volumen de 4 ml de la misma solución.

La suspensión de Brucella abortus cepa 19 utilizada fue inactivada con formol al 1% y llevada a la concentración de 1×10^9 .

Para determinar la concentración se utilizó un método turbidimétrico, empleando un espectrofotómetro Spectroplus ajust

tado a la longitud de onda de 420 nm e interpolando el valor de la transmitancia en el cuadro siguiente (27):

Recuento gérmenes viables (X 10 ⁹ /ml)	Volumen de cél. conglomeradas por 100 ml de la susp. original (ml)	% de transmitancia
2	0,06	90,6
4	0,12	80,5
6	0,18	72,8
8	0,24	64,3
10	0,30	56,8
12	0,36	50,6
14	0,42	45,6
16	0,48	40,2
18	0,54	36,3
20	0,60	32,8

Ensayo de protección. Índice de infección esplénica. A ratones (machos adultos cepa CH₁ convencional) se los inyectó por vena caudal con 0,1 ml de los productos de las desorciones seriadas, enriquecidos en anticuerpos aglutinantes (100 µg/0,1 ml) o en coaglutinantes (25,100 y 400 µg/0,1 ml). A controles se las inyectó gammaglobulina normal (100 µg/0,1 ml) y a otros 0,1 ml de ~~SSC~~.

Inmediatamente después, todos los ratones fueron inocu-

lados por vía endovenosa con 0,1 ml de una suspensión de Brucella abortus cepa 19 de una concentración de 7×10^9 bacterias viables / 0,1 ml.

Una semana después, los animales fueron sacrificados y sus bazos asépticamente extraídos. Se los homogeneizó, utilizando para ello homogeneizadores de Potter y SSE.

Luego fueron sembrados en distintas diluciones en placas de Petri con agar - papa. Se incubaron a 37°C por cuatro días (23).

Efectuado el recuento de colonias se transformó el dato a colonias por bazo.

Con estos valores, se procedió a calcular el índice de infección esplénica (IIE) según la fórmula siguiente; (11)

$$\text{IIE} = \frac{\text{Número de colonias en bazo immune}}{\text{Número de colonias en bazo normal}} \times 100$$

En otro experimento, ratones de la misma cepa fueron inoculados con 0,1 ml de SSE conteniendo $100 \mu\text{g}$ de solución enriquecida en anticuerpos coaglutinantes y controles con 0,1 ml de SSE conteniendo $100 \mu\text{g}$ de gammaglobulina normal.

Distintos lotes de ratones fueron sacrificados al día uno, tres y siete de inoculados, realizando el plaqueo y conteo de colonias en bazo como se indicó anteriormente.

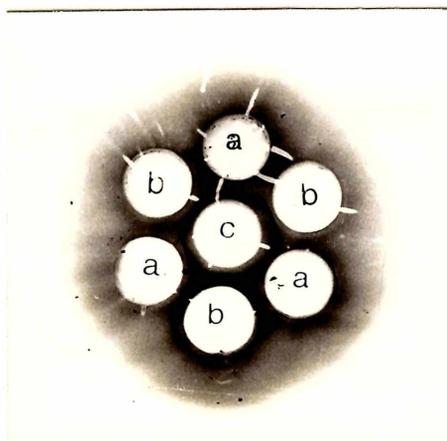
RESULTADOS

Para el aislamiento de los anticuerpos aglutinantes se utilizó suero de bovinos con reacción de Coombs negativa y exento de Ig M de acuerdo a la prueba del 2 - mercapto - etanol (2 ME).

Para intentar el aislamiento de los coaglutinantes se utilizaron sueros con máximas diferencias entre el título aglutinante y reacción de Coombs.

El aislamiento y purificación de los anticuerpos se realizó de acuerdo a la metodología descripta. Los productos de la disociación correspondientes al tratamiento con glicina HCl 0,1 M pH 3 de los anticuerpos fijados al inmunoabsorbente, se dializaron contra solución estabilizada de fosfato 0,005 M - pH 8 y se pasaron por separado, a través de una columna de DEAE - Sephadex A - 50 equilibrado en la misma solución. Eluyendo en ambos casos un único pico proteico a la molaridad de 0,02, Luego de medir la-

FIGURA 1



Immunodifusión radial en placa de anticuerpos aglutinante (a) y coaglutinante (b) de bovino anti Brucella abortus cepa - 19. Como reactivo precipitante se empleó suero de conejo anti bovino (c).

concentración de anticuerpos por espectrofotometría a 280 nm se concentró la solución empleando polyethylene - glycol 6.000 (Sigma), ajustando la concentración a 3 mg/ml.

La preparación de anticuerpos aglutinantes así obtenida resultó exenta de coaglutinantes. En cambio la de coaglutinantes si bien resultó notablemente enriquecida en este tipo de anticuerpos mantuvo rastros de anticuerpos aglutinantes que no fue posible separar siguiendo la metodología de Heidelberger y Kendall.

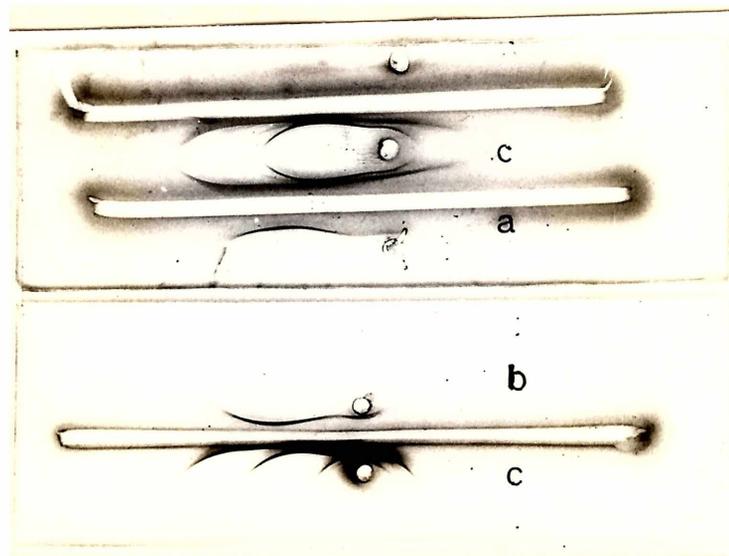
PROPIEDADES INMUNOQUIMICAS

Identidad antigénica: En una inmunodifusión radial (técnica de Ouchterlony), se obtuvo fusión completa de las líneas de precipitación entre anticuerpos aglutinantes y la mezcla enriquecida en coaglutinantes, frente a un suero anti-gammaglobulina bovino, no observándose formación de espines (Figura 1).

Características inmunolectroforéticas: Los anticuerpos referidos, corridos electroforéticamente en gel de agar y enfrentados con suero de conejo anti - gammaglobulinas de bovino, desarrollaron un arco de precipitación con las características de una Ig G₁. No se observaron líneas de precipitación correspondientes a otras clases de inmunoglobulinas (Figura 2).

Este resultado era de esperar ya que el material sembrado provenía de un pico de elución de una columna de DEAE - Sephadex A - 50, a una molaridad de 0,02 - pH 8, condiciones en que ú-

FIGURA 2



Immunolectroforesis en gel de agar de anticuerpos aglutinante (a), coaglutinante (b) de bovino anti Brucella abortus cepa 19 y gammaglobulina bovina normal (c). Como reactivo precipitante se empleó suero de conejo anti gammaglobulina bovina.

CUADRO IV

Muestra N°	Bovino I ₁	Bovino I ₂	Bovino I ₃
1	1/32	1/128	1/128
2	1/64	1/128	1/128
3	1/32	-	1/64
4	1/32	1/128	-
5	-	1/64	-
6	1/64	1/64	1/64
7	-	-	1/64
8	1/64	1/128	-
9	1/32	-	1/64
10	1/32	1/64	-
12	-	-	1/128
13	1/32	-	1/128
14	1/32	1/64	1/128
15	-	-	-
16	1/32	1/32	-
17	-	1/16	1/128
18	1/16	1/16	1/32

nicamente eluye la Ig G₁ bovina (50).

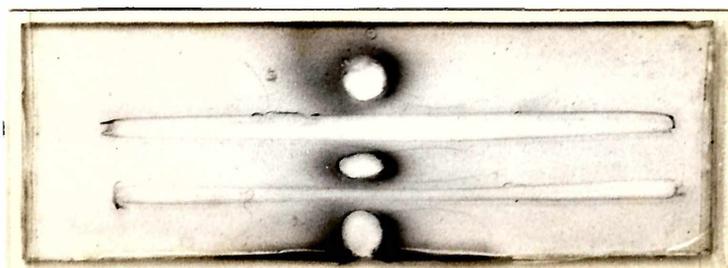
Capacidad de precipitación. Ambas preparaciones de anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes, fueron ensayadas frente a un homogeneizado total de Brucella abortus cepa 19 en una inmunodifusión radial. Los dos tipos de anticuerpos fracasaron en provocar una banda de precipitación. Sin embargo, cuando se emplearon los sueros a partir de los cuales esos anticuerpos habían sido — aislados, se obtuvieron bandas de precipitación con el mismo antigeno. Además, cuando los sueros fueron tratados con una suspensión de Brucella abortus cepa 19 a los fines de eliminar los anticuerpos dirigidos contra antígenos superficiales y luego corridos en una inmunoelectroforesis, y enfrentados con el homogeneizado, se logró una banda de precipitación que en cada caso correspondía a una Ig G₁ (Figura 3).

Se determinaron los títulos precipitantes de los sueros antes y después de las inmunoadsorciones que eliminaron todos los anticuerpos aglutinantes dirigidos hacia antígenos de superficie, no encontrándose diferencias significativas. Los resultados de — los títulos precipitantes de los sueros enteros se muestran en el Cuadro IV.

Capacidad de aglutinación. Con la población de anticuerpos aglutinantes se hizo una aglutinación seriada según el siguiente esquema:

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
µg Ac./0,2 ml	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,81	3,95	1,97	0,98
<u>Brucella abortus</u> cepa 19 (0,135%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

FIGURA 3



Immunolectroforesis en gel de agar de suero bovino anti Brucella abortus cepa 19, libre de anticuerpos aglutinantes — contra antígenos de superficie del microorganismo. Como reactivo-precipitante se empleó un homogeneizado de las bacterias.

Incubar 1 hora a 37° C.

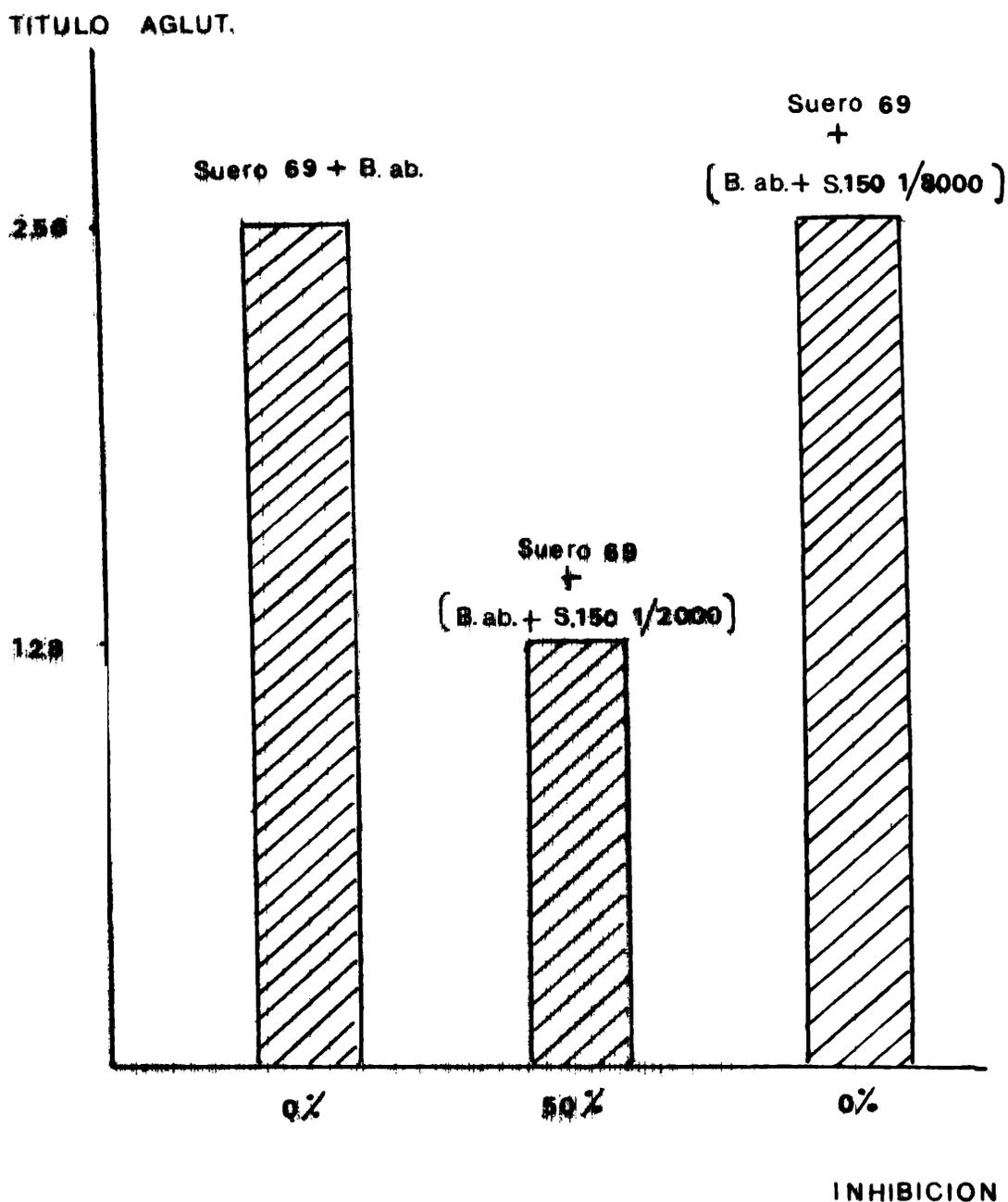
En las condiciones del ensayo los anticuerpos aglutinantes mostraron capacidad de aglutinar el antígeno hasta un límite de 1.97 μ g. No se observaron fenómenos atípicos de aglutinación.

Capacidad para dar reacción de Coombs. Suspensiones de bacterias puestas en contacto con diluciones subaglutinantes de suero bovino o de la fracción enriquecida en coaglutinantes obtenida en las inmunoadsorciones seriadas, fueron aglutinadas cuando se las enfrentó al suero de Coombs (suero de conejo anti gammaglobulinas bovinas), demostrando presencia de anticuerpos no aglutinantes fijados al antígeno.

Ensayo de bloqueo. Para determinar si los anticuerpos coaglutinantes y los aglutinantes compiten por los mismos determinantes antigénicos se llevó a cabo un ensayo de bloqueo o inhibición de la aglutinación.

En aquella serie de aglutinaciones llevadas a cabo con antígenos preincubados con diluciones subaglutinantes de un suero con alto título de anticuerpos determinados por pureba de Coombs con respecto a la aglutinación directa, se observó un descenso — del título aglutinante de un suero control (Coombs negativa) en relación a la serie donde el antígeno no fue preincubado con los sueros donde se investigaba la capacidad bloqueante (Figura 4).

FIGURA 4



Inhibición de la aglutinación por suero positivo a la prueba de Coombs, empleado en dosis subaglutinante.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Fijación del complemento. Los anticuerpos aglutinantes, localizados en la clase Ig G₁ se ensayaron en su capacidad fijadora del complemento; se utilizó una hemolisina titulada en 1.100 unidades Ac H₁₀₀/ml y como fuente de complemento se empleó suero de cobayo con un título de 90 unidades CH₁₀₀/ml. Los anticuerpos-aglutinantes activaron el sistema complemento con un requerimiento de 5 µg para consumir la dosis de complemento CH₁₀₀.

Ensayo de fagocitosis. Las curvas de velocidad de fagocitosis de Brucella abortus cepa 19 por el SRE del ratón en presencia de dosis aglutinantes de un suero con Coombs negativa y dosis subaglutinantes de un suero con alto título de anticuerpos coaglutinantes, pero equivalente en masa de anticuerpos, se muestran en la Figura 5.

Se emplearon los sueros de bovinos; normal, 072 y 150 - con títulos de aglutinación directa y por Coombs señalados a continuación:

072; título aglutinante 1/256

título por reacción de Coombs 1/256

150; título aglutinante 1/512

título por reacción de Coombs positiva hasta 1/4.096

El suero normal de bovino se empleó en la dilución 1/200. El suero 072 se empleó en una dilución de 1/200 (aglutinante).

El suero 150 se usó en diluciones de 1/500 correspondiente al límite de aglutinación directa y 1/1000, o sea en una dilución subaglutinante.

Los experimentos se efectuaron por duplicado. Los resultados se detallan en el Cuadro V.

Las actividades tabuladas son las actividades corregidas, restando del valor medido el dato de la actividad de fondo = 80 cpm.

Las actividades tabuladas a tiempo cero corresponden a bacterias solas, antes de inyectar los anticuerpos.

Las flechas indican el momento que los animales recibieron las dosis de anticuerpos.

Las curvas de fagocitosis obtenidas, muestran un marcado incremento de la depuración sanguínea de bacterias en los ratones inoculados con suero libre de anticuerpos coaglutinantes. En cambio, el suero con alto título de anticuerpos coaglutinantes — mostró un comportamiento diferente. Indudablemente fue ineficaz en el favorecimiento de la fagocitosis, aproximándose a la curva obtenida como suero normal libre de anticuerpos contra el antígeno (Figura 5).

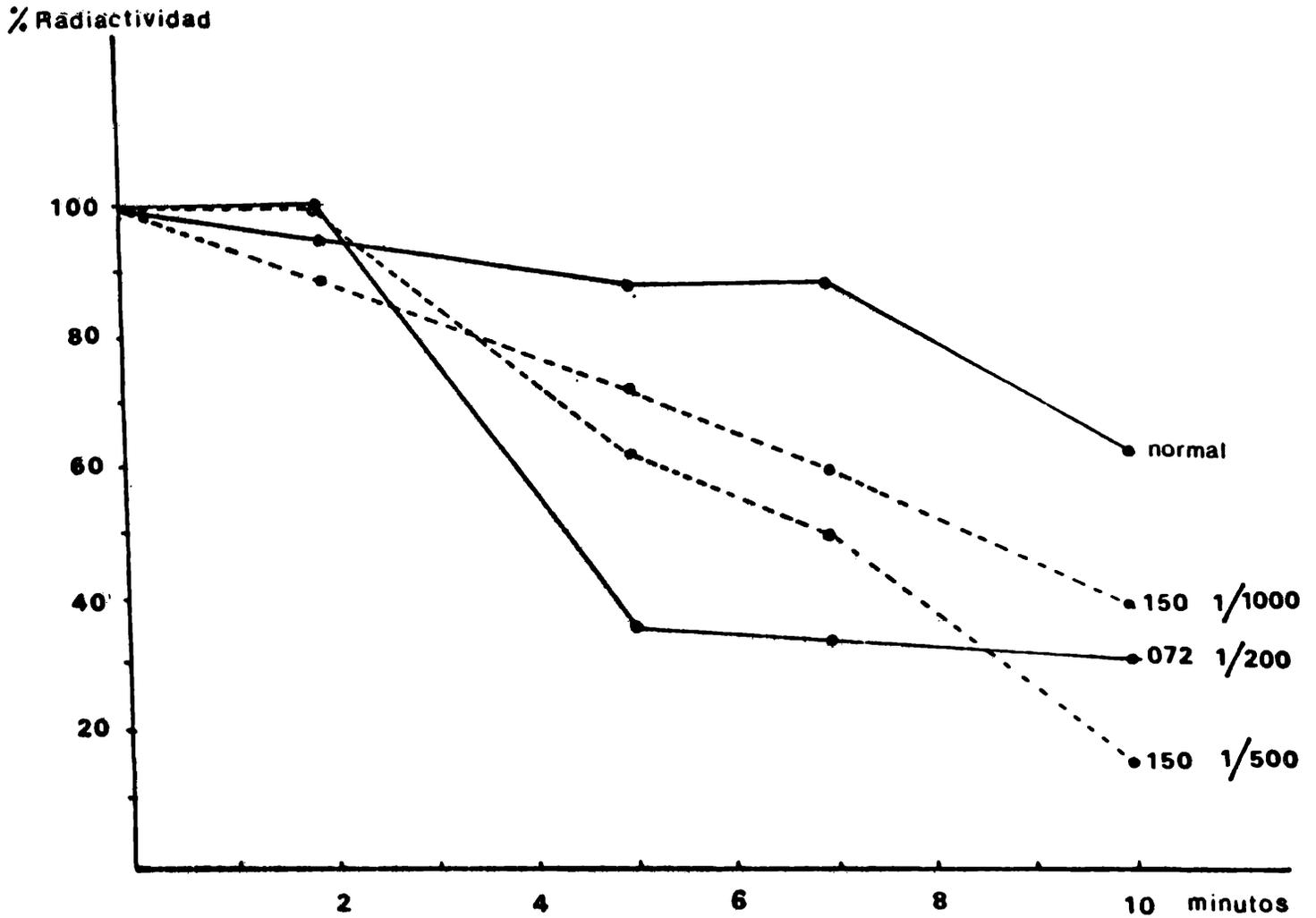
Trabajando con los logaritmos de las actividades porcentuales promedio obtenidas, se construyó la Figura 6 que permitió calcular los índices de fagocitosis K.

Ensayo de protección. Índice de Infección Esplénica. Pa

CUADRO V

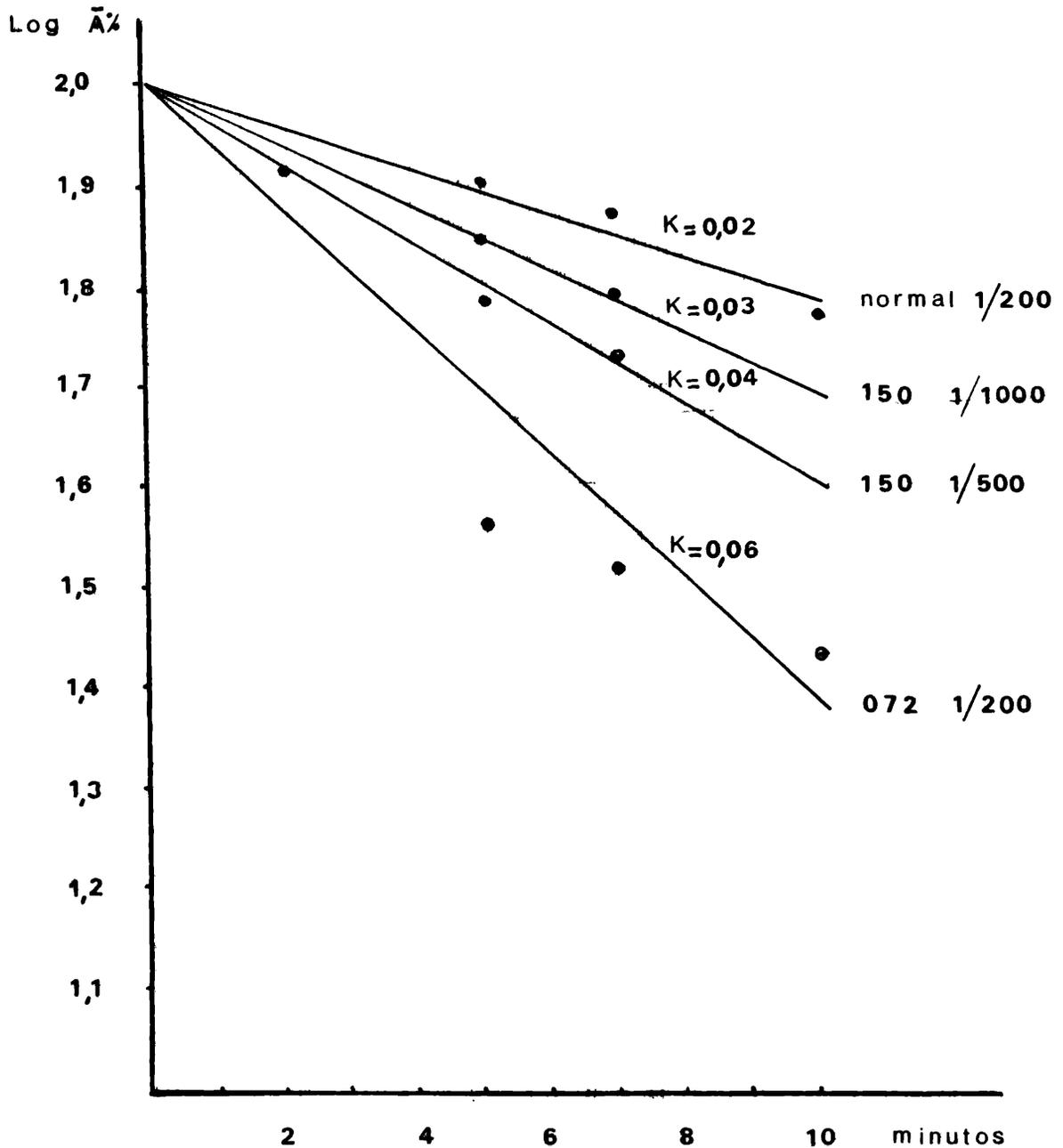
Suero-dilución	Tiempo (min.)	Actividad (cpm)		Actividad %		Promedio \bar{A} %	log. \bar{A} %
		Ratón 1	Ratón 2	Ratón 1	Ratón 2		
Normal 1/200	0	2234	2262	100	100	100	2
	2	1847	1733	82,7	76,6	79,6	1,90
	5	1968	1748	88,1	77,3	82,7	1,92
	7	1968	1441	88,1	63,7	75,9	1,88
	10	1360	1331	60,9	58,4	59,6	1,77
072 1/200	0	1783	2530	100	100	100	2
	2	1783	2277	100	90	95	1,98
	5	622	911	34,9	36	35,4	1,55
	7	592	794	33,2	31,4	32,3	1,51
	10	517	724	29,0	28,6	28,8	1,46
150 1/500	0	1622	1974	100	100	100	2
	2	1620	1857	99,9	94,1	97	1,99
	5	1005	1180	62,0	59,8	60,9	1,78
	7	821	1105	50,6	56,0	53,3	1,73
	10	234	655	14,4	33,2	23,8	1,38
150 1/1000	0	1741	2430	100	100	100	2
	2	1555	2092	89,3	86,1	87,7	1,94
	5	1262	1718	72,5	70,7	71,6	1,85
	7	1034	1536	59,4	63,2	61,3	1,79
	10	672	974	38,6	40,1	39,3	1,59

FIGURA 5



Curva de velocidad de fagocitosis de ^{131}I - Brucella abortus
capa 19 en presencia de anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes.

FIGURA 6



Determinación del Índice de Fagocitosis de ^{131}I - Brucella abortus en ratones inoculados con sueros de bovinos inmunizados y — normales.

ra estudiar la protección in vivo se tomó como parámetro la infección esplénica que ocurre como consecuencia de la penetración en el organismo de las brucelas.

Cada lote de ratones estaba formado por dos animales cuyos bazos fueron mezclados. Los experimentos se repitieron dos o tres veces con resultados semejantes.

El Cuadro VI muestra el número promedio de colonias por bazo. El Índice de Infección Esplénica (IIE) se calculó según:

$$\text{IIE} = \frac{\text{Número colonias ratón inmunizado}}{\text{Número colonias ratón normal}} \times 100$$

en animales sacrificados a los 7 días de haber recibido las dosis de bacterias y anticuerpos (Figura 7).

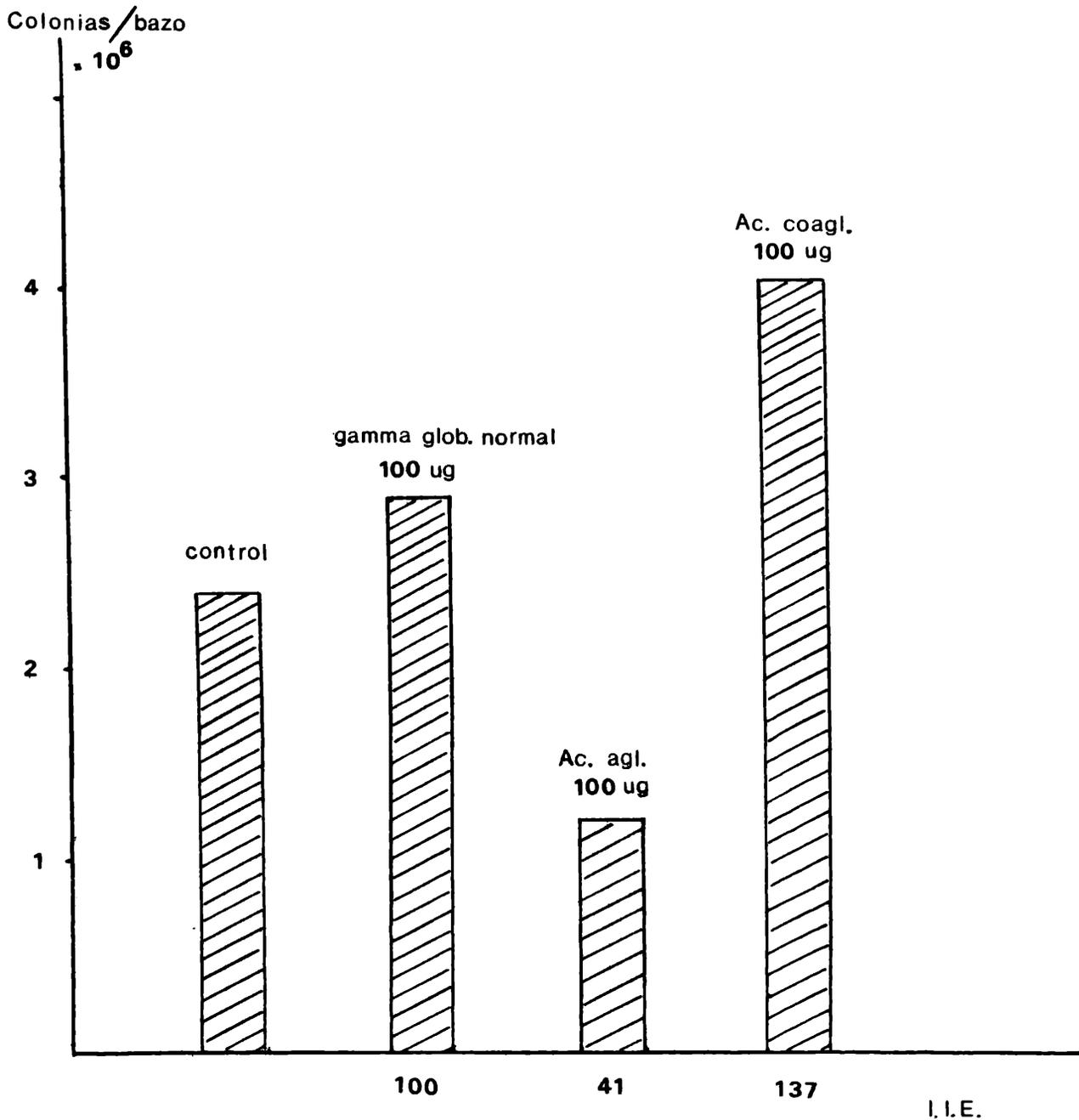
En otro experimento, distintos lotes de animales fueron sacrificados 1, 3 y 7 días después de la inoculación de bacterias y anticuerpos coaglutinantes. Los resultados se observan en el Cuadro VII.

Indudablemente, que los anticuerpos coaglutinantes facilitaron la multiplicación bacteriana en bazo y que no fue un simple fenómeno de fagocitosis, se demostró en el segundo experimento donde se vio que a las 24 horas el número de colonias en bazo de animales inoculados con coaglutinantes fue menor al de los controles inoculados con gamma globulina normal (Figura 8).

CUADRO VI

Lote Ratones Nº	<u>Brucella abortus</u> (0,1 ml)	μ S Ao. ooagl. (enriq.) (0,1 ml)	μ S gammaglob. normal (0,1 ml)	μ S Ao aglut. (0,1 ml)	Nº colonias/ba zo (7 días)	IIE
1	7×10^9	-	-	-	$2,4 \times 10^6$	7
2	7×10^9	25	-	-	$4,4 \times 10^6$	151,7
3	7×10^9	100	-	-	4×10^6	137,93
4	7×10^9	400	-	-	4×10^6	137,93
5	7×10^9	-	100	-	$2,9 \times 10^6$	100
6	7×10^9	-	-	100	$1,2 \times 10^6$	41,37

FIGURA 7

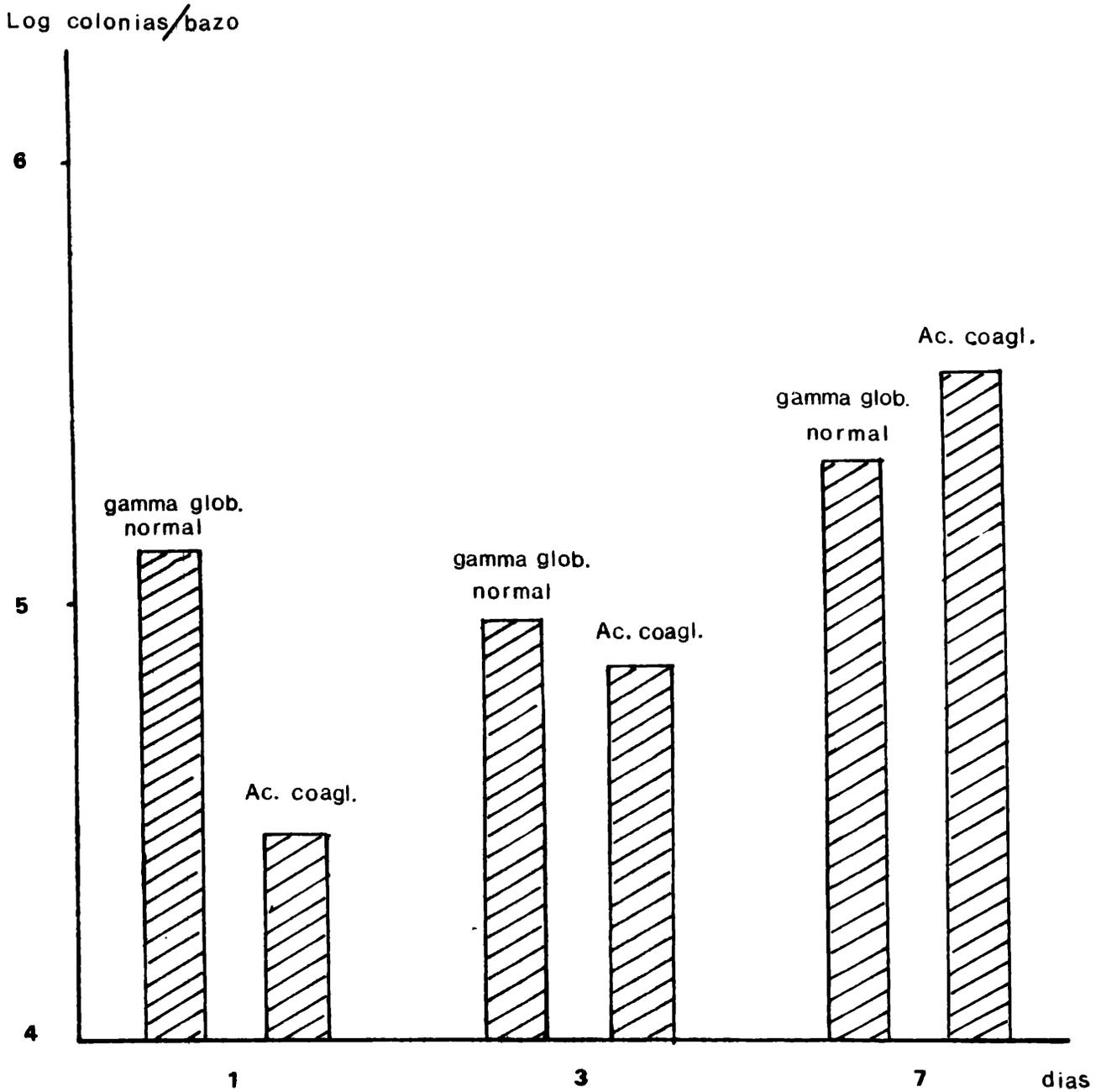


Ensayo de protección e Índice de Infección Esplénica (IIE) a Brucella abortus cepa 19, en ratones inculados con gammaglobulina bovina normal y anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes.

CUADRO VII

Lote Ratones Nº	<u>Brucella abortus</u> (0,1 ml)	μ g Ac. coagl. (enriq.) (0,1 ml)	μ g gammaglob. normal (0,1)	Nº colonias/ bazo	IIE	Días pos- inoculación
1	7×10^9	-	100	$0,12 \times 10^6$	100	1
2	7×10^9	100	-	$0,028 \times 10^6$	23	1
3	7×10^9	-	100	$0,092 \times 10^6$	100	3
4	7×10^9	100	-	$0,020 \times 10^6$	21,7	3
5	7×10^9	-	100	$0,21 \times 10^6$	100	7
6	7×10^9	100	-	$0,32 \times 10^6$	152	7

FIGURA 8



Ensayo de protección a Brucella abortus cepa I9 en ratones I, 3, y 7 días luego de recibir anticuerpos coaglutinantes o gammaglobulina normal,

EVOLUCION DE LA RESPUESTA EN FUNCION DEL TIEMPO

Los sueros de tres bovinos inoculados repetidamente con Brucella abortus cepa 19, fueron estudiados, individualmente, en cuanto a sus títulos aglutinantes directos (con y sin 2 - mercaptoetanol) y por reacción de Coombs.

Como puede observarse en los Cuadros VIII, IX y X, ya a las 2 semanas en todos los casos se tuvieron títulos de 1/512 - que se mantuvieron con ligeras oscilaciones durante todo el período experimental.

Los títulos aglutinantes con y sin 2 - mercaptoetanol - del bovino I₁ (Figura 9) son característicos ya que se trata de una ternera que no había sido vacunada con anterioridad con Brucella abortus cepa 19 y por tanto se indujo una respuesta a base de Ig M. Posteriormente fue aumentando la producción de Ig G hasta - casi constituirse en la única inmunoglobulina alrededor de las 10 semanas.

El bovino I₃ (Figura 10) dio al comienzo una respuesta en base a Ig M pero no tan alta y duradera como la del caso anterior.

El bovino I₂ (Figura 11) dio desde un principio una respuesta a base de Ig G únicamente. Este animal antes de comenzar con el plan de inoculación, presentaba un título aglutinante de 1/25, por lo cual no es de extrañar que se hubiera producido exclusivamente Ig G.

CUADRO VIII

(Bovino I₁)

Muestra N°	Fecha Obtención	Título Aglutinante Directo		Título Aglut. total (Coombs)
		Sin 2 - ME	Con 2 - ME	
1	15-IV-81	512	32	512
2	29-IV-81	512	64	512
3	15-V-81	512	128	512
4	29-V-81	512	256	1024
5	16-VI-81	256	256	256
6	30-VI-81	256	256	512
7	23-VII-81	256	256	512
8	7-VIII-81	256	256	512
9	27-VIII-81	512	512	1024
10	11-IX-81	1024	-	1024
11	25-IX-81	1024	-	1024
12	9-X-81	1024	-	1024
13	25-X-81	128	-	256
14	20-XI-81	256	-	512
15	23-XII-81	512	-	1024
16	17-II-82	256	-	1024
17	17-III-82	512	-	4096
18	7-VI-82	64	-	1024

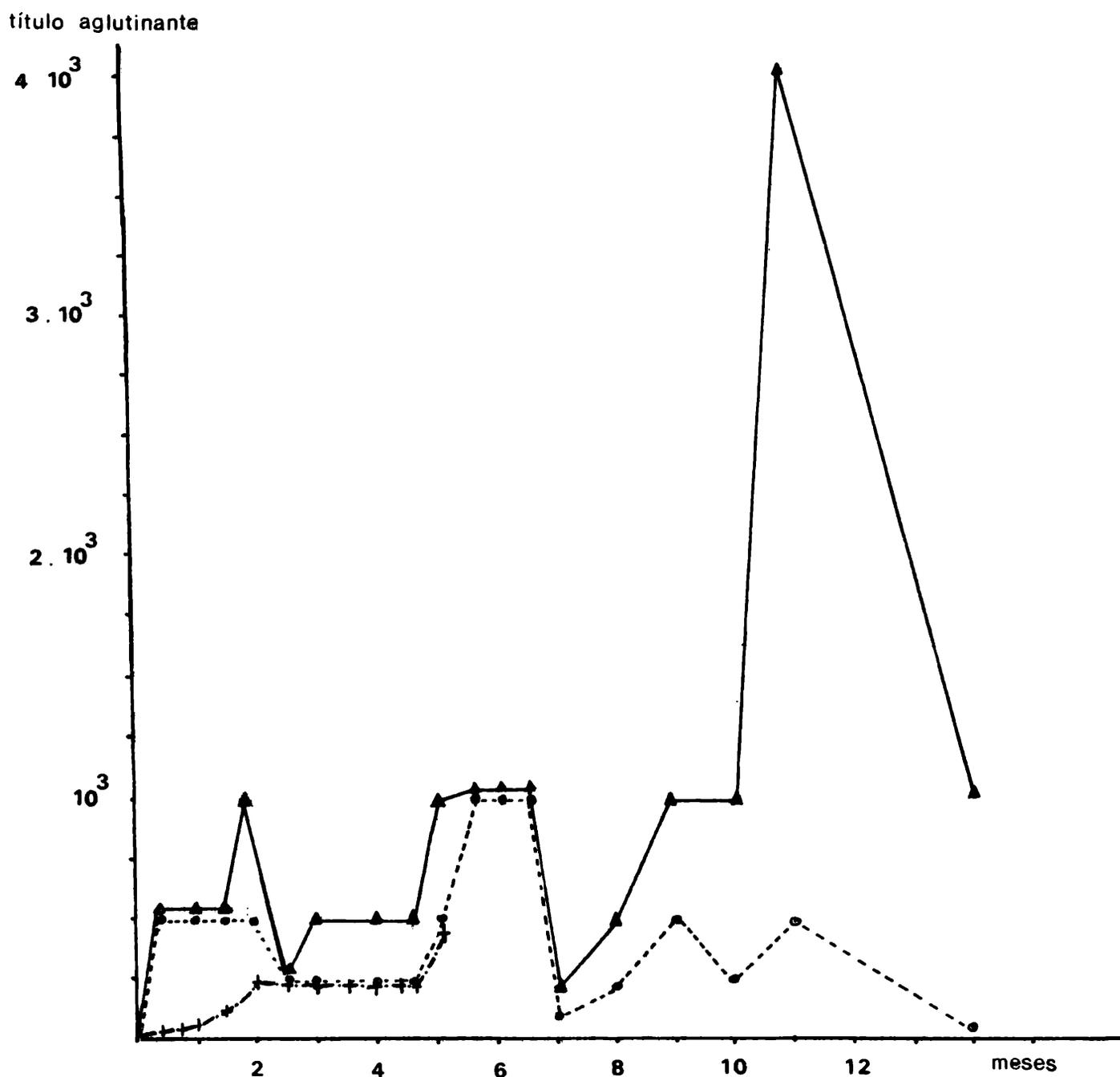
CUADRO IX
(Bovino I₂)

Muestra N°	Fecha Obtención	Título Aglutinante Directo		Título Aglut. total (Coombs)
		Sin 2 - ME	Con 2 - ME	
1	15-IV-81	512	512	512
2	29-IV-81	512	512	512
3	15-V-81	512	512	512
4	29-V-81	512	512	1024
5	16-VI-81	256	256	512
6	30-VI-81	512	256	1024
7	23-VII-81	256	256	512
8	7-VIII-81	512	512	1024
9	27-VIII-81	256	256	1024
10	11-IX-81	256	-	1024
11	25-IX-81	512	-	512
12	9-X-81	256	-	512
13	25-X-81	256	-	512
14	20-XI-81	256	-	512
15	23-XII-81	512	-	512
16	17-II-82	256	-	512
17	17-III-82	512	-	2048
18	7-VI-82	128	-	512

CUADRO X
(Bovino I₃)

Muestra N°	Fecha Obtención	Título Aglutinante Directo		Título Aglut. total (Coombs)
		Sin 2 - ME	Con 2 - ME	
1	15-IV-81	1024	512	1024
2	29-IV-81	512	256	512
3	15-V-81	256	256	256
4	29-V-81	256	256	256
5	16-VI-81	256	128	512
6	30-VI-81	256	128	512
7	23-VII-81	256	256	512
8	7-VIII-81	512	512	1024
9	27-VIII-81	512	512	1024
10	11-IX-81	1024	-	1024
11	25-IX-81	512	-	1024
12	9-X-81	512	-	1024
13	25-X-81	256	-	512
14	20-XI-81	256	-	512
15	23-XII-81	512	-	1024
16	17-II-82	256	-	1024
17	17-III-82	512	-	4096
18	7-VI-82	64	-	1024

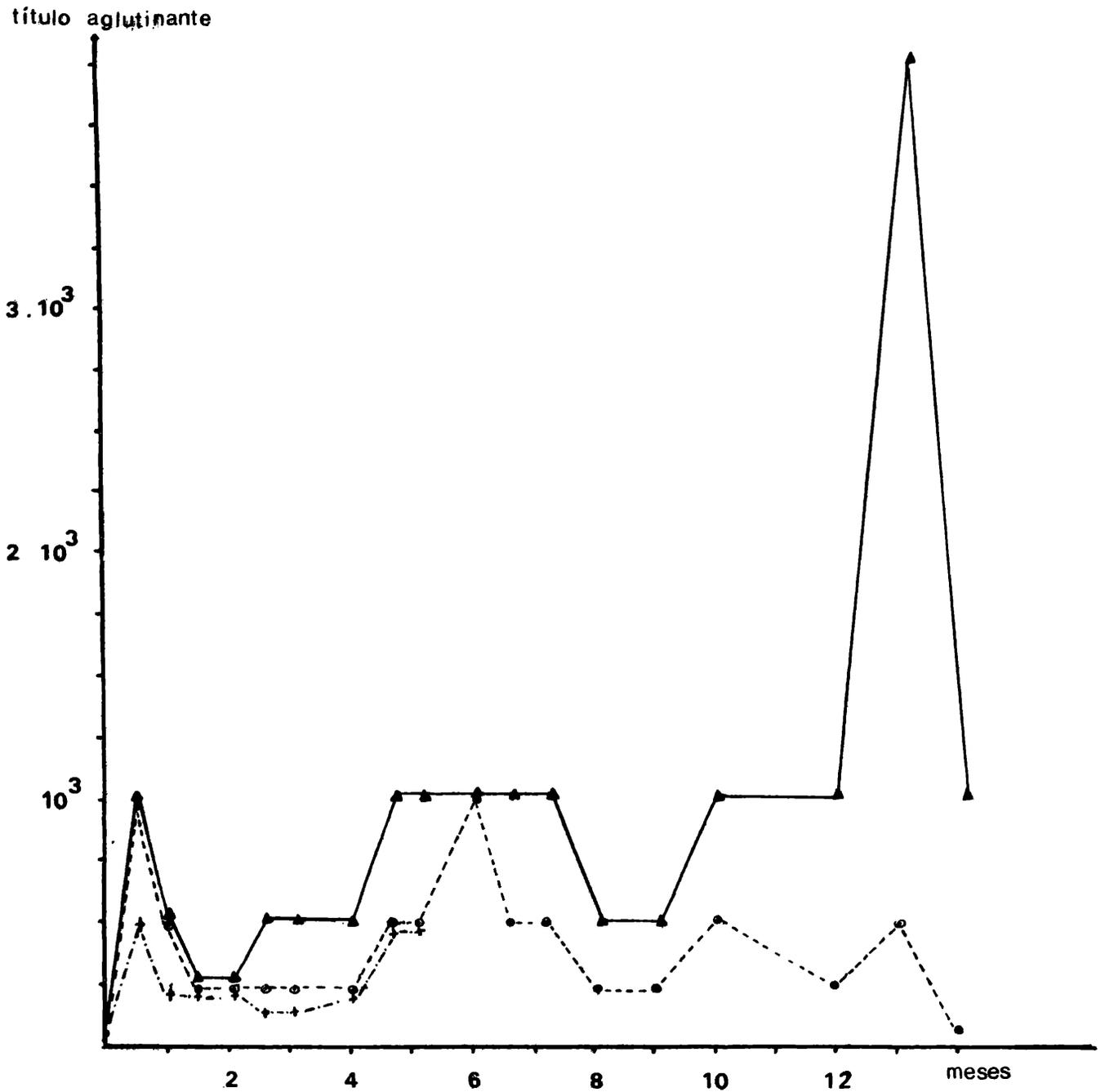
FIGURA 9



Evolución de los títulos de anticuerpos del bovino I₁ inoculado a repetición con Brucella Abortus oepa 19.

- Prueba de Coombs
- Aglut. directa sin 2 ME
- · - · - " " con 2 ME

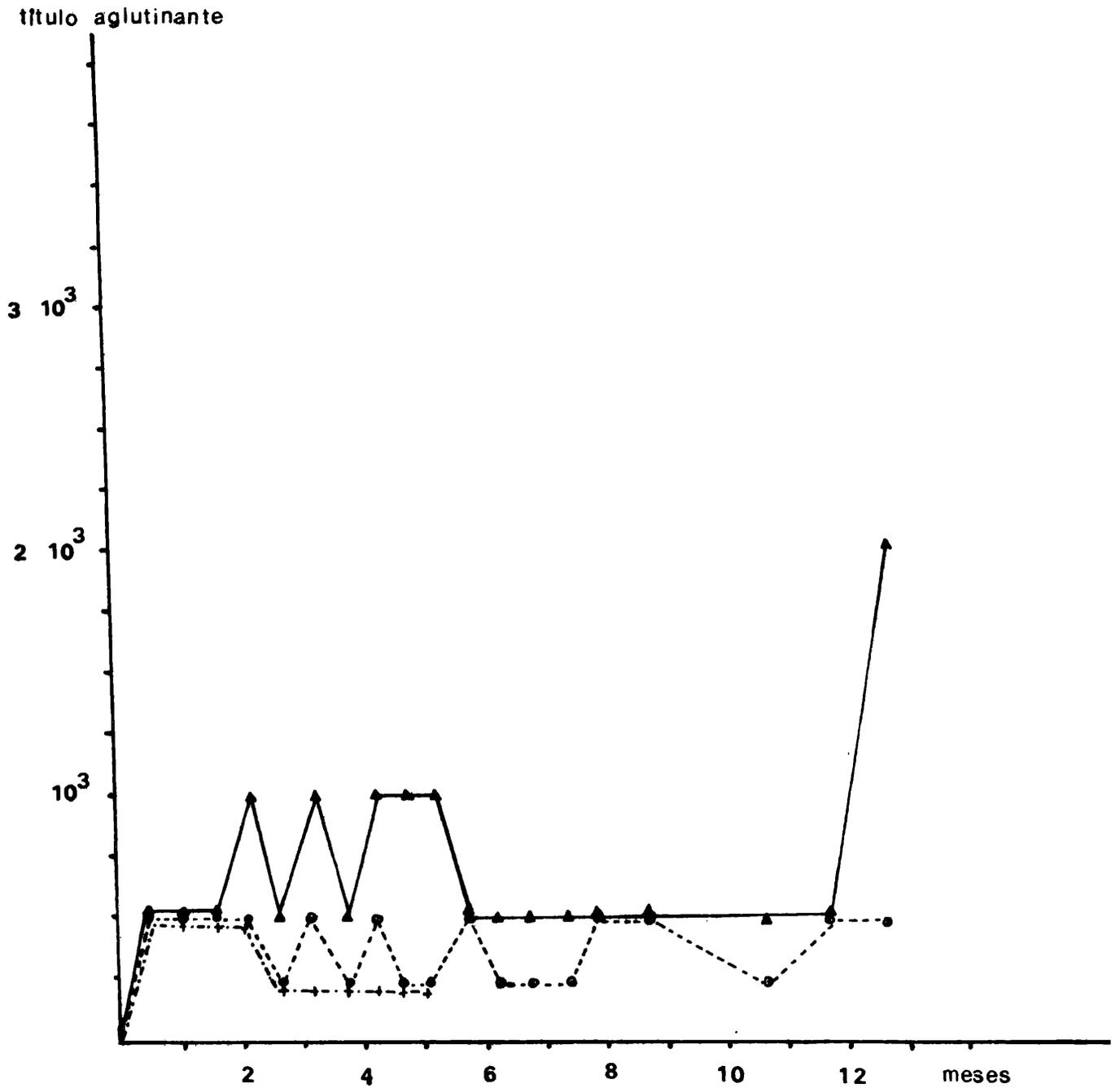
FIGURA 10



Evolución de los títulos de anticuerpos del bovino I₃ inoculado a repetición con Brucella abortus cepa 19.

- Prueba de Coombs
- - - - - Aglut. directa sin 2 ME
- · - · - " " con 2 ME

FIGURA 11



Evolución de los títulos de anticuerpos del bovino I₂ inoculado a repetición con Brucella abortus cepa 19.

- Prueba de Coombs
- Aglut. directa sin 2 ME
- · - · - " " con 2 ME

Con respecto a los títulos de anticuerpos coaglutinantes, detectados por reacción de Coombs, en los tres bovinos comenzaron a manifestarse a las 8 semanas, y se mantuvieron sin elevarse mayormente y con ligeras oscilaciones hasta las 44 semanas en que experimentaron una elevación que se mantuvo hasta el final — del plan de experimentación.

A los fines de averiguar si esa diferencia de título era consecuencia de una mayor sensibilidad de la reacción de Coombs respecto de la aglutinación directa, o si se trataba de anticuerpos de bloqueo funcionalmente univalentes, se analizó la capacidad de inhibición de algunos sueros en la forma ya indicada. Los resultados mostraron poder inhibitorio de los sueros con alto título de anticuerpos detectados por reacción de Coombs, lo que confirma la presencia de anticuerpos de bloqueo.

DISCUSION

Este trabajo se programó con la intención de estudiar - la responsabilidad, que los anticuerpos coaglutinantes (bloqueantes) podrían tener en el desarrollo de los mecanismos de cronicidad de la brucelosis bovina. Es por ello que el plan de inoculación de los animales en experimentación consistió de permanentes-estímulos a lo largo de todo un año, con el propósito de lograr una constante permanencia del antígeno en el huésped a semejanza - de lo que ocurre en infecciones crónicas naturales.

Los datos experimentales obtenidos indicaron que los anticuerpos de tipo Ig M, fueron producidos luego de las primeras - estimulaciones, pero descendieron rápidamente, siendo anticuerpos de la clase Ig G los que permanecieron durante todo el período que duró el plan de experimentación.

Con el propósito de determinar si existían anticuerpos-

coaglutinantes específicos (bloqueantes) se empleó la prueba de Coombs.

El título por Coombs, si bien al comienzo fue negativo, y luego se mantuvo en niveles moderados, definió picos elevados con amplias diferencias en relación al de anticuerpos aglutinantes, sobre el final del plan de inoculaciones.

Tales diferencias de títulos se debieron a la presencia de anticuerpos coaglutinantes y no a un aumento de sensibilidad provocado por la reacción de Coombs, como se prueba mediante ensayo de bloqueo o inhibición de la aglutinación.

El método de Heidelberger y Kendall descrito para separación de anticuerpos coprecipitantes y precipitantes fue aplicado a la separación de los anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes existentes en estos sueros. La preparación obtenida de anticuerpos aglutinantes estuvo libre de anticuerpos coaglutinantes, sin embargo la de anticuerpos coaglutinantes resultó impurificada con aglutinantes, si bien se logró un importante enriquecimiento.

Para determinar en qué clase de inmunoglobulina estaba la actividad anticuerpo de estas fracciones, se pasaron por separado los materiales obtenidos en las inmunoadsorciones seriadas, a través de una columna de DEAE - Sephadex A - 50, eluyendo en ambos casos un único pico a la molaridad de 0,02 M, lo que es característico de la Ig G₁ bovina. No se detectaron otros tipos de inmunoglobulinas con especificidad para el antígeno utilizado.

Mediante inmunolectroforesis ambos tipos de anticuer-

pos originaron una banda con características de Ig G₁ frente a un suero de conejo anti gammaglobulina bovina.

Cuando estas poblaciones se estudiaron mediante inmunodifusión radial frente a un suero de conejo anti gammaglobulina bovina se halló una total identidad entre las bandas formadas por los anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes, lo cual demuestra que no existen diferencias antigénicas en ellos.

Cuando estos anticuerpos se enfrentaron a un homogeneizado de bacterias fracasaron en producir precipitación. Esto era de esperar en los anticuerpos coaglutinantes pero nos sorprendió en los aglutinantes. Realizados algunos ensayos con el fin de poner luz a este respecto, hallamos que sueros inmunes producían precipitación con el homogeneizado. Esto nos dice que los anticuerpos purificados mediante inmunoadsorciones con bacterias enteras solo guardan especificidad para antígenos superficiales de Brucella abortus y que estas fracciones antigénicas superficiales no estarían presentes en el sobrenadante resultante de homogeneizar los microorganismos. Tampoco podemos descartar la posibilidad que esos antígenos superficiales estuvieran en pequeñas cantidades en nuestras preparaciones o bien que en estado soluble no pudieran inducir la formación de precipitado por su naturaleza bioquímica (44).

Trabajando con el mismo homogeneizado y sueros inmunes se consiguieron bandas de precipitación mediante inmunoelectroforesis que correspondían a la clase de Ig G₁. Estos anticuerpos, -

dirigidos hacia antígenos no expuestos en la bacteria entera, fueron excluidos en las inmunoadsorciones, lo que explica, que la población purificada de anticuerpos aglutinantes fracasara en la formación de una banda de precipitación.

Estos resultados nos están indicando además, que las bacterias inoculadas fueron precesadas en el huésped, exponiendo al sistema inmunológico antígenos internos, de manera tal que el título de estos anticuerpos nos permitirían medir la eficiencia de los mecanismos que conducen a la lisis del microorganismo, y tal vez este aspecto merecería una consideración futura.

Los ensayos de depuración sanguínea de Brucella abortus
131 I en ratones que recibieron diluciones aglutinantes y no aglutinantes, pero con Coombs positiva de los sueros obtenidos, mostraron resultados que ponen en evidencia la incapacidad de los anticuerpos coaglutinantes para formar agregados con el antígeno que conduzcan a un aumento de la velocidad de la fagocitosis. (K = 0,03). En cambio los anticuerpos aglutinantes se comportaron favoreciendo la depuración sanguínea como puede verse en su índice de fagocitosis correspondiente a un valor de 0,06.

Si tenemos en cuenta que estos dos tipos de anticuerpos se hallaron simultáneamente en sueros de los animales en experimentación y que ambos compiten por el antígeno, la capacidad de fagocitosis dependerá de la relación molar entre ambos, ya que como determinaron otros autores la constante de afinidad es semejante.

Cuando se probó la capacidad de protección de los anticuerpos aislados, en ratones que recibieron bacterias vivas, los anticuerpos aglutinantes contribuyeron a la protección del animal disminuyendo el número de bacterias presentes en el bazo al cabo de siete días en relación a los controles que no recibieron anticuerpos. Por el contrario los coaglutinantes además de no ejercer efecto protector, se comportaron como facilitadores de la multiplicación bacteriana en iguales condiciones.

Hemos descartado que este suceso se debiera a un incremento de la captación de bacterias por el bazo, puesto que los plaques de bazo a tiempos más cortos (24 y 72 horas) mostraron que el número de colonias recuperadas en los animales inoculados con los coaglutinantes era igual o inferior al de los controles.

Este comportamiento fue corroborado con anticuerpos coaglutinantes, que también correspondían a la clase Ig G₁, aislados de un toro que padecía de brucelosis desde hacía varios años.

Los resultados obtenidos por nosotros concuerdan con lo observado en trabajos previos en otras especies y empleando antígenos particulados distintos de Brucella abortus (42), como también con los experimentos realizados por Forget y Borduas en pollos hiperestimulados con Brucella abortus cepa 19, aunque estos autores no trabajaron con anticuerpos purificados (23).

CONCLUSIONES

Bovinos hiperestimulados con Brucella abortus cepa 19 e laboraron anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes (bloqueantes) pertenecientes ambos a la clase Ig G₁.

Los anticuerpos coaglutinantes no aglutinan las bruce— las, a pesar de estar firmemente unidas a ellas como le demuestra la Prueba de Coombs, comportándose como "funcionalmente univalentes" y a su vez bloquean la aglutinación cuando se incuban con el antígeno antes de la adición de los anticuerpos aglutinantes.

Se muestran incapaces de favorecer la depuración sangui— nea de brucelas en ratones inoculados y facilitan la multiplica— ción bacteriana en bazo.

Estos hechos demuestran que los anticuerpos coaglutinan— tes, o los sueros con franco predominio de ellos, son incapaces — de favorecer la eliminación y/o daño del antígeno, y considerando que compiten con los anticuerpos aglutinantes por las brucelas — producirían en definitiva un aumento de la permanencia del antige— no en el huésped.

Teniendo en cuenta este particular comportamiento bioló— gico, su aumento en el curso de las inmunizaciones y el hecho de— que hayan sido detectados en distintas enfermedades bacterianas y parasitarias crónicas, nos permite otorgarles un significativo — grado de responsabilidad en la inducción y/o mantenimiento de la— cronicidad en la brucelosis bovina.

RESUMEN

Un lote de bovinos de raza Hereford fueron inoculados a repetición con Brucella abortus cepa 19 durante un período de doce meses. Elaboraron anticuerpos correspondientes a la clase Ig M e Ig G, siendo los últimos los que predominaron y persistieron — hasta el final del experimento.

Los anticuerpos de la clase Ig G correspondieron a dos poblaciones de anticuerpos diferentes: aglutinantes y no aglutinantes o bloqueantes, éstos detectados por reacción de Coombs. Ambos tipos de anticuerpos fueron separados mediante inmunoadsorciones seriadas y purificados por cromatografía de intercambio iónico. Se los caracterizó como pertenecientes a la clase Ig G₁, siendo estudiadas sus propiedades inmunoquímicas y biológicas.

Los anticuerpos aglutinantes fueron capaces de aglutinar al antígeno, fijar complemento y facilitar la depuración sanguínea de Brucella abortus cepa 19 marcada con ¹³¹I en ratones e inhibieron la multiplicación de Brucella abortus en el bazo de ratones inoculados con estas bacterias.

Por el contrario los anticuerpos coaglutinantes, fueron incapaces de facilitar la depuración sanguínea de bacterias y facilitaron su multiplicación en bazo.

A la luz de estos resultados postulamos la hipótesis de que estos anticuerpos intervendrían en el facilitamiento de la — permanencia — multiplicación de las brucelas en el huésped, sien-

do éste, uno de los mecanismos responsables de la iniciación y/o mantenimiento de la cronicidad en la brucelosis bovina.

SUMMARY

Study of biological properties of agglutinating and non-agglutinating antibodies produced in bovine brucellosis.

Heredford cattle were repeatedly inoculated with *Brucella abortus* strain 19 for twelve months.

Antibodies elaborated belonging to classes Ig M and Ig G, the latter being the ones that predominated and persisted till the end of the experiment.

Ig G antibodies were related to two different types of antibodies: agglutinating and non-agglutinating, the latter being detected by Coombs' tests. Both, agglutinating and non-agglutinating antibodies, were specifically purified by immunoadsorption and latter purified by ionic exchange chromatography. They were characterized as Ig G₁, and its immunochemical and biological properties were studied.

Agglutinating antibodies were able to agglutinate the antigen, fix the complement and increased blood clearance of *Brucella abortus* strain 19 marked with ¹³¹I in mice and inhibited the multiplication of *Brucella* in mice spleen inoculated with these bacteria.

On the other hand, the co-agglutinating antibodies unable to facilitate the bacterial blood clearance and enhanced its multiplication in spleen.

Owing to these results we postulate that these antibodies would facilitate the permanence and multiplication of bacteria in the guest. This mechanism would be responsible for the beginning and maintainans of chronic cattle Brucellosis.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- KANEENE J.M., JOHNSON D.W., ANDERSON R.K. Specific lymphocyte stimulation in cattle naturally infected with strain of B. — abortus, and cattle vaccinated with B. abortus C 19. Am. J. — Vet. Res. 39 : 585 - 589 (1978).
- 2.- KANEENE J.M., ANDERSON R.K., MUSCOPLAT Ch. C. and JOHNSON D.— Cell - Mediated Immune Responses in Cattle Vaccinated With — Brucella abortus Strain 19 Vaccine and Nonexposed Control — Animals of the Same Age. Am. J. Vet. Res. Vol. 40 N° 7, pages 999 - 1004 (1979).
- 3.- KANEENE J.M., NICOLETTI P., ANDERSON R.K., MUSCOPLAT Ch. C. — and JOHNSON D.W. Cell - Mediated Immune Responses in Cattle — Adult Vaccinated with Brucella abortus Strain 19 and in Cattle Infected with Brucella abortus Field Strain. Am J. Vet. — Res. Vol. 40 N° 11, Pages 1503 -1509 (1979).
- 4.- BRAUDE A.I. Studies in the Pathology and Pathogenesis of Experimental Brucellosis. I. A comparison of the Pathogenicity of B. abortus, B. melitensis, and B. suis for guinea-pigs. — J. Inf. Dis. 89 , 76-86 (1951).
- 5.- SUTER E. Interaction between phagocytes and pathogenic micro— organisms. Bact. Rev. 20, 94-132 (1956).
- 6.- MACKANESS G. B. The Immunological Basis of Acquired Cellular— resistance. J. Exp. Med. 120, 105-120 (1964).

- 7.- MACKANESS G.B. Resistance to Intracellular Infection. J. Infect. Dis. 123, 439-445. (1971).
- 8.- HOLLAND J.J. and PICKETT, M.J. A cellular Basis of Immunity - in Experimental Brucella Infection. J. Exp. Med. 108, 343-360 (1958)
- 9.- SULITZEANU D. Mechanism of Immunity against Brucella. Nature-Lond. 205, 1086-1088. (1965)
- 10.- CUNNINGHAM B. Protective Effects of Colostral Antibodies to Brucella abortus on Strain 19 Vaccination and Field Infection. Vet. Rec. 101, 521-524. (1977 a).
- 11.- BASCOUL S., CANNAT A., HUGUET M.F. and SERRE A. Studies on - the Immune protection to murine Experimental Brucellosis - Conferred by Brucella Fractions. I Positive Role of Immune - Serum. Immunology 35, 213-221. (1978)
- 12.- FAO/WHO. Comité de Expertos en Brucelosis. V informe; WHO in forme técnico N° 464, Ginebra, (1971).
- 13.- BEH K.J. Quantitative distribution of Brucella Antibody - amongst Immunoglobulin Classes in Vaccinated and Infected - Cattle. Res. Vet. Sci. 17, 1-4 (1974).
- 14.- BEH K.J. Distribution of Brucella antibody among Immunoglobulin classes and a low molec. Weight Antibody Fraction in - Serum and Whey of Cattle. Res. Vet. Sci. 14, 381-384 (1973).

- 15.- PATTERSON J.M., DEYOE B.L. and STONE S.S. Identification of immunoglobulins associated with complement fixation, agglutination and low pH buffered antigen tests for brucellosis. Am. J. Vet. Res. 37, 319-324 (1976).
- 16.- RAMACCIOTTI Félix. Brucellosis. Etiología/Epidemiología/ Bos—quejo clínico/ diagnóstico/ terapéutica/ Profilaxis. 3° Edición. Ediciones Olocco. 1976. Córdoba. 75-130.
- 17.- COOMBS R.R.A., MOURANT A.E. and RANCE R.R. A new test for — the detection of weak and "incomplete" RH agglutinins. Br.— J. exp. Path 26, 255-266 (1945).
- 18.- GRIFFITHS J.J. Demonstration of agglutinin and an aggluti— nin "blocking" property in sera of known cases of brucello— sis. J. Bact. 54, 269 (1947).
- 19.- CUNNINGHAM B. The Coombs test for brucellosis in cattle. Vet Rec. 80, 527-528 (1967).
- 20.- BEH K.J. and LASCELLES A.K. The use of the antiglobulin test in the diagnosis of bovine brucellosis. Res. Vet. Sci. 14, - 239-244 (1973).
- 21.- CUNNINGHAM B. The control and eradication of brucellosis. Serological response in cattle following vaccination with S 19 and killed Brucella 45/20 adjuvant vaccine. Vet. Rec. 82, 7-11 (1968).

- 22.- CUNNINGHAM B. and O'REILLY D.J. Brucella abortus vaccines. - Agglutination responses in blood serum and milk following -- vaccination of cattle of various ages with live S 19 and killed 45/20 adjuvant Brucella abortus vaccines. Vet. Rec. 82, - 678-680, 689 (1968).
- 23.- FORGET A. and BORDUAS A.G. An Immunobiological enhancement -- phenomenon in experimental brucella infections on the chicks Int. Archs. Allergy, 53 : 190 (1977).
- 24.- McCUTCHAN D., KATSENSTEIN D., NORQUIST D., CHIKAMI G., WUNDERLICH A. and BRAUDE A. Role of blocking antibody in disseminated gonococcal infection J. Immunol., 121 : 1884 (1978).
- 25.- HAJOS S., CARBONETTO G., MARGNI R.A., ESTEVA M. and SEGURA E Purification and properties of anti T. Cruzi antibodies isolated from patients with chronic Chagas disease. Immunology - Letters, 4 (4) 199 (1982).
- 26.- MARGNI R. A. Comunicación personal.
- 27.- ALTON G.G., JONES L.M. and PIETZ D.E. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. Segunda Edición. OMS. Ginebra. 1976.
- 28.- DUNCAN J.R., WILKIE B.N., HIESTAND F. and WINTER A.J. The -- serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation. J. Immunology. Vol. 108 N° 4, 965-976 (1972).

- 29.- SCHEIDEGGER J.J. Une micro-methode de l'immuno-electrophorese-
Intern. Arch. Allergy, 7: 103 (1955).
- 30.- THOMAS K. and Mc CAUSLAND I.P. The use of Immunochemically -
purified anti-Brucella antibody in a Direct Fluorescent anti-
body test for Brucella abortus. Veterinary Immunology and -
Immunopathology. 1: 343-352 (1980).
- 31.- STONE S.S., PATTERSON J.M. and PHILLIPS M., Isolation and -
Purification of bovine Ig M by dissociating Immunoglobulin -
Brucella complexes. J. of Immunological Methods, 31: 379-387
(1979).
- 32.- HEIDELBERGER M. and KENDALL F.E. A quantitative theory of -
the precipitin reaction. III: The reaction between crystalli-
ne egg ovalbumin and its homologous antibody. J. Exp. Med.,
62: 697: (1935).
- 33.- MARGNI R.A. and BINAGHI R. Purification and properties of -
non-precipitating rabbit antibodies. Immunology, 22: 557 -
(1972).
- 34.- HEIDELBERGER M. and KENDALL F.E. A quantitative theory of -
the precipitin reaction. II: A study of an azoprotein anti-
body system. J. exp. Med., 62: 467 (1935 a).
- 35.- MARRACK J.R., The chemistry of antigens and antibodies. H.M.
Stationery Office, London (1934).

- 36.- FISET L.G. Non-precipitating rabbit antibodies: a study of - their reactivity in vitro by means of the quantitative precipitin and tannic acid haemagglutination techniques. Immunology, 5: 580 (1962).
- 37.- MARGNI R.A. and HAJOS S., Biological and physicochemical properties of purified anti- DNP guinea pig non precipitating - antibodies. Immunol., 24: 435 (1973 a).
- 38.- MARGNI R.A., CORDAL M.E. y col., Non precipitating antibodies isolated by immunoadsorption. Immunochem. 14: 299 (1977).
- 39.- CORDAL M.E. and MARGNI R.A., Isolation, purification and biological properties of horse precipitating and non precipitating antibodies. Immunochem., 11: 765 (1974).
- 40.- MARGNI R.A., PERDIGON G. and col. Immunobiological behaviour of rabbit precipitating and non-precipitating (co-precipitating) antibodies. Immunol., 41: 681 (1980).
- 41.- PARMA A.E., CERONE S., ERPELDING A. and MARGNI R.A., La respuesta inmune en conejos inoc. con Salmonella typhimurium .- Rev. Arg. Microbiología. Vol. 12 N° 3 (1980).
- 42.- MARGNI R.A., PARMA A.E., CERONE S.I., ERPELDING A. and PERDIGON G., Agglutinin and non-agglutinating antibodies in rabbits inoculated with a particulated antigen (Salmonella typhimurium). Immunology (en prensa).

- 43.- OUCHTERLOONY O., Diffusion in gel. Methods for immunological-analyses. Progr. Allergy, 5: 1 (1958).
- 44.- DIAZ R., GARATEA P. and JONES L.M., Radial immunodiffusion - test with a Brucella Polysaccharide antigen for differentiating infected from vaccinated cattle. J. of Clinical Microbiology. Vol. 10 N° 1, 37-41 (1979).
- 45.- MARGNI R.A. Inmunología e Inmunología. Fundamentos. Segunda edición. Editorial Médica Panamericana. 1977. Buenos Aires.
- 46.- Mc FARLANE A.S., Efficient trace labelling of proteins with iodine. Nature, London, 182: 53 (1958).
- 47.- TOLONE G., DEL GUERCIO P., GINAGHI R. and BIOZZI G. Kinetics of phagocytosis of bacterias opsonized with natural or immune antibodies. International Arch. of Allergy and Applied Immunology, 37: 344 (1970).
- 48.- BENACERRAF B., SEBESTYEN M.M. and SCHLOSSMAN S.A., A quantitative study of the kinetics of blood clearance of P³² labelled Escherichia coli and Staphylococci by the RES. J. Exp.-Med., 100: 27 (1959).
- 49.- UGALDE R., BIGLIOCCO A.M., Especificidad de las opsoninas — producidas por vacunación antibrucélica. Rev. Militar de Vet vol. 25, N° 118: 375-382. (1978)

- 50.- RICE Ch., BOYES B. Serum Immunoglobulins in bovine Brucellosis. New Zealand Vet. J., 19, 146-154 (1971).
- 51.- PERDIGON G. , GENTILE T. , ABATANGELO C. y MARGNI R. A. Actividad citotóxica anticuerpo dependiente mediada por anticuerpos precipitantes y coprecipitantes de conejo , cobayo y oveja. MEDICINA (Buenos Aires) 39 : 718 † 1979).

REGLAMENTO DE TESIS

ARTICULO 11°).- La Facultad no se hace solidaria de las opiniones
vertidas en una tesis.

