

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

LA RESPUESTA INMUNE EN BOVINOS INFECTADOS

CON TRITRICHOMONAS FOETUS

(TESIS para optar al grado de DOCTOR en CIENCIAS VETERINARIAS)

PEDRO SOTO

(1985)

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD

NACIONAL DE LA PLATA

RECTOR:

Ing. Qco. RAUL ADOLFO PESSACQ

SECRETARIO GENERAL:

Ing. Qco. PABLO OSCAR LUCHESSI

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Abogado CARLOS ALBERTO RAIMUNDI

SECRETARIO DE ASUNTOS LEGALES:

Dr. HUGO JORGE PACHECO

SECRETARIO DE ASUNTOS ECONOMICOS-FINANCIEROS:

Cont. ALDO HUGO ROSSI

SECRETARIA DE EXTENSION CULTURAL Y DIFUSION:

Prof. MARIA CONCEPCION ORRUMA

GUARDA SELLOS:

Ing. ANDRES RINGUELET

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

DECANO NORMALIZADOR:

Méd. Vet. ALBERTO R. DIBBERN

VICEDECANO:

Méd. Vet. HORACIO NORBERTO GARCIA VALENTI

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Méd. Vet. ESTEBAN URANGA

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA:

Sr. OMAR HUGO RAMIREZ

DIRECTORA DE ENSEÑANZA:

Sra. HAYDEE C. R. DE PERETTO

DIRECTORA DE BIBLIOTECA:

Srita. MARTA BERNARDI

DIRECTOR ECONOMICO-FINANCIERO:

Sr. HECTOR S. MOREIRA

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE POR CATEGORIAS

PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA"

ANGULO, Eusebia	Investigadora	Titular
CARROZZA, Jesús S. W.	Int. a la Biofísica	Titular
GALLO, Guillermo G.	Clín. Grand. Animales	Titular
MARTIN, Alcides A.	Anat. y Fisio. Patológ.	Titular
MENENDEZ, Néstor A.	Patol. Aves y Pilíf.	Interino
PRACCA, Lydia C.	Clín. Pequeños Animales	Titular
QUINTEROS, Indalecio R.	Genética y Biometría	Titular
ZACCARDI, Eduardo M.	Fisiología	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiol. Especial	Titular
ALBERDI, Cecilio	Tecnol. y Sanid. Alim.	Titular
ANDREATTA, Jorge N.	Semiología y Proped.	Titular
BERTOLINI, José M.	Anatomía Comparada	Interino
DELPRATO, Ismael O.	Anat. Descrip. y Top.	EMERITO-c/l.
GIMENO, Emilio J.	Higiene E. y S. Pública	Titular
JENSEN, Alicia D.	Bioestadística	Titular
LED, Jorge E.	Parasit. y Enferm. Par.	Interino-c/l.
MAROTTA, Eduardo G.	Zootec. Espec. I Pte.(OSC)	Titular
MAROTTA, Eduardo G.	Director Inst. S. Catalina	Interino
OTTINO, Julio F.	Histología y Embriolog.	Interino
PENNIMPEDE, Enrique F. F.	Inmunolog. Gral. y Aplic.	Titular
PIOVANO, Nicolás M.	Int. a la Bioquímica	Titular
RODRIGUEZ, Benjamín R.	Zootec. Espec. II Pte.(bye)	Titular
SCIAMMARELLA, Alfredo M.	Medicina Operatoria	Interino

PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiolog. Aplicada	Titular
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos I	Interino
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos II	Titular
BOCCIA, Francisco O.	Patolog. Quirúrg. y Pod.	Interino
CARROZZA, Jesús S. W.	Física y Químico. Aplic.	Interino
de ANTONI, Graciela L.	Genética Microbiana	Titular
ISEAS, Fortunato B.	Patología Médica	Interino
MARTIN, Alcides A.	Patología General	Titular
MARTINO, Olindo A. L.	Salud Pública	Titular
OSTROWSKI, Jorge E. B.	Reproducción Animal	Titular
PANZONI, Erico E.	Economía Agraria	Titular
PENNIMPEDE, Enrique F. F.	Inmunología I P.	Interino
PEROTTI, Rodolfo M.	Zotec. Espec. III Pte (ayp)	EMERITO
RODRIGUEZ, Benjamín R.	Zotec. Espec. II Pte (bye)	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION ESCLUSIVA"

BRANDETTI, Eugenio	Patol. Aves y Pilíferos	Reemplaz.
ERRECALDE, Jorge O.	Farmacolog. Farm. y Terap.	Reemplaz.-a.c/c
ETCHEVERRIGARAY, María E.	Virología	Titular-a.o/c
IDIART, Julio R.	Anatom. y Fisiol. Patolog.	Titular
LAGRECA, Liliana A.	Zotec. Gral. y Agrostol.	Titular-a.c/c
MONINA, Marta I.	Clín. Grandes Animales	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

BOCCIA, Francisco O.	Clínica Pequeños Anim.	Interino
DIBBERN, Alberto R.	Zotec. Espec. II Pte (bye)	Interino-c/l.
DURANTE, Eduardo J.	Servicio C. de Cirugía	Interino
FELDMAN, Raquel E.	Parasitolog. Comparada	Titular-a/c.o

FERNANDEZ, Enrique J.	Enfermed. Infecciosas	Interino-a/c.c
GARCIA VALENTI, Horacio	Zootec. Espec. II Pte (bye)	Interino
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología II	Interino-a.a/o
GRILLO, Virginia E.	Zootec. Espec. III Pte (ayp)	Interino
MAGGI, Nilda B.	Medicina Operatoria	Reemplaz.
MARTINO, Juan J.	Microbiología	Titular-a.c/c.
MURO, Alicia M.	Servicio C. de Cirugía	Interino
NOLA, Miguel A.	Introd. a la Biofísica	Titular
NOVARINI, Miguel A.	Farmacol. Farm. y Terap.	Interino
ORTEGA, César F.	Semiología y Propedéut.	Titular
PENNIMPEDE, María T. del A.	Tecnolog. y S. Alimentos	Titular
REINOSO, Enso H.	Micología Méd. e Indust.	Interino-a.c/c.
RENNER, Juan F.	Clínica Grand. Animales	Interino
RUAGER, Jorge	Anatomía y Fisiol. Pat.	Titular

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BRANDETTI, Eugenio	Parasit. y Enferm. Parasit.	Interino
BRAVO BARDALES, Tomás	Economía Agraria	Reemplaz.
FINOCHIETTO, Héctor D.	Patología Médica	Interino
GIMENO, Eduardo J.	Patología General	Titular
MAGGI, Nilda B.	Patología Quir. y Podol.	Interino
MALIANDI, Florestán S. (h.)	Higiene Epid. y S. Pública	Titular
MOISO, Alejandro C.	Microbiología	Titular
OLIVA, Graciela A.	Virología	Interino
PRIO LOFEUDO, Graciela E.	Zootec. Espec. III Pte (ayp)	Interino
ROJAS, Edmundo R.	Fisiología	Titular
SARA, Raúl C.	Reproducción Animal	Interino
TARSIA, Elba	Introd. a la Biofísica	Titular
TESORIERO, Catalina	Microbiología Especial	Interino
VENTURINI, Lucila M.	Parasit. y Enferm. Parasit.	Interino-a.c/c.

VILLAR, Martha E.

Análisis Clínicos I Pte.

Interino

VILLAR, Martha E.

Análisis Clínicos II Pte.

Interino

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

LA RESPUESTA INMUNE EN BOVINOS INFECTADOS

CON TRITRICHOMONAS FOETUS

(TESIS para optar al GRADO de DOCTOR en CIENCIAS VETERINARIAS)

PEDRO SOTO

(1985)

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

ASESOR CIENTIFICO; Prof. Dr. Enrique F. F. Pennimpe

Trabajo de investigación realizado en el Laboratorio
de Inmunoquímica, 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 durante el desarrollo de este trabajo
- A las autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata, por autorizar a realizarse 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.
- Al Prof. Dr. R. P. Nosedá, por el permanente estímulo en la formación académica y científica.

DEDICACION

A mi hija Guadalupe y mi esposa. A mi madre y a la memoria de mi padre

A B R E V I A T U R A S

Ac	anticuerpo.
Ag	: antígeno.
E_1 cm	coeficiente de extinción porcentual.
G.P.003	suero de cobayo anti-Tritrichomonas foetus.
GRC	: glóbulos rojos de carneros.
pac	pliegue ano caudal.
tc	tabla del cuello.
SFT	solución fisiológica tamponada.
T. foetus	Tritrichomonas foetus.
T. vaginalis	Trichomonas vaginalis.
T. 8	: toro número ocho.
T. 9	toro número nueve.
Vaq. 36	vaquillona número treinta y seis.
Vaq. 37	: vaquillona número treinta y siete.
Vaq. 38	vaquillona número treinta y ocho.

INDICE

	<u>Página</u>
Resumen	7
Summary	9
Introducción	10
Material y métodos	16
Resultados	31
Discusión	45
Conclusiones	52
Bibliografía	54

R E S U M E N

Con el propósito de analizar la evolución de la respuesta inmune durante el período de la infección y la efectividad de los métodos de diagnósticos, fueron empleados 26 bovinos Holando-Argentino (machos y hembras) infectados natural y experimentalmente con T. foetus.

Los machos fueron infectados instilando en cavidad prepucial 2×10^7 protozoarios. Las hembras recibieron la misma cantidad por instilación en el fondo de la vagina, sincronizando previamente el celo mediante inoculación de prostaglandina F2 alfa.

Se tomaron muestras de suero, mucus vaginal y secreción prepucial, durante 53 semanas en el lote infectado experimentalmente y por única vez en el infectado naturalmente. La evolución del título de Ac séricos y locales (vagina y prepucio) fue seguida mediante pruebas de microaglutinación, hemaglutinación pasiva e inmunodifusión. Paralelamente, muestras de los genitales fueron incubadas en medio de cultivo a los efectos de verificar la presencia de T. foetus.

Las hembras alcanzaron el nivel máximo de Ac séricos a las 11 semanas post-infección, quedando libres del protozoario a las 16 semanas. En mucus vaginal, los Ac fueron detectados por microaglutinación entre la 9ª y 24ª semana post-infección.

Los toros manifestaron una escasa respuesta humoral, permaneciendo infectados con T. foetus.

La respuesta celular medida por ensayo de blastogénesis, se realizó en el momento en que los Ac séricos alcanzaron títulos aglutinantes elevados, obteniéndose entre un 3-8 % de linfoblastos, con mayor respuesta en hembras.

La inoculación intradérmica de homogeneizado de T. foetus indujo una significativa sensibilidad cutánea en los animales infectados, siendo mayor en las hembras.

Los Ac séricos involucrados en la respuesta, correspondieron a la subclase IgG₂, con vestigios de IgG₁ e IgA. En mucus -

cérvico vaginal se detectó únicamente IgG₁ específica.

Las hembras, luego de superar la infección, fueron re---
fractarias a la reinfección ensayada 42 semanas después de inicia-
da la experiencia.

S U M M A R Y

Holando Argentino cattle (n= 26, bulls and cows) bearing either natural or experimental T. foetus infection, were used in a protocol in order to analyze the course of the immune response and the effectiveness of diagnosis procedures. Infection in bulls were induced by instillation of 2×10^7 protozoa into the preputial cavity. In the case of cows identical amount of cells were instilled through the vagina after sincronization of cycles with prostaglandina F₂ alpha.

Samples of serum, vaginal mucus and preputial secretion were obtained throughout 53 weeks from the experimentally infected animals, and only once from the animals bearing natural infection.

Development of serum antibodies and of those isolated -- from vagina or prepuce was followed by means of microagglutination, pasive, hemagglutination and immunodifusion tests. In order to ascertain the presence of T. foetus, samples of genital fluids were incubated in parallel on culture media. In the cows, the levels of serum antibodies were maximal at the 11th week post-infection; at week 16 cows were totally free of protozoa. Antibodies in vaginal mucus were detected by the microagglutination test between week 9 and 24 post-infection.

In the bulls showed a poor humoral response and remained infected with T. foetus.

Cellular response was measured by the blastogenesis assay at the time the agglutinating titers of serum antibodies were highest. Results showed 3 to 8 % linfoblasts, with higher figures in cows compared with the bulls.

Intradermal administration of T. foetus homogenats elicited a significant skin reactivity in the infected animals; the skin reaction was stronger in the cows.

The serum antibodies involved in the response, belonged to the subclass IgG₂ and trace amounts of IgG₁ and IgA. In the case of vaginal mucus only the specific IgG₁ was detected.

Cows that had overcome the infection were refractories to reinfection attempted 42 weeks after the start of the experience.

I N T R O D U C C I O N

El Tritrichomonas foetus (T. foetus)⁽⁴⁰⁾, es un protozoario ubicado en el reino Protozoa, Phylum: Sarcocystophora, Subphylum: Mastigophora, Clase: Zoomastigophora, Orden: Trichomonadida, Familia: Trichomonadidae. Es conocida también como Trichomonas foetus, T. bovis, T. genitalis, T. uterovaginales y T. mazzenti -- (49).

Se presenta como fusiforme o piriforme, de 10 a 25 μ de largo por 3 a 15 μ de ancho. Posee un sistema mastigonte complejo, con costa prominente, tres flagelos anteriores y el cuarto recurrente se extiende libre desde el extremo posterior del cuerpo hasta alcanzar una longitud semejante a la de los flagelos anteriores. La membrana ondulante consta de dos partes: una proximal, que es un pliegue de la superficie dorsal y otra distal, limitada por el flagelo recurrente, que corre a lo largo de la parte proximal sin conexión obvia con la misma. El axostilo, grueso, hace protusión desde el extremo posterior del cuerpo. En la parte posterior del citoplasma, presenta gran número de gránulos para-axostilares y para-costales (hydrogenosomas) visibles al microscopio óptico -- (19).

La reproducción del T. foetus es asexual, realizándose por fisión binaria en forma longitudinal.

Dentro del género y especie T. foetus, existen 3 serotipos antigénicamente diferenciables: Belfast, Manley y Brisbane, no distinguibles morfológicamente y cuya patogenia en los bovinos es similar. Mediante pruebas de aglutinación y precipitación en gel, Robertson⁽⁴¹⁾, comprobó que existen ciertas estructuras antigénicas en común entre los tres serotipos del género, identificando en cambio, una fracción polisacárida específica de cada cepa bovina.

La T. foetus, produce en los bovinos, una enfermedad venérea (trichomoniasis genital bovina), caracterizada por esterilidad, aborto y piómetra.

Dicha enfermedad se encuentra presente en casi todos los países del mundo. En nuestro país existen datos de incidencia en diferentes provincias. Habich y col.⁽¹⁵⁾, encontraron T. foetus en

los dos tambos analizados en Catamarca. También en el Valle de Lerma (Salta) ⁽¹⁶⁾, controlaron 61 establecimientos, de los cuales el 29,5 % estaba infectado con T. foetus.

Spath ⁽⁴⁷⁾, en un estudio sobre sanidad animal realizado en la provincia de Tucumán halló 18 tambos (12,1 %) de 141, con la enfermedad venérea.

Kloster ⁽²⁵⁾, en un relevamiento sanitario realizado en la subcuenca lechera de Las Rosas (Santa Fe), investigó 28 tambos de los cuales en el 21,5 % había portadores de T. foetus.

Villar ⁽⁵¹⁾ realizó una recopilación de datos sobre la incidencia de la tricomoniasis en un período comprendido entre 1966 y 1977; encontrando que en la provincia de Buenos Aires, de 351 establecimientos el 81 % estaba infectado y que de 37 establecimientos correspondientes a las provincias de Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, La Pampa y Santa Fe, el 21,6 % resultó positivo a dicha enfermedad.

Otra provincia en la cual se han registrado datos sobre incidencia, es San Luis (Villa Mercedes), en la cual Vázquez y cols. ⁽⁵⁰⁾, encontraron el 45 % de los 31 establecimientos analizados, infectados con el protozoario.

En cuanto a la localización en el toro, podemos decir, que la cavidad prepucial es el hábitat de la T. foetus, que se encuentra sobre la mucosa del prepucio y del pene, sin dar síntomas clínicos que hagan sospechar la infección. Existe la posibilidad de transferirse el protozoario entre machos al saltarse entre ellos, cuando hay demasiados reproductores en un espacio reducido.

Se encontró que toros menores de 3 años son menos susceptibles a la enfermedad ⁽⁶⁾, condición que decrece con el paso de los años.

La T. foetus al no penetrar en el epitelio prepucial, no produce lesiones.

En la hembra, la infección es exclusivamente venérea, transmitida por el coito, así como por inseminación artificial. Se produce primero una vaginitis, entre los 14-18 días postinfección, pasando luego al útero y desapareciendo de la vagina. El aborto, en caso de producirse, es temprano (1-16 semanas), con recupera---

ción espontánea si va acompañado con expulsión de las secundinas; - si estas persisten se produce una endometritis con esterilidad permanente. Si no hay aborto, el feto muere y se macera en el útero - instalándose una piómetra.

En cortes histológicos de útero, la T. foetus aparece en las secreciones de la superficie, en la luz de las glándulas endometriales o entre los componentes fetal y maternal del placentoma.

La localización del parásito en el mucus secretado en el tracto genital femenino, con la consiguiente absorción del material antigénico a través del epitelio, parecería ser el estimulador de una respuesta inmunológica.

Andrew, Miller y Rees ⁽³⁾, fueron los primeros en demostrar que los animales recuperados espontáneamente de trichomoniasis eran resistentes a nueva infección. Observaciones semejantes realiza en Argentina Gelormini ⁽¹⁴⁾.

Los anticuerpos (Ac) producidos por la infección son clasificados por Robertson ⁽⁴²⁾ en:

- a) Ac humorales circulantes, cuya producción es estimulada por antígenos que llegan a circulación desde el útero, en infecciones severas.
- b) Ac locales: - Ac uterinos.
- Ac vaginales.

Estos anticuerpos son detectables fácilmente por técnicas de aglutinación, como la microaglutinación serológica y la microcoaglutinación ⁽³⁷⁾.

Empleando como antígeno una fracción proteica de T. foetus, precipitable con ácido tricloroacético, Kerr ⁽²¹⁾ desarrolla una prueba cutánea en bovinos que coteja con observaciones microscópicas del material vaginal y pruebas serológicas de aglutinación. En el ensayo cutáneo observó la formación de una pápula o placa en forma inmediata en aquellos animales que estaban infectados o que poseían Ac aglutinantes con títulos elevados. Posteriormente, Feinberg y Mergan ⁽¹³⁾ aislaron e identificaron un polisacárido de T. foetus (var. Manley), serológicamente específico, que produce una reacción intradérmica en vacas inmunizadas.

Kerr y Robertson (23), intentaron experimentalmente inmunizar a bovinos por medio de instilaciones uterinas y vaginales de preparados antigénicos y mediante inoculaciones intramusculares, y hallaron que, únicamente por inmunización local se obtienen Ac en mucus uterino, pero que desaparecen precozmente.

Pierce (38), observó que en infecciones activas de vagina, los Ac contra T. foetus fueron detectables en mucus vaginal, sin aparecer Ac séricos, por lo que concluyó que eran respuestas a parentemente independientes.

Honigber (18) y Levine (27) afirman que los Ac circulantes post infección tienen poco valor protector, siendo las inmunoglobulinas locales (en útero y vagina) las responsables de la eliminación de las T. foetus de los genitales.

En toros la respuesta inmune es muy débil y la infección se torna más difícil de curar espontáneamente (10). Kerr (21), en 1944, ya había observado que los títulos aglutinantes en suero de toros, estaban dentro de los niveles normales. Recientemente, ---- Clark (7), intentó establecer un método curativo y preventivo de la trichomoniasis genital en toros, inmunizándolos con una suspensión de células en adyuvante oleoso, logrando curar 11 toros de -- los 16 inmunizados (68,8 %), sin explicar el camino inmunológico -- de los resultados obtenidos.

La presencia de la enfermedad, se hace evidente en un ro deo por la disminución significativa de los índices reproductivos. Se observa infertilidad después de varios servicios, períodos prolongados entre celos, vientres que estaban preñados y que meses -- más tarde entran en celo, presencia de abortos y piómetras.

El diagnóstico de laboratorio de la trichomoniasis geni tal bovina se fundamenta en la detección del protozoario en mate-- rial proveniente de un aborto o de los genitales de las hembras -- y/o machos. La demostración del protozoario puede realizarse por -- exámen microscópico directo de la muestra y/o cultivo en el medio-- de Plastridge (39), enriquecido con 10 % de suero bovino o equino-- inactivado.

Existen varios factores que inciden en un buen diagnósti-- co por cultivo, la correcta toma de muestra, la rapidéz de trans--

porte y el procesamiento.

El diagnóstico serológico tropieza con el desconocimiento del nivel de Ig circulantes en diferentes estadios de la enfermedad. En algunas oportunidades, se obtienen buenos resultados con la detección de Ac en mucus vaginal.

Mo Entegart ⁽³¹⁾ desarrolla un ensayo de hemoaglutinación pasiva para determinar títulos de Ac humorales anti *Trichomonas vaginalis*, sensibilizando glóbulos rojos de carnero (G.R.C.) con un polisacárido de este parásito. Este autor logra diferenciar por esta prueba, *T. vaginalis* y las cepas Manley y Belfast de *T. foetus* ⁽³²⁾. Más recientemente Ackers ⁽¹⁾, empleando un suero monoespecífico marcado con ¹²⁵I determina la presencia de Ac específicos contra *T. vaginalis* en mucus vaginal de mujer infectada. Mathews ⁽³⁰⁾ evaluó dos pruebas serológicas, empleando sueros de mujeres con vaginitis clínica y cultivo positivo, encontrando que el 78 % de los sueros presentaban una reacción positiva mediante el uso de la técnica de hemaglutinación indirecta y el 43 % por inmunodifusión en gel.

Alderete ⁽²⁾, mediante una prueba inmuno-enzimática (ELISA) detectó altas concentraciones de Ig G, Ig A e Ig M anti-*T. vaginalis*, en suero de pacientes y animales de laboratorio infectados. Solamente Ig G e Ig A fueron demostrados a partir de lavados vaginales de mujeres con trichomoniasis aguda.

En síntesis, podemos decir que la respuesta inmune a *T. foetus* en bovinos fue abordada en los últimos 50 años, sólo en aspectos parciales y con discontinuidad. Esto trae como consecuencia lógica que en el campo de la medicina veterinaria se emplee hoy en día como único recurso práctico de diagnóstico, el aislamiento por cultivo del protozoario, con los riesgos de falsos negativos que ello implica, según Johnson ⁽²⁰⁾. A pesar de ello es considerado el más seguro de los métodos disponibles. Por esta razón, al planificar este trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

- a) Un estudio integral de la respuesta inmune de bovinos

infectados experimentalmente con T. foetus, observando los cambios que pudieran aparecer en: mucus vaginal, mucus uterino, suero, sensibilidad cutánea; determinando además los tipos de Ig implicadas y la respuesta celular (inmunidad celular).

- b) Establecer la sucesión cronológica en que tales síntomas o manifestaciones de enfermedad aparecen y son detectables, con el propósito de determinar si es factible el empleo de una metodología diagnóstica, oportuna, segura y práctica para la trichomoniasis.
- c) Indagar sobre el grado de protección que la inmunidad celular y humoral pudieran proporcionar al animal y - la duración de tal resistencia, con énfasis en el macho, dadas las diferencias de la patogenia con respecto a la hembra (10).

1) Obtención de Tritrichomonas foetus:

El protozoario se aisló a partir de un toro infectado naturalmente. El material prepucial fue obtenido por el método del lavaje prepucial ⁽⁴⁸⁾, instilando 30 ml de SFT a pH 7,2 (SFT = 2,22 g. de Na₂ H PO₄ . 7 H₂O; 6,80 g. Na Cl; 0,43 g. KH₂ PO₄; agua destilada c.s.p. 1000 ml), y realizando posteriormente masajes en dirección ántero-posterior durante 1 minuto, recogiendo el líquido del lavado en un recipiente estéril y centrifugando a 400xg. durante 5 minutos. El sedimento obtenido se incubó a 37°C en el medio de cultivo, realizando observaciones microscópicas cada 24 hs hasta la confirmación del resultado positivo. El medio de cultivo utilizado fue el de Plastringe ⁽³⁹⁾, compuesto por:

- | | |
|-----------------------------|----------|
| - Peptona | 10 g |
| - Extracto de carne | 3 g |
| - Cloruro de sodio | 1 g |
| - Dextrosa | 10 g |
| - Agar bacteriológico | 0,8 g |
| - Agua destilada | 1.000 ml |
- Con el agregado, antes de ser usado, de 10 % de suero bovino o equino inactivado (30 minutos a 56°C) más 1.000 U de penicilina; 500 mcg de estreptomina y 250 U de nistanina, por ml.

El protozoario aislado fue identificado serológicamente como T. foetus variedad Belfast, utilizando sueros monoespecíficos contra las variedades Belfast, Manley y Brisbane, provenientes de: División of animal Health Research Laboratory, Private Bag N° 1, - PO Parkville, Victoria 3052, Australia.

2) Animales de experimentación:

Se emplearon un total de 26 animales divididos en diferentes lotes:

- Lote A: compuesto por 3 vaquillonas vírgenes (raza Holando Argentina) de 18 meses de edad, y sexualmente maduras, identificadas con los Nros. 36, 37 y 38. Estos animales fueron infectados ins-

tilando en el fondo de la vagina, 4 ml de una suspensión de ----
T. foetus en SFT pH 7,2, con una concentración de $2,52 \times 10^6$ pro-
tozoarios . ml⁻¹, manteniéndolas en experimentación durante 53 -
semanas. La inoculación se realizó en el momento del celo, el --
cual se obtuvo por inducción, inyectando prostaglandina F₂α, si-
guiendo las instrucciones del fabricante del producto utilizado,
para sincronización del celo.

- Lote B: compuesto por 11 vaquillonas (raza Holando Argentina) de 18 a 24 meses de edad, pertenecientes a un tambo del Partido de Tandil, en el cual se detectaron por cultivo, toros portadores de T. foetus. Estas vaquillonas fueron seleccionadas de un lote de 40 animales post servicio, por encontrarse sin gestación en el momento del tacto; realizándose un solo muestreo.
- Lote C: compuesto por 2 toros adultos (raza Holando Argentina) de 6-7 años de edad, libres de T. foetus. Estos animales fueron infectados, instilando en la cavidad prepucial 10 ml de SFT conteniendo 2×10^6 protozoarios . ml⁻¹, realizando varios masajes prepuciales en dirección ántero posterior. El tiempo de experimentación con este lote fue de 16 semanas.
- Lote D: compuesto por 4 toros adultos (raza Holando Argentina), pertenecientes al mismo establecimiento que el lote B. Tres de ellos eran portadores de T. foetus, confirmado por cultivo en el medio de Plastridge. Estos animales fueron muestreados por única vez.
- Lote E: compuesto por 6 animales (raza Holando Argentina): 3 vaquillonas vírgenes de 16 meses de edad y 3 terneros de 9 a 12 meses de edad. Estos animales fueron utilizados como control negativo en todas las pruebas realizadas durante la experimentación.

3) Antígeno para prueba de aglutinación:

Las T. foetus obtenidas como se indicó en el punto 1, -- fueron mantenidas en el medio de Plastridge, realizando repiques -

semanales. En los momentos en que fue necesario utilizarlas como antígeno vivo, se las incubó durante 48 hs, ajustando la concentración a 2×10^6 protozoarios . ml^{-1} , en el mismo medio de cultivo.

Para comparar los resultados obtenidos con el antígeno anterior, se realizó un cultivo de T. foetus en caldo de Plastridge durante 72 hs, separando posteriormente los protozoarios por centrifugación a 500 xg lavando los mismos 3 veces con SFT pH 7,2, resuspendiendo finalmente en la misma solución con 1% de formol y ajustando la concentración a 2×10^6 protozoarios . ml^{-1} .

Los recuentos para determinar la concentración fueron realizados en la cámara de Neubauer, utilizando el reticulado para glóbulos blancos.

4) Obtención del suero anti- T. foetus:

Dos cobayos fueron inoculados en la cara interna de los muslos, en forma subcutánea, con 1 ml de una suspensión de T. foetus muertas por formol, a una concentración de 13×10^6 células $\times \text{ml}^{-1}$, mezcladas con igual volumen de adyuvante completo de Freund (Bayol F o vaselina de alta pureza: 90 ml; Arlacel A: 10 ml; *Mycobacterium tuberculosis* muertos por calor: 100 mg), repitiendo la dosis 7 días después.

Diez días post-inoculación de la 2a. dosis, se inoculó, en forma intracardíaca 0,5 ml de una suspensión de protozoarios --conteniendo 13×10^6 células . ml^{-1} . La sangría se realizó 15 días después de la descarga, obteniendo el suero hiperinmune, el cual fue titulado con antígeno vivo por la técnica de microaglutinación e identificado como G.P.003. Dicho suero fue utilizado como control positivo en todas las reacciones serológicas.

5) Técnica de Microaglutinación:

A partir del tiempo cero, los animales correspondientes al "Lote A", fueron sangrados periódicamente por punción de la vena yugular, durante 53 semanas. La extracción de muestras fue semanal en el primer tercio de la experiencia, y posteriormente cada 20 días hasta finalizar la misma.

Los toros pertenecientes al "Lote C", fueron sangrados -

cada 10 a 15 días durante 16 semanas.

Los animales de los "Lotes B, D y E", fueron sangrados - una única vez.

Con los sueros obtenidos se realizaron diluciones seriadas en razón dos (*), tomando 0,05 ml de cada una, enfrentándola en una policubeta, con 0,05 ml de una suspensión de T. foetus en el medio de cultivo, con una concentración de 2×10^6 protozoarios ml^{-1} . Luego de una incubación de 30 minutos a 37°C , se efectuaron las observaciones al microscopio con pequeño aumento. La máxima dilución de suero capaz de aglutinar e inmovilizar al 50 % o más de los protozoarios, fue tomada como el título aglutinante,

En forma paralela se enfrentaron diluciones de los distintos sueros, con una suspensión de T. foetus muertas por formol al 1 % en SFT pH 7,2, con una concentración igual a la descrita anteriormente.

Para este ensayo se utilizó como control positivo, un suero de cobayo anti-T. foetus (G.P.003), y como control negativo SFT pH 7,2.

6) Ensayo de mucoaglutinación:

A las hembras bovinas correspondientes a los "Lotes A, B y E", en el mismo momento, en que se efectuó un muestreo sanguíneo se realizó una extracción de moco vaginal, de acuerdo a lo descrito por Pierce⁽³⁷⁾, con algunas modificaciones practicadas por nosotros. La extracción de la muestra se realizó utilizando una pipeta de inseminación artificial por animal, a la cual se le había obturado uno de los extremos, haciéndole luego un orificio lateral a 0,5 cm del mismo. El otro extremo se conectó con una jeringa a través de una prolongación de tubo de látex. Luego se introdujo en vagina hasta el fondo de la misma instilando 5 ml de SFT pH 7,2, para diluir el mucus, facilitando la extracción. Posteriormente se succionó con el émbolo de la jeringa, acompañando con movimientos-

(*) Las diluciones de los distintos tubos corresponden a una serie aritmética cuyos términos se diferencian por un factor 2, llamado razón de la serie.

ántero-posterior, orientando el orificio lateral de la pipeta sobre el piso de la vagina, hasta extraer la mayor cantidad de moco vaginal. Si el animal se encontraba en la fase estral, la extracción se realizaba fácilmente, no necesitando la instilación de SFT.

Las muestras así obtenidas se colocaron en un tubo de ensayo estéril, tomando 3 ml de cada una de ellas y se mezclaron con igual volumen de agar al 2,5 % en SFT pH 7,2 , previamente calentadas a 56°C, transfiriendo esta mezcla a una placa de Petri de 6 cm de diámetro. Una vez solidificado el agar, se colocaron sobre su superficie, 2 ml de SFT pH 7,2 con ázida sódica al 0,05 como antibacteriano, y tras incubar 18 hs a 37°C, se separó la parte líquida a los efectos de investigar la presencia de Ac que difundieron del mucus vaginal. Con el sobrenadante así obtenido se realizaron diluciones seriadas en una policubeta, siguiendo la metodología e interpretación, descrita anteriormente en el ensayo de seroaglutinación.

Como control positivo, se mezclaron 3 ml de agar al 2,5% en SFT, pH 7,2 , con igual volumen de suero de cobayo (G.P.003) diluido al medio con SFT. Una vez solidificado el agar, se agregaron sobre la superficie de la misma, 2 ml de SFT con ázida sódica al 0,05 % siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

7) Ensayo de aglutinación con secreción prepucial:

En los períodos establecidos, en los cuales se efectuó la extracción de sangre venosa a los toros correspondientes a los "Lotes C y D", se procedió a extraer secreción prepucial instilando en dicha cavidad 10 ml de SFT pH 7,2 , realizando masajes en dirección ántero-posterior, durante dos minutos, para luego recoger el material en un recipiente estéril y centrifugado a 5.000 xg durante 30 minutos. El sobrenadante fue utilizado para la investigación de anticuerpos anti-T. foetus, enfrentando 0,05 ml del mismo con igual volumen de T. foetus vivas, a una concentración de 2×10^6 células . ml⁻¹ . Luego de incubar a 37°C durante 30 minutos, se observó al microscopio. El ensayo se consideró positivo, cuando el 50 % o más de los protozoarios fueron inmovilizados y aglutinados.

8) Cultiyo:

En cada uno de los muestreos, una alícuota de los exudados vaginales correspondientes a los "Lotes A, B y E" y el sedimento de los lavajes prepuciales correspondientes a los "Lotes C y D", fueron sembrados en el medio de Plastridge, e incubados durante 7-días, a 37°C, observando cada 24 hs al microscopio, para verificar la presencia o ausencia de la T. foetus.

9) Obtención de homogeneizado de T. foetus:

A los efectos de buscar un antígeno soluble apropiado, se efectuaron variantes en la obtención del mismo:

- Homogeneizado I: Los protozoarios fueron cultivados a 37°C durante 72 hs en 200 ml de caldo de cultivo (Plastridge: sin agar), separándolos luego por centrifugación a 700 xg durante 20 minutos, lavándolos 2 veces con solución salina glucosada al 2% isotónica pH 7,2 (cloruro de sodio: 8,67 g; glucosa: 2 g; agua destilada, 1.000 ml), y finalmente resuspendidas en la misma solución, a una concentración de 13×10^6 células . ml⁻¹. Esta suspensión de protozoarios fue sometida a sonicación durante 25 minutos en punto 5 (Megason Ultrasonic Desintegrator), en baño de hielo, -- distribuyendo el tiempo en 3 períodos con dos descansos intermedios; obteniendo finalmente el total de células lisadas, comprobado por observación microscópica.

Las T. foetus lisadas fueron centrifugadas 20 minutos a 18.000 xg, quedándonos con el sobrenadante como fuente de antígeno soluble.

- Homogeneizado II: A una suspensión de T. foetus en solución salina glucosada isotónica pH 7,2, con una concentración de $2,5 \times 10^6$ protozoarios . ml⁻¹, se la sonicó en el punto 5, variando el tiempo a 15 minutos en 3 períodos iguales.

Luego fue centrifugado a 13.000 xg durante 15 minutos, tomando el sobrenadante como antígeno soluble.

- Homogeneizado III: Un cultivo de T. foetus fue centrifugado 20 minutos a 700 xg. Estas fueron lavadas 2 veces con SFT pH 7,2. -

La resuspensión de los protozoarios, luego del lavado, se realizó de la siguiente manera:

- . IIIa: Una parte del mismo fue resuspendida en agua destilada, con el propósito de provocar la lisis del protozoario.
- . IIIb: Una segunda parte se resuspendió en SFT.
- . IIIc: Una tercera parte se resuspendió en SFT más sodio dodecilsulfato a una concentración final de 0,1 %.

A las 3 fracciones se las sometió a sonicado durante 5 minutos en el punto 5, y centrifugado a 6.500 xg durante 20 minutos, obteniendo el sobrenadante como antígeno soluble.

La fracción IIIc se dializó 24 hs, contra SFT con el objeto de eliminar el sodio dodecilsulfato.

- Homogeneizado IV: Las T. foetus obtenidas por centrifugación -- del caldo de cultivo, fueron lavadas con una solución de sacarosa 0,25 M-5 mM de sulfato de Magnesio (29,45), y suspendidas finalmente en 10 ml de la misma solución, logrando una concentración de $3,18 \times 10^6$ protozoarios . ml⁻¹. Esta suspensión fue sonificada durante 4 minutos en el punto 6 del sonicador, obteniendo luego la fracción antigénica soluble por centrifugación a 1.200-xg durante 15 minutos. El sobrenadante se dividió en 2 partes:

- . IVA: para ser utilizado como tal.
- . IVb: dializado 24 hs contra una solución borato salina pH 8,5-⁽⁴⁾(Hidróxido de sodio 2 g; Acido bórico 9 g; agua destilada 1.000 ml).

- Homogeneizado V: Los protozoarios obtenidos de un cultivo de 72-hs de incubación, fueron suspendidos en SFT pH 7,2 , y después de 2 lavados en la misma solución, se obtuvo una concentración final de 11×10^6 células . ml⁻¹ . Estos protozoarios se sometieron a los efectos de un homogeneizador de tejidos (Ystral Gmb H-Homogenizer) con intervalos de 1 minuto, hasta observar al microscopio todas las células destruídas. Finalmente se centrifugó a 3.000 xg durante 10 minutos, obteniéndose el sobrenadante como antígeno soluble.

- Homogeneizado VI: 200 ml de caldo Plastridge, incubado durante 72 hs, fue centrifugado a 1,500 xg durante 15 minutos, y se lavaron las T. foetus 5 veces con SFT pH 7,2, resuspendiendo finalmente en 10 ml de la misma solución, obteniendo una concentración de 12×10^6 células . ml⁻¹.

Posteriormente fueron sonicadas durante 60 segundos en el punto 9 del sonicador, destruyendo casi la totalidad de los protozoarios, obteniendo la fracción soluble por centrifugación a 18.000 xg durante 30 minutos⁽⁵⁴⁾.

El sobrenadante fue dializado contra SFT pH 7,2 durante 48 hs. Luego de la diálisis, se centrifugó 15 minutos a 18.000-xg, pasando el sobrenadante por un filtro de celulosa 0,22 μ , conservándolo en el refrigerador (4-8°C).

10) Prueba de inmunodifusión:

Siguiendo la técnica descrita por Ouchterlony⁽³⁴⁾, se utilizó una cápsula de Petri de 6 cm de diámetro con una doble capa de agar noble en SFT pH 7,2, con azida sódica al 0,1%, como inhibidor de la flora contaminante. La capa inferior estaba constituida por 2 ml de agar al 2% y la superior por 4 ml al 1%.

Empleando sacabocados se efectuaron, en la capa superior 1 pocillo central y 6 periféricos de 6 mm de diámetro, separados entre ellos por 4 mm, teniendo como fondo a la capa inferior del agar.

A los efectos de identificar el antígeno soluble adecuado, se realizaron por cada homogeneizado de T. foetus, 2 placas para inmuno-difusión, colocando en el pocillo central de una de ellas el homogeneizado a probar y en los pocillos periféricos diluciones del suero hiperinmune anti-T. foetus (G.P.003). En la segunda placa, se probó en sentido inverso, colocando en el pocillo central el suero G.P.003 y en la periferia, diluciones del homogeneizado a probar.

Luego de incubar a temperatura ambiente durante 48 hs, en cámara húmeda, se procedió a lavar con SFT la proteína precipitada, durante 24 hs.

La coloración de las bandas se realizó con Negro amido -

(Negro amido 10B: 0,100 g; metanol: 45 ml; agua destilada: 50 ml; ácido 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.

Con todos los sueros, correspondientes a los "Lotes A, B, C, D y E", obtenidos en diferentes períodos, se realizó la prueba de inmunodifusión radial, con el propósito de investigar la presencia de anticuerpos precipitantes.

En placas de Petri, preparadas como se describió anteriormente, se llenó el pocillo central con antígeno soluble de T. foetus y en los periféricos se colocó, en cinco de ellos, los sueros de los animales de experimentación, y en uno, el suero control identificado como G.P.003.

Tras la incubación en cámara húmeda, durante 48 a 72 hs las placas fueron observadas, con ayuda de luz por incidencia sobre fondo negro, para identificar las bandas de precipitación.

11) Hemaglutinación pasiva:

Todos los sueros obtenidos, correspondientes a los "Lotes A, B, C, D y E", fueron probados mediante la técnica de hemaglutinación pasiva.

Dicha prueba se realizó con glóbulos rojos de carnero (GRC), marcados con la técnica de John J. Langone y Helen Van Vunakis⁽²⁶⁾.

- Obtención de glóbulos rojos: fueron obtenidos de un carnero, por punción venosa y recogidos en recipiente estéril con solución de Alsever (glucosa: 20,5 g, citrato de sodio: 8g; cloruro de sodio 4,2 g; agua destilada: 900 ml; ácido cítrico al 10%: 8 ml; pH 6,1) manteniéndolos refrigerados durante varias semanas.

- Marcado de los glóbulos rojos: se utilizó la técnica descrita por J.J. Langone y Helen Van Vunakis⁽²⁶⁾, utilizando tricloruro de cromo (Cr Cl₃) para adherir los antígenos de T. foetus a los GRC.

. Reactivos utilizados:

- Solución fisiológica (cloruro de sodio al 0,9 %).
- Solución de acetato: 0,9 % cloruro de sodio; acetato sodio -- 0,01 M; pH 5,5.
- Tricloruro de cromo (Cr Cl₃.6 H₂O).
- . Técnica de marcado: los glóbulos rojos suspendidos en la solución de Alsever, son lavados 4 veces con solución fisiológica. 1 ml del sedimento de GRC, obtenido por centrifugación a 400 - xg en el último lavado, es mezclado con 1 ml de la solución de antígeno, la cual debe estar libre de iones fosfato. Luego se agrega 1 ml de Cr Cl₃ a una concentración de 1 mg . ml⁻¹ disuelto en solución de acetato, inmediatamente antes de su uso. Se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos. El marcado se detiene agregando solución fisiológica fría; centrifugando a 400 xg, los GRC sensibilizados, durante 10 minutos, lavándolos dos veces con la misma solución y resuspendiéndolos finalmente a una concentración del 1 % para su uso.
- . Titulación de los sueros: para realizar este ensayo, todos los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos. Posteriormente se hicieron diluciones de cada uno en razón dos, cubriendo el rango de: puro hasta 1/2.048, colocando en cada pocillo de la policubeta 0,05 ml de la dilución más 0,025 ml de la suspensión de GRC sensibilizados.

El título hemaglutinante del suero, se obtuvo a partir de la máxima dilución del mismo, capaz de aglutinar los GRC sensibilizados, luego de incubar a temperatura ambiente entre 6-12 hs.

Como control negativo, se utilizaron GRC sensibilizados más solución fisiológica y como control positivo, GRC sensibilizados más suero G.P.003, anti-T, foetus.

12) Determinación de la inmunidad celular:

Con el propósito de determinar, además de la respuesta humoral, la inmunidad mediada por células, se ensayó la prueba de blastogénesis (28,52). Para ello, a los animales correspondientes a los "Lotes A y C", mantenidos durante toda la fase experimental, se les realizó una extracción de sangre en diferentes estadios de-

la infección, de acuerdo al esquema siguiente:

	Tiempo de extracción			
	9 semanas post-infección			
<u>Lote A</u>	18	"	"	"
	24	"	"	"
	29	"	"	"
	7 semanas post-infección			
<u>Lote C</u>	13	"	"	"
	16	"	"	"

- Obtención de la sangre: en todos los casos se realizó por punción venosa, recogiendo la sangre en recipientes estériles, usando como anticoagulante heparina, transportándola inmediatamente al laboratorio para su procesamiento.

- Descripción de la técnica de blastogénesis:

a) La sangre se diluyó mezclando 8 ml de la misma con 8 ml de SFT, pH 7,2.

b) Posteriormente se colocaron en tubo cónico graduado, 3 ml de - Ficoll-sodio diatrizoato (Sol. A: Ficoll tipo 400, Sigma, al - 9 %; Sol. B sodio diatrizoato, Sigma, al 33,9 %; mezclar 10 -- partes de sol. B, con 24 partes de sol. A) más 4 ml de sangre diluída. Se centrifugó a 500 xg durante 40 minutos, logrando - un sedimento de glóbulos rojos y en la interfase una capa rica en células mononucleares (28,52).

c) Dicha capa fue extraída por aspiración, colocándola en tubo es téril con solución de Gey, lavando 2 veces las células, por -- centrifugado a 1.500 xg durante 10 minutos.

La solución de Gey, está compuesta por:

- 1.- Agua destilada 8 ml
- 2.- Gey I 1 ml
 - . Na Cl 17,5 g.
 - . K Cl 0,925 g.
 - . Na₂ H PO₄ .7.H₂O ... 0,561 g.
 - . KH₂ PO₄ 0,0595 g.

. Glucosa	2,5	g.
. Rojo fenol	25	mg.
. Agua destilada	c.s.p.	500 ml

3.- Gey II 0,5 ml

. Mg Cl ₂ . 6 H ₂ O	0,42	g
. Mg SO ₄ . 7 H ₂ O	0,14	g.
. Ca Cl ₂ . 2 H ₂ O	0,34	g.
. Agua destilada	1.000	ml

4.- Gey III 0,5 ml

. Na H CO ₃	2,25	g.
. Agua destilada	100	ml

d) Los linfocitos fueron resuspendidos, a una concentración de 3×10^6 células . ml⁻¹, en medio de cultivo 199 de Difco, con teniendo 10 % de suero fetal bovino, 10 U de penicilina y 100 μ g de estreptomina . ml⁻¹.

e) Por cada animal se utilizaron 2 frascos Falcon:

- un control, con 3 ml de suspensión de células en el medio de cultivo.

- un problema, con la misma cantidad de suspensión celular -- más 0,1 ml de homogeneizado de T. foetus.

f) Las células fueron incubadas a 37°C durante 72 hs, eliminando luego el sobrenadante. Las células sedimentadas sobre la base del frasco de cultivo, fueron fijadas y coloreadas por la técnica de May Grünwald-Giemsa.

g) Finalmente se observó al microscopio ambos frascos (control y problema), haciendo el recuento de linfocitos y linfoblastos que posee cada campo microscópico, hasta llegar a un total de 300 células. El porcentaje de linfoblastos de la muestra problema se obtuvo restando el porcentaje de la muestra control.

13) Prueba intradérmica:

En este ensayo se utilizaron los "Lotes A, B, C, D y E", siendo este último, considerado como lote control negativo.

Todos los animales fueron inoculados intradérmicamente - con 0,1 ml de Homogeneizado VI de T. foetus en el pliegue ano-caudal y en la tabla del cuello, al mismo tiempo se inoculó SFT estéril, como control negativo, en el pliegue ano-caudal opuesto y en la tabla del cuello opuesta; determinando en ese instante la medida inicial de la pápula originada por el inóculo. Este ensayo se efectuó a partir del momento en que se detectaron anticuerpos específicos en moco vaginal, secreción prepucial y/o suero, en los "Lotes A y C". Y en el momento del muestreo único para los "Lotes B, D y E".

La reacción fue leída a partir de la inoculación con intervalos de 10 a 20 minutos, durante un período de 2 a 4 hs. Finalmente fueron controlados a las 48 hs para detectar una reacción retardada.

14) Obtención del suero anti-gammaglobulina de bovino:

A partir de un suero normal bovino, se obtuvo la fracción gamma/globulina por precipitación con un volumen de solución saturada de sulfato de amonio ($760 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 7)⁽²⁸⁾. El precipitado -- se separó por centrifugación durante 30 minutos a 4.000 G., en centrífuga refrigerada, y fue redisoluelto en un volumen de agua destilada igual a la mitad inicial 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 dializó contra SFT - pH 7,2 hasta eliminar totalmente los sulfatos, lo que se evidencia por reacción negativa con cloruro de bario al 5 %. La concentración de gammaglobulina fue llevada a $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ con espectro de absorción de 280 nm. Para las conversiones de densidad óptica (D.O.) a $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, se utilizó un coeficiente de extinción ($E_1^{1\% \text{ cm}}$) -- de 13,7⁽¹¹⁾. La D.O. medida a 280 nm de longitud de onda, multiplicada por $1/E_1^{1\% \text{ cm}}$ da los g % de esa proteína. Si en cambio, la D.O. es multiplicada por $10/E_1^{1\% \text{ cm}}$ o bien por 0,73, se obtendrán los mg de gammaglobulina bovina por ml de solución.

Para elaborar el suero anti-gammaglobulina de bovino ---

(suero de Coombs), se inoculó un conejo por vía subcutánea, en la cara interna de los miembros posteriores con 1 ml de gammaglobulina bovina, ($10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) mezclado con igual volumen de adyuvante de Freund completo (Bayol F o vaselina muy pura: 90 ml; Arlacel A: 10 ml; Mycobacterium tuberculosis muertos por calor: 100 mg). Una semana después se preparó idéntica mezcla e inoculó cuatro dosis - de 0,5 ml a lo largo de la columna vertebral. A la tercera semana, se repitió una inoculación igual a la primera.

Los animales fueron sangrados a blanco por punción cardíaca, cuando sus sueros mostraron un título mayor a 500, mediante la prueba del anillo⁽²⁸⁾ en tubos capilares frente a diluciones de gammaglobulina bovina.

15) Determinación del tipo de inmunoglobulina:

Para este ensayo fueron utilizadas las vaquillonas correspondientes al "Lote A". El suero obtenido, en el momento de mayor nivel de anticuerpos, (Ac), fue procesado de la siguiente forma:

- a) 5 ml de cada suero inactivado (30 minutos a 56°C), fue mezclado con un sedimento de T. foetus lavadas con SFT pH 7,2.
- b) Se incubó una hora a 37°C , con agitación, para realizar la adsorción de Ac.
- c) Luego fue centrifugado a 1.500 xg durante 10 minutos, repitiendo esta operación 3 veces, lavando con SFT.
- d) El sedimento del último centrifugado fue resuspendido con 2 ml de glicina clorhídrico 0,1 M, pH 2,2 (Sol. A: glicina 1M = 10 ml; Sol. B: Cl H 1N = 8,8 ml, agua destilada 81,2 ml), agitando suavemente durante 10 minutos, para realizar la disociación de Ac; centrifugando luego a 1.500 xg durante 10 minutos.
- e) El sobrenadante fue separado y neutralizado inmediatamente con Trishidroximetil- amino metano, pH 8,0.

Las muestras de mucus vaginal utilizadas para la identificación del tipo de inmunoglobulina (Ig) en que estaba localizada la actividad anticuerpo, fueron las que presentaron mayor título,-

determinado mediante el ensayo de mucoaglutinación. Un volumen de mucus fue mezclado (en placa de Petri de 6 cm. de diámetro) con un volumen de agar al 2,8 % en SFT, a una temperatura de 56°C. Una vez solidificado se agregó sobre su superficie, un volumen de SFT, incubando a 37°C durante 18 a 20 horas. Posteriormente se recogió la fase líquida, a la cual habían migrado los anticuerpos, realizando la adsorción de los mismos siguiendo la técnica descrita anteriormente.

Las Ig obtenidas fueron llevadas a una concentración de 2,5 a 3 mg . ml⁻¹, por lectura espectrofotométrica a 280 nm, e identificadas mediante inmuno-electroforesis⁽⁴³⁾ en gel de agar al 1,25 en tampón veronal pH 8,6 fuerza iónica 0,05 (veronal = 3,41 g veronal sódico = 18,95 g.; agua destilada = 1 l.).

Las muestras corridas electroforéticamente, durante 1,5- hs a 250 V, fueron:

- Las Ig aisladas de suero.
- Las Ig aisladas de mucus vaginal.
- Suero normal bovino.
- Ig G₁ bovina. (Obtenida en el laboratorio por cromatografía de intercambio iónico).

Posteriormente se realizó la inmunoprecipitación con suero de conejo anti-gamma bovina (suero de Coombs) y suero de cobayo anti-Ig G₁ incubando a temperatura ambiente durante 24 hs. Tras la precipitación y lavado, las bandas fueron coloreadas con negro amido para una correcta interpretación e identificación de las mismas.

R E S U L T A D O S

El suero de cobayo anti-T. foetus (G.P.003) demostró títulos aglutinantes con antígeno (Ag) vivo, hasta 1/64. El mismo suero enfrentado con Ag formolado, dió indicios de aglutinación hasta la dilución 1/4.

Los distintos homogeneizados de T. foetus, enfrentados con el suero de cobayo G.P.003, mediante la técnica de Ouchterlony, dieron resultados diferentes. Los identificados como IIb, IIIc, IV y V, presentaron bandas difusas de fácil reabsorción. En cambio el sonicado VI, fue considerado óptimo para el ensayo de inmunodifusión, por presentar 3 diferentes bandas en el pocillo correspondiente al Ag puro, y una sola, en dilución 1/8 (Figura N° 1). Dicho homogeneizado, también fue utilizado para las pruebas de hemaglutinación y blastogénesis.

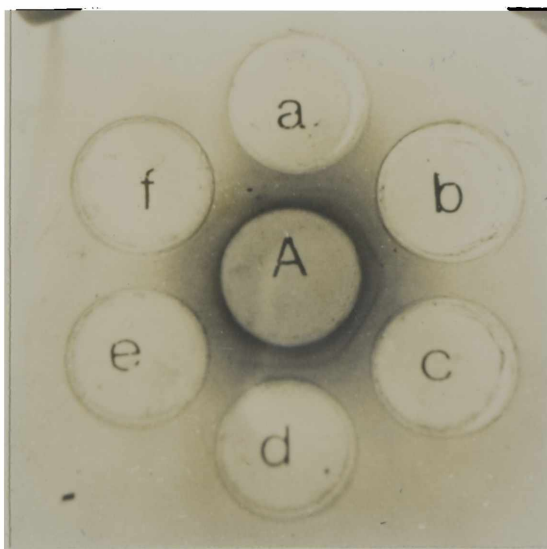


Figura N° 1: Inmunodifusión en gel de agar, enfrentando suero de cobayo anti-T. foetus y antígeno soluble del protozoario.

A: suero de cobayo anti-T. foetus; a: homogeneizado VI puro; b: homogeneizado VI 1/2; c: homogeneizado VI 1/4; d: homogeneizado VI 1/8; e: homogeneizado VI 1/16; f: homogeneizado VI 1/32.

Los resultados microbiológicos e inmunológicos obtenidos con el lote A, durante las 53 semanas de experimentación, se muestran en el cuadro N° 1.

A través de la técnica de microaglutinación serológica,

se obtuvieron títulos aglutinantes iniciales de 1/32 en las 3 vaquillonas, alcanzando un nivel máximo de 1/512 alrededor de las 11 semanas post-infección, descendiendo posteriormente a niveles mínimos a partir de la semana 24, logrando respuesta, como consecuencia de reinfecciones experimentales subsiguientes (Gráfico N° 1).

La prueba de hemaglutinación, detectó títulos diferentes e irregulares, con respecto a la microaglutinación serológica, durante el seguimiento experimental, tal como se muestra en el cuadro N° 1 y gráfico N° 2. No obstante, se alcanza a detectar en uno de los animales (Vaq. 37) un aumento en la curva de Ac, entre las semanas 10 y 18, post-infección.

Mediante el ensayo de mucoaglutinación se detectaron Ac-aglutinantes en los exudados genitales a partir de la novena semana, permaneciendo en algunos animales hasta la vigésima cuarta semana; volviendo a aparecer posteriormente con las 2 reinfecciones-realizadas (Ver parte inferior del gráfico N° 1).

Con respecto a la determinación de inmunidad celular, mediante la prueba de blastogénesis, se obtuvieron resultados que oscilaron entre un 3 a 8 % de linfoblastos en las 3 vaquillonas, en los muestreos correspondientes a las semanas 9, 18, 24 y 29 post-infección.

Los resultados obtenidos por cultivo, para aislamiento del protozoario, fueron diferentes en las 3 vaquillonas, encontrándose en pocos muestreos, correlación directa con la observación microscópica de la muestra previa al cultivo.

La prueba intradérmica se realizó en las semanas 20 y 53 del período experimental. Los resultados numéricos expresados en el cuadro N° 1, se obtuvieron tomando la medida en mm de la pápula inicial, originada en el pliegue ano caudal (pac.) y en la tabla del cuello (tc), dividiendo por los mm de la pápula a los 60 minutos post-inoculación.

Por ejemplo: la vaquillona N° 36, tuvo una pápula inicial de 4 mm en el pac, llegando a 12 mm al término de 60 minutos. El valor expresado en el cuadro N° 1 para esta respuesta es "3", que es la cantidad de veces que aumentó de tamaño la pápula en el tiempo expresado.

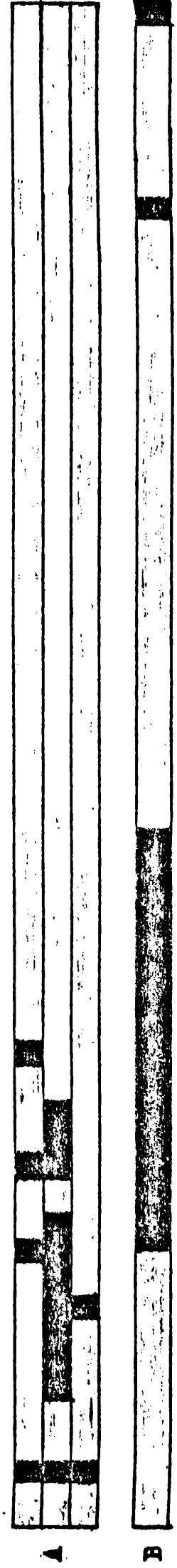
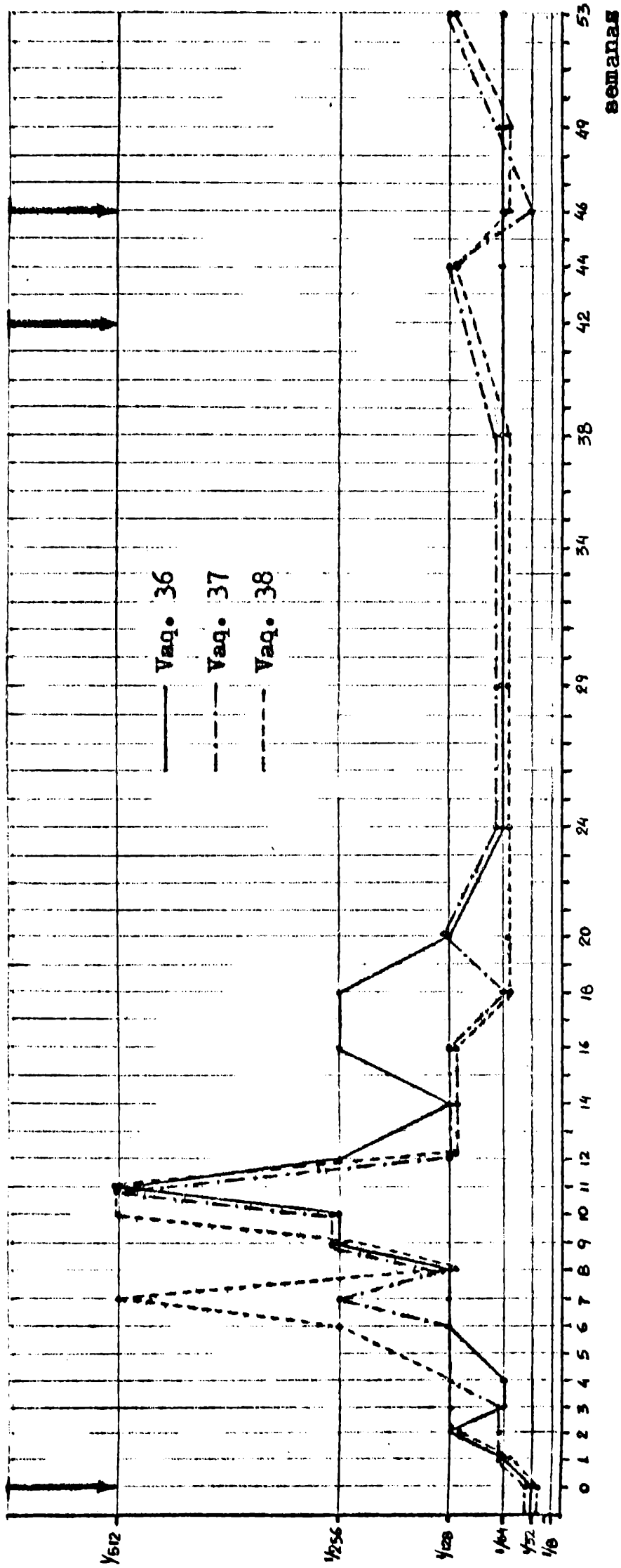
Cuadro N° 1: Seguimiento microbiológico e inmunológico de vag. infectadas experimentalmente con T. foetus (Lote A)

SEMA- NAS.	ETAPAS del EXPERIM.	OBSER. DIRECTA			CULTIVO			SERO-AGLUT.			MUCO-AGLUT.			INMUNODIFUSION			HEMAGLUTINACION			BLASTOGENESIS			PRUEBA CUTANEA		
		36	37	38	36	37	38	36	37	38	36	37	38	36	37	38	36	37	38	36	37	38	36	37	38
	PRE-INFEC.	-	-	-	-	-	-	1/32	1/32	-	-	-	-	-	-	1/512	1/8	1/64							
0	INFECCION	/																							
1	1º Muestra	+	+	+	+	+	+	1/64	1/64	-	-	-	-	-	-	1/256	1/32	1/256							
2	"	+	+	+	-	-	-	1/128	1/64	1/128	-	-	-	-	-	1/256	1/64	1/128							
3	"	-	+	+	-	-	-	1/64	1/64	1/128	-	-	-	-	-	1/128	1/128	1/128							
4	"	-	+	+	-	-	-	1/64	1/128	1/128	-	-	-	-	-	1/256	1/128	1/256							
6	"	-	+	+	-	-	-	1/128	1/128	1/256	-	-	-	-	-	1/256	1/256	1/128							
7	"	-	+	+	-	-	-	1/128	1/256	1/512	-	-	-	-	-	1/256	1/128	1/256							
8	"	-	+	+	-	-	-	1/128	1/128	1/128	-	-	-	-	-	1/128	1/32	1/128							
9	"	-	+	+	-	-	-	1/256	1/256	1/256	+	+	-	-	-	1/128	1/64	1/256	5%	4%	3%				
10	"	-	+	+	-	-	-	1/256	1/256	1/512	-	-	-	-	-	1/512	1/32	1/128							
11	"	-	+	+	-	-	-	1/512	1/512	1/512	-	-	-	-	-	1/512	1/256	1/256							
12	"	-	+	+	-	-	-	1/256	1/128	1/128	+	+	-	-	-	1/64	1/1024	1/128							
14	"	-	+	+	-	-	-	1/128	1/128	1/128	-	-	-	-	-	1/128	1/1024	1/64							
16	"	-	-	-	-	-	-	1/256	1/128	1/128	+	-	-	-	-	1/64	1/1024	1/64							
18	"	-	-	-	-	-	-	1/256	1/64	1/64	-	-	-	-	-	1/256	1/64	1/128	8%	8%	3%				
20	"	-	-	-	-	-	-	1/128	1/128	1/64	-	-	-	-	-	1/256	1/32	1/128							
24	"	-	-	-	-	-	-	1/64	1/64	1/64	-	-	-	-	-	1/256	1/64	1/128	5%	3,1%	3%				
29	"	-	-	-	-	-	-	1/64	1/64	1/64	-	-	-	-	-	1/512	1/128	1/256	6%	5%	4%				
38	"	-	-	-	-	-	-	1/64	1/64	1/64	-	-	-	-	-	1/256	1/128	1/256							
42	REINFECC.	/																							
44	19º Muest.	-	-	-	-	-	-	1/64	1/128	1/128	-	-	-	-	-	1/128	1/64	1/256							
46	REINFECC.	/																							
46	20º Muest.	-	-	-	-	-	-	1/64	1/32	1/64	-	-	-	-	-	1/256	1/64	1/256							
49	"	-	-	-	-	-	-	1/64	1/64	1/64	-	-	-	-	-	1/16	1/16	1/32							
53	22º "	-	-	-	-	-	-	1/64	1/128	1/128	4/2	1/4	1/2	1/2	1/2	1/32	1/16	1/32							

infección

reinfección

Título de Ao.



A - [shaded bar]: Períodos con cultivo positivos

B - [shaded bar]: Períodos con Prueba de Mucocultivación vaginal positivos.

Gráfico N° 1: Comparación entre la evolución del título de anticuerpos aglutinantes en el suero de vaquillas infectadas experimentalmente con T. foetus, y el diagnóstico por cultivo y mucocultivación vaginal (lote A).

La respuesta intradérmica se mantuvo hasta 1,5 a 2 horas, desapareciendo gradualmente después de las 3 horas post-inoculación, no observándose respuesta alguna después de las 48 hs.

La pápula originada por la inoculación de SFT estéril, se reabsorbió en todos los casos en 10 minutos.

Los resultados microbiológicos e inmunológicos correspondientes al lote B, en su único muestreo, se expresan en el cuadro N° 2. La observación microscópica de la muestra y el cultivo de la misma dieron resultados negativos.

Los títulos de Ac aglutinantes en suero, obtenidos mediante la técnica de microaglutinación y hemaglutinación, fueron diferentes para las 11 vaquillonas, variando en un rango de 1/64 hasta 1/512 y 1/8 hasta 1/32 respectivamente.

El ensayo de mucoaglutinación, dió resultados positivos, solamente en 3 animales del lote.

Las observaciones de la prueba intradérmica, se realizaron dentro de los 60 minutos post-inoculación, expresando en el cuadro correspondiente un valor numérico, de acuerdo a lo explicado anteriormente con el lote A.

Con los animales del lote C, mantenidos en experimentación durante 16 semanas, se obtuvieron los resultados correspondientes al cuadro N° 3.

La observación microscópica directa de la muestra dió resultados positivos en sólo 3 oportunidades para uno de los toros (T. 9) y en una para el otro (T. 8). En cambio los cultivos fueron positivos en forma regular para ambos animales, post-infección.

Mediante la prueba de microaglutinación serológica, se lograron títulos iniciales de 1/32, llegando al final de la experiencia a 1/128; observándose en el gráfico N° 3, un leve incremento en la curva de Ac, a partir de la novena semana post-infección.

Con el ensayo de hemaglutinación, se obtuvieron títulos aglutinantes bajos durante las 16 semanas, tal como se expresa en el cuadro N° 3 y gráfico N° 4.

Cuadro N° 2: Pruebas diagnósticas efectuadas sobre un lote de vaquillonas con in-
fertilidad (Lote B).

N° del animal	Observación directa	Cultivo	Sero-agl.	Muco-agl.	Immodif.	Hemaglut.	Prueba cutánea
2427	-	-	1/512	-	-	1/32	Pac. 1 Tc. 1,66
2758	-	-	1/128	+	-	1/16	Pac. 1,66 Tc. 2,22
2375	-	-	1/256	+	-	1/16	Pac. 1,62 Tc. 1,72
2784	-	-	1/128	-	-	1/16	Pac. 1,9 Tc. 1,44
2763	-	-	1/128	+	-	1/16	Pac. 0,33 Tc. 1,1
s/o	-	-	1/256	-	-	1/16	Pac. 1,83 Tc. 1,62
2765	-	-	1/128	-	-	1/32	Pac. 1,66 Tc. 1,4
2435	-	-	1/256	-	-	1/32	Pac. 2,14 Tc. 2,22
2773	-	-	1/64	-	-	1/8	Pac. 1,85 Tc. 1,77
2757	-	-	1/128	-	-	1/32	Pac. 1,7 Tc. 1,27
2366	-	-	1/64	-	-	1/8	Pac. 1,37 Tc. 1,44

Cuadro N° 3: Seguimiento microbiológico e inmunológico de toros infectados experimentalmente con T. foetus (Lote C).

Sema nas	Etapa del exp.	Obs. direc		Cultivo		Sero-agl.		Agl.-Prep		Inmunodif		Hemaglut		Elastog.		Prueba cu	
		T.8	T.9	T.8	T.9	T.8	T.9	T.8	T.9	T.8	T.9	T.8	T.9	T.8	T.9	T.8	T.9
	Pre-inf.	-	-	-	-	1/32	1/32	-	-	-	-	1/16	1/32				
0	Infección																
2	1° Muest.	-	-	-	+	1/32	1/32	-	-	-	-	1/8	1/16				
3	Reinfec.																
5	2° Muest.	-	-	+	+	1/64	1/32	-	-	-	-	1/8	1/16				
7	3° "	+	+	+	+	1/64	1/32	-	-	-	-	1/4	1/16	3%	8,5%		
9	4° "	-	-	+	+	1/64	1/64	-	-	-	-	1/8	1/32				
11	5° "	-	-	+	+	1/28	1/28	-	-	-	-	1/16	1/16			Pac: 1,4	Pac: 1,28
13	6° "	-	+	+	+	1/28	1/28	-	-	-	-	1/32	1/32	2,3%	3%		
16	7° "	-	+	+	+	1/28	1/28	-	-	-	-	1/16	1/64	2,3%	2%		

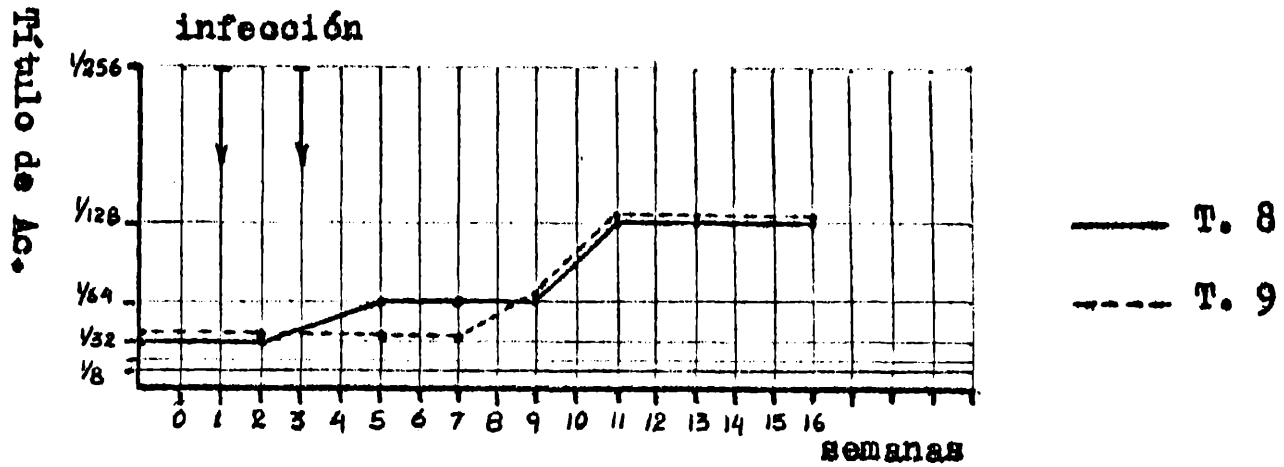


Gráfico N° 3: Variación del título de anticuerpos aglutinantes en suero de toros infectados con T.foetus (Lote C).

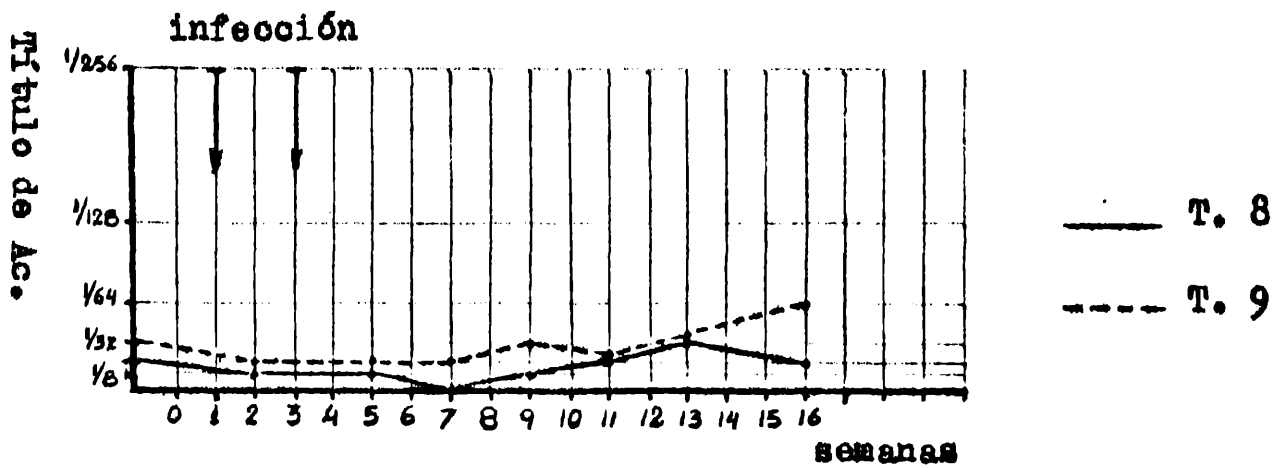


Gráfico N° 4: Títulos de anticuerpos determinados por hemaglutinación pasiva, a partir del suero de toros infectados con T. foetus (Lote C).

En las semanas 7, 13 y 16 post-infección, se realizaron las pruebas de blastogénesis para determinar la inmunidad celular, obteniendo 2,3 a 3 % de linfoblastos para el T. 8 y entre 2 a 8,5% para el T. 9.

La reacción intradérmica, se efectuó en la semana 11, momento en el cual se detectó un incremento en el nivel de Ac en suero, obteniendo un valor numérico, en relación al incremento de la pápula, de 1,4 para el T. 8 y 1,28 para el T. 9.

Tres de los cuatro toros del lote D, muestreados por única vez, fueron positivos a la observación microscópica directa y al cultivo de las muestras, obtenidas de la cavidad prepucial (ver cuadro N° 4).

Los títulos aglutinantes en suero fueron similares para los cuatro animales, mediante la técnica de microaglutinación; lográndose en cambio, resultados diferentes a través de la hemaglutinación.

El ensayo intradérmico, realizado en el pliegue ano caudal (pac) expresó al término de 60 minutos, un valor numérico que osciló entre 0,83 a 1,85.

Cuadro N° 4: Pruebas diagnósticas efectuadas en toros pertenecientes a un rodeo con problemas de fertilidad (Lote D).

Ident. anim.	Observ. directa	Cultivo	Sero-agl.	Aglut. Prepuc.	Inmunod.	Hemaglut.	Prueba intradérm.
T.1	+	+	1/128	-	-	1/8	Pac. 0,83
T.13	+	+	1/128	-	-	1/32	Pac. 1,85
T.50	+	+	1/128	-	-	1/16	Pac. 1,5
T.2138	-	-	1/128	-	-	1/32	Pac. 1,33

Con el lote E considerado lote control negativo, se obtuvieron los resultados que se encuentran resumidos en el cuadro N°5

La observación microscópica directa, cultivo y mucoaglutinación, fueron negativos, El nivel de Ac en suero mediante la técnica de microaglutinación y hemaglutinación, expresaron niveles entre 1/32 a 1/64 y 1/8 a 1/16 respectivamente, para las vaquillonas de este lote. En los terneros se observaron resultados similares en el primero de los ensayos y títulos entre 1/2 a 1/16 mediante la hemaglutinación.

La prueba intradérmica, se observó al término de los 60 minutos, obteniendo valores numéricos en las vaquillonas entre 1,71 a 1,85 en el pac, y entre 1,44 a 2,09 en la tc. En los terneros, el incremento de la pápula varió entre 0,85 a 1,28 en el pac y 0,70 a 1,16 en la tc.

Cuadro N° 5: Pruebas diagnósticas efectuadas en animales libres de Trichomoniasis (Lote E).

Ident. anim.	Observ. directa	Cultivo	Sero-agl.	Muco-agl.	Inmunod.	Hemaglut.	Prueba intradérm.
V.HB	-	-	1/64	-	-	1/8	Pac. 1,75 Tc. 2,09
V.005	-	-	1/64	-	-	1/16	Pac. 1,71 Tc. 1,44
V.HNFB	-	-	1/32	-	-	1/8	Pac. 1,85 Tc. 2
T.020	-	-	1/32		-	1/8	Pac. 1,28 Tc. 1,16
T.019	-	-	1/64		-	1/16	Pac. 0,85 Tc. 0,70
T.022	-	-	1/16		-	1/2	Pac. 1,05 Tc. 0,83

En el gráfico N° 5, podemos comparar todos los resultados del ensayo intradérmico realizado en los 5 lotes (A, B, C, D y E).

Como valor promedio en el pac, obtuvimos un incremento de la pápula a los 60 minutos de:

- 2,50 veces para el Lote A.
- 1,56 " " " " B.
- 1,34 " " " " C.

geneizado VI, diluído 1/8.

Los Ac obtenidos por inmunoadsorción y disociación, a partir del suero de las vaquillonas correspondientes al lote A, en el momento de máximo título aglutinante, fueron corridos electroforéticamente e identificados como pertenecientes a la subclase IgG₂, de acuerdo a la movilidad electroforética, y mediante el empleo de suero monoespecífico para la inmunoprecipitación (ver figura N° 2).



Figura N° 2: Inmunolectroforesis en gel de agar

- a) Ac inmunoadsorbidos por T. foetus: IgG₂.
- b) Suero normal bovino.
- A) Suero de conejo anti-gamma bovina.

Los Ac obtenidos a partir de mucos vaginal, demostraron corresponder a la subclase IgG₁ (ver figura N° 3).



Figura N° 3: Inmunoelectroforesis en gel de agar

c) Ac inmuoadsorbidos por T. foetus, de moco vaginal = -
IgG₁.

a) Ac inmuoadsorbidos de moco vaginal, más IgG₁ bovina -
(relación de concentración 3/1).

b) IgG₁ bovina diluída 1/2.

A y B = Suero de conejo anti-gamma bovina.

DISCUSION

El análisis de los resultados obtenidos con las 3 vaquillonas del lote A, nos permite observar que la respuesta inmune -- presenta variables importantes de tener en cuenta.

Se detectan en los animales títulos aglutinantes iniciales en suero de 1/32, similares al lote control negativo (lote E) -- que oscilaron entre 1/16 a 1/64; coincidiendo con otros autores -- que encuentran Ac naturales contra T. foetus en diversas especies-animales. Schneider⁽⁴⁴⁾ y Morgan⁽³³⁾, observan títulos de Ac altos en equinos hasta 1/1.024; Endress⁽¹²⁾ en 1939, halló en pollos títulos de Ac anti-T. foetus de 1/8. En cuanto al suero bovino se han encontrado Ac aglutinantes de 1/25 (Endress⁽¹²⁾) hasta 1/128 -- (Morgan⁽³³⁾). Kerr y Robertson⁽²⁴⁾ concluyen que T. foetus es aglutinada por suero normal bovino con títulos entre 1/48 a 1/96. Nuestros datos coinciden con estos últimos, aceptando títulos iniciales no significativos de hasta 1/64, que probablemente se deba a la presencia de antígenos en común de la membrana celular de T. foetus, con otros protozoarios y Trichomonas spp. saprófitas que habitan en el tracto digestivo de los bovinos.

Kerr⁽²¹⁾ y Honigber⁽¹⁷⁾, hallaron títulos de Ac aglutinantes elevados, por encima de 1/2000, en aquellos animales que habían abortado o estaban con piómetra. En nuestro trabajo experimental el incremento de Ac aglutinantes en suero fue detectado a partir de la cuarta semana post-infección, mediante la técnica de microaglutinación, alcanzando un nivel máximo de 1/512 entre la 6ª y 12ª semana (gráfico N° 1). Posteriormente a este pico de Ac originado por la adsorción de Ag a partir del útero (tal como lo demostraron Kerr y Robertson⁽²³⁾, instilando en el útero Ag desecados de T. foetus) se observa la desaparición de los protozoarios a la observación directa y en cultivo, de los exudados vaginales.

En forma paralela, se detectó a partir de la 9ª semana, la aparición de Ac en moco vaginal, coincidiendo con el nivel máximo de Ac aglutinantes en suero, permaneciendo hasta la semana 24 -- post-infección, siendo detectados nuevamente cada vez que el nivel de Ac en suero realizó un pico de ascenso como consecuencia de las

2 reinfecciones experimentales que se realizaron en las semanas 42 y 46 de la etapa experimental (ver gráfico N° 1).

Si bien los Ac en mucus vaginal, son detectados a partir de la 9ª semana, las observaciones microscópicas de los exudados genitales nos permiten detectar la aparición de Ac desde la 2ª semana post-infección, debido a la presencia de protozoarios aglutinados en el mucus (ver observación directa, cuadro 1: + A), comenzando a partir de ese momento el ascenso de la curva de Ac en suero. Este análisis, nos permite aseverar que la absorción de Ag a partir de los genitales, originando una respuesta serológica detectable, con la aparición de Ac en útero y vagina son hechos inmunológicamente correlacionados y no fenómenos independientes tal como postula Pierre⁽³⁶⁾ y otros autores citados en su trabajo (Kerr⁽²²⁾)

Como consecuencia de esta respuesta inmune, las 3 vaquillonas del lote A, infectadas experimentalmente, lograron liberarse de los protozoarios, que habían sido observados microscópicamente y recuperados por cultivo a partir de la 1ª hasta la 16ª semana del período experimental, no coincidiendo con los datos obtenidos por Pierre⁽³⁵⁾, que observa T. foetus desde el día 29 post-infección hasta el día 90.

El seguimiento de la respuesta humoral, mediante la técnica de hemaglutinación, no nos aportó datos comparables con la microaglutinación, observando solamente en un animal (Vaq. 37 del lote A), una respuesta importante entre la semana 12 y 16, llegando a títulos de 1/1.024. (gráfico N° 2). Coincidentemente este animal es el que estuvo durante más tiempo en contacto con la T. foetus, tal como se demuestra con los resultados obtenidos mediante el cultivo y observación directa de los exudados genitales (cuadro N° 1). No obstante, consideramos que no fueron satisfactorios debido a que, observando los demás lotes analizados, los resultados no aportaron mayores datos. (cuadros N° 2, 3, 4 y 5).

Los antígenos de T. foetus adheridos a los GRC, para el ensayo de hemaglutinación, provenían de un sonicado (homogeneizado VI), en el cual se encuentran antígenos de membrana citoplasmática, flagelo y citoplasma con todas sus organelas. Creemos que este punto debe ser investigado con más detalle, debido a que probablemen-

te se hayan adherido a los GRC, pocos Ag de superficie del protozoario, que serían los primeros en ser reconocidos por los animales infectados. Esta hipótesis nuestra, parte del análisis de los resultados obtenidos por la prueba de inmunodifusión, en la cual se utilizó un sonicado de T. foetus (homogeneizado VI), no detectando Ac precipitantes en ningún momento de la fase experimental. (cuadros N° 1, 2, 3, 4 y 5). En cambio, este ensayo dió resultados positivos con el suero de cobayo anti-T. foetus. Dicho animal había sido inoculado por vía intramuscular con protozoarios muertos y adyuvante completo de Freund, presentándole la totalidad de los antígenos durante un período prolongado y en cantidad excesiva.

La inmunidad celular, medida mediante la prueba de blastogénesis, aportó resultados que oscilan entre un 3 a 8 % de linfoblastos, no pudiendo comparar estos porcentajes con resultados de otros autores, dejando por lo tanto interrogantes para nuevas líneas de investigación.

Los Ac inmuoadsorbidos del suero, de las vaquillonas -- del lote A, fueron identificados como pertenecientes a la subclase IgG₂ en forma predominante; si bien se detectan en la corrida electroforética, vestigios de IgG₁ e IgA. No podemos dilucidar la función específica de la IgG₂, debido a que no se ha podido comprobar una parasitemia, y que dicha Ig no ha sido detectada en los exudados uterinos o vaginales.

A partir del mucus, obtenido en la zona cérvico-vaginal, se pudo demostrar la presencia de IgG₁, que aparece por transudación y por síntesis local. Dicha Ig, tiene una función opsonizante en la fagocitosis⁽²⁸⁾, por neutrófilos y mononucleares, considerándola como responsable de la eliminación de los protozoarios del útero.

No hemos podido demostrar la presencia de IgA en mucus vaginal, la cual, creemos que debe estar presente, tal como lo demuestran otros autores en enfermedades similares como la campylobacteriosis genital bovina. Williams y Gibbon⁽⁵³⁾, demostraron que la IgA inhibe la adherencia de Campylobacter fetus, facilitando la eliminación, particularmente durante el estro. Corbeil y col.⁽⁸⁾, revelaron que en animales convalecientes, la Ig G predomina en se-

crecencias uterinas, mientras que la IgA son encontradas en secreciones vaginales. Corbeil y Winter⁽⁹⁾ observan que la IgA no es buena opsonizante, e inmoviliza el *Campylobacter fetus* sobre la superficie cérvico-vaginal, impidiendo la entrada al útero y penetración de la mucosa, facilitando el estado de portador.

Los Ac inmunoadsorbidos a partir de moco cérvico-vaginal debieron ser concentrados con polietilenglycol, para poder alcanzar una concentración de proteínas de $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (medidas por espectrofotometría a 280 nm). No obstante, dicha concentración estuvo por debajo de los niveles óptimos ($3 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$), debiendo realizar en el gel de corrida electroforética, un pocillo de mayor tamaño para obtener una siembra más voluminosa.

La reacción intradérmica, originada por la inoculación de un sonicado de *T. foetus* (homogeneizado VI) en el pac y tc, nos permitió observar un aumento de la pápula, varias veces superior al tamaño inicial. La medición, realizada con un calibre, marcó reacciones diferentes en todos los lotes analizados (ver gráfico N° 5). Esta sensibilidad cutánea, se pone de manifiesto dentro de los 30 minutos, alcanzando su pico máximo a los 60 minutos y desapareciendo luego de 2 a 3 horas. Las reacciones obtenidas fueron expresadas con un valor numérico, que indica la cantidad de veces que se incrementó la pápula a los 60 minutos post-inoculación,

La comparación de los resultados entre los lotes A y E, se hizo teniendo en cuenta el valor promedio en cada uno de ellos. De esta manera, tenemos para el lote A (infectado experimentalmente) un incremento promedio de la pápula en el pac de 2,5 veces y para el lote E (control negativo) 1,41.

Trazando una línea horizontal en el Gráfico N° 5, correspondiente al valor promedio del lote E (1,41), marcamos el nivel mínimo significativo para considerar una reacción cutánea positiva. De esta manera tenemos una dispersión de incrementos positivos, correspondiente al lote A, del 100 % por encima del nivel mínimo. Idéntico análisis, se hizo con los resultados obtenidos en la tabla del cuello, estando el incremento promedio del lote E, en 1,37; manteniéndose la misma dispersión con el lote A. Mediante dicho a-

nálisis, podemos observar, que existe una diferencia entre el incremento de la pápula de los animales infectados, y los animales -- del lote control negativo.

Nuestros resultados son similares a los de otros autores, como Feinberg and Morgan⁽¹³⁾, que obtienen una sustancia identificada como un polisacárido y un aminoácido, que induce una reacción en piel de vacas inmunizadas artificialmente con T. foetus.

Kerr⁽¹⁸⁾, ensayó la prueba intradérmica con una sustancia de T. foetus, obtenida por precipitación con ácido tricloroacético y consideró que un incremento de 2 mm. de la pápula, significaba una reacción positiva. Nuestros resultados, con respecto al aumento de tamaño de la pápula, no coinciden con los de Kerr, lo que probablemente se deba al origen del Ag utilizado, puesto que dicho autor utilizó un precipitado proteico del citoplasma del protozoario, a diferencia del utilizado por nosotros que estaba compuesto por Ag de membrana citoplasmática, flagelos y citoplasma -- del protozoario.

El lote B, estaba compuesto por vaquillonas sin gestación, después del período de servicio con un grupo de toros en el cual, algunos de ellos eran portadores de la T. foetus. Teniendo en cuenta estos antecedentes y los resultados expresados en el cuadro N° 2, podemos afirmar que el problema reproductivo del rodeo, se debía a la presencia de dicho protozoario. No obstante, este diagnóstico requiere un análisis más exhaustivo, para una mayor comprensión. Si bien los cultivos y la observación directa fueron negativos en todos los animales del lote B, vemos que muchos de ellos tenían Ac aglutinantes en suero, por encima de los considerados como títulos basales (1/64). Tres de las 11 vaquillonas presentaron Ac anti-T. foetus en el moco cérvico-vaginal. Este ensayo de muco-aglutinación es considerado por varios autores como un diagnóstico de rodeo, no individual, debido a que en el 50 % aproximadamente de las hembras infectadas se detectan aglutininas en los exudados genitales (Pierce⁽³⁷⁾).

La vaquillona identificada con el N° 2435, había abortado aproximadamente 2 a 3 semanas antes del muestreo, encontrando --

un nivel de Ac aglutinantes en suero de 1/256. La respuesta intradérmica en este animal, presentó un incremento de la pápula de --- 2,14 veces en el pac. y 2,22 en la tc, superando en ambos casos, - el valor promedio considerado como incremento mínimo significativo (ver gráfico N° 5). En base a este análisis, tenemos 8 vaquillonas (72,7 %) con reacción cutánea positiva en el pac. y 9 (81,8 %) en la tc.

En el lote de toros infectados experimentalmente (lote - C), se observa que la aparición de Ac aglutinantes en suero es lenta no alcanzando títulos elevados como en las vaquillonas. (gráficos N° 3 y 4). Esta escasa respuesta, que permite a los animales - mantener a los protozoarios en la cavidad prepucial, probablemente se deba a la poca absorción de Ag a través del epitelio de dicha - cavidad.

Los títulos de Ac obtenidos con los animales del lote D - (toros infectados naturalmente), coinciden con los niveles máximos del lote C.

La respuesta intradérmica, en los toros de ambos Lotes - (C y D), fue menor que en las hembras; no coincidiendo con los datos de Kerr⁽²¹⁾, que obtuvo incrementos en la pápula intradérmica - de varios mm.

Los dos toros del lote C (T.8 y T.9), presentaron un aumento de la pápula en el pliegue ano caudal, por debajo del valor - medio (1,41), considerado como nivel mínimo de este ensayo.

Dos de los 4 toros del lote D, presentaron una reacción - cutánea positiva, en base al análisis del gráfico N° 5.

La inmunidad celular, en los toros del lote C, fue inferior a la obtenida con las vaquillonas, encontrando en la mayoría - de las observaciones entre un 2 a 3 % de linfoblastos, hallando en una sola oportunidad un 8,5 % . (cuadro N° 3).

La escasa absorción de Ag a partir de la mucosa prepu--- cial, debido a la localización superficial del protozoario, sería - la responsable de que la respuesta inmunológica no alcance niveles significativos, permitiendo que los toros sean portadores de la -- T. foetus, ya que en ningún momento de la fase experimental, se de

tectaron Ac aglutinantes en el esmegma prepucial.

Si bien hay autores que mencionan que toros de corta edad se recuperan espontáneamente de la condición de portadores de enfermedades venéreas como trichomoniasis y campylobacteriosis --- (Clark^(5, 6) y Soto⁽⁴⁶⁾), en ninguno de los trabajos citados, figura el hallazgo de Ac en las secreciones prepuciales. Creemos que la probabilidad de recuperación espontánea, se debe al escaso grosor del epitelio prepucial y mucosa peniana en los toros jóvenes, originándose con mayor facilidad una respuesta inflamatoria, permitiendo de esta forma una mejor absorción de Ag de T. foetus con -- trasudación posterior de Ac a dicha cavidad.

C O N C L U S I O N E S

Los resultados obtenidos a partir de la infección experimental con T. foetus, de vaquillonas vírgenes sexualmente maduras y de toros adultos, nos permiten realizar las siguientes conclusiones:

- 1) Existe una respuesta inmunológica en las hembras, produciendo un pico de Ig séricas entre la 6ª y 12ª semana post-infección. Una vez alcanzado el nivel máximo en suero, comienzan a detectarse aglutininas en mucus cérvico-vaginal a partir de la 9ª -- hasta la 24ª semana post-infección; volviendo a evidenciarse cada vez que los niveles de Ac séricos hicieron un pico de ascenso, como consecuencia de reinfecciones experimentales en las semanas 42 y 46.
- 2) La aparición de Ac en exudados genitales, es anterior al período de detección por el ensayo de mucoaglutinación, debido a las observaciones de T. foetus aglutinadas en mucus vaginal a partir de la 2ª semana post-infección.
- 3) Las Ig aisladas e identificadas en esta respuesta inmune fueron: IgG₂ y vestigios de IgG₁ e IgA en suero; e IgG₁ en mucus cérvico-vaginal.
- 4) Se comprobó una respuesta intradérmica con formación de pápula, alcanzando su máximo tamaño entre los 30 a 60 minutos, post-inoculación con un sonicado de T. foetus en el pliegue ano-caudal y tabla del cuello.
- 5) El cultivo del protozooario, la observación microscópica del mucus vaginal y el ensayo de mucoaglutinación es considerado de gran valor diagnóstico.
- 6) La eliminación definitiva de los protozoarios, se produce a partir de la semana 16 post-infección. Este período debe tenerse en cuenta en el manejo de un rodeo, dando a la hembra infectada un descanso sexual de 4 meses.
- 7) La respuesta inmune en toros, es menos evidente que en la hembra, detectándose escaso nivel de Ac aglutinantes en suero, pe-

ro sin aparición de Ac en secreción prepucial; conservando los animales el estado de portador de la T. foetus.

8) La respuesta intradérmica en los toros, es considerada de poco valor, al comparar el incremento de la pápula originada en las vaquillonas.

9) El aislamiento del protozoario por cultivo a partir de la secreción prepucial, es considerado de gran valor diagnóstico, debido a que nos permitió observar claramente el estado de portador en todos los muestreos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- ACKERS, J. P.; LUMSDEN, W. H. R.; CATTERALL, R. D., and COYLE, R. Antitrichomonas antibody in the vaginal secretions of women infected with Trichomonas vaginalis. Brith. J. Vener. Dis. 51: 319 (1975).
- 2.- ALDERETE, J. F. Enzyme linked immunosorbent assay for detecting antibody to Trichomonas vaginalis. Br. J. Vener. Dis., - 60: 164-170. (1984).
- 3.- ANDREWS, MILLER y RES. Journ. Parasit., 21: 429. (1935).
- 4.- CAMPBELL, D. H.; GARVEY, J. S.; CREMER, N. E., and SUSSADORF, D. H. Methods in immunology. W. A. Benjamin, Inc., New York, - (1964).
- 5.- CLARK, B. L. A review of vibriosis bovine. Aust. Vet. J., 47: 103-107, (1971).
- 6.- CLARK, B. L.; PARSONSON, I.M. and DUFTY, J. H.; Infection of bulls with Tritrichomonas foetus through mating with infected heifers. Aust. Vet. J., 50 (4): 180, (1974).
- 7.- CLARK, B. L.; DUFTY, J. H., and PARSONSON, M. Immunisation of bulls against Trichomoniasis. Aust. Vet. Jour., 60 (6): 178, - (1983).
- 8.- CORBEIL, L. B.; DUNCAN, J. R.; SCHURIG, G. G. D.; HALL, C. E. and WINTER, A. J. Bovine venereal vibriosis: variations in -- immunoglobulin class of antibodies in genital secretions and serum. Infect. Immun., 10: 1084-1090, (1974).
- 9.- CORBEIL, L. B. and WINTER, A. J. Animal model for the study - of genital secretory immune mechanisms: venereal vibriosis in cattle. In "Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae". Edited by

G. F. Brooks et. al. Am. Soc. Microbiol, Washington, (1978).

- 10.- COX, F. E. Immunity to tissue Protozoa. Sixth Symp. British-Sco. for Paras. (1968).
- 11.- DUNCAN, J. R.; WILKIE, B. N.; HESTAND, F. and WINTER, A. J.- The serum and secretory immunoglobulins of cattle: characterization and quantitation, J. Immunology, 108 (4): 965-976, --- (1972).
- 12.- ENDRESS, R. Verwertbarkeit der komplementbindungs reaction, der Agglomeration und der Trichomolyse für die Erkennung der Trichomonas deninfektion des Rindes. Arch. Tierkeilk, 75: 65-82, - (1939).
- 13.- FEINBERG, J. G.; and MORGAN, W. T. J. The isolation of a specific substance and a Glycogen. Like polysaccharide from Trichomonas foetus (var. Manley). Brit. J. Exp. Pathol., 34: 104-118, (1953).
- 14.- GELORMINI, N. Inst. Parasitol. y Enf. Parasitol. Univ. de Bs. As. 1: 5-16 (1940).
- 15.- HABICH, G. E.; BROADBENT, D. W.; NOGUES, E. M.; SPATH, E. J.- A.; GUGLIELMONE, A. A.; GONZALES de RIOS, L. ; Estudios sobre sanidad animal en el Noroeste Argentino (Parte I); Gac. Vet., 326: 647-656 (1977).
- 16.- HABICH, G. E.; SPATH, E. J. A.; BROADBENT, D. W.; GONZALES de RIOS, L.; GUGLIELMONE, A. A.; Estudios sobre sanidad animal - en el noroeste Argentino (parte II); Gac. Vet., 329: 197-207, (1978).
- 17.- HONIGBERG, B. M. Immunity to Parasitic animal. Editors: G. J. Jackson, R. Herman, I. Singers. II: 517:550, (1970).

- 18.- HONIGBERG, B. M. Trichomonads of veterinary importance, en Kreger, J. P.: Parasitic Animals, II: 469-550, Appleton (1978).
- 19.- HONIGBERG, B. M.; Dieter Volkmann; Rolf Entzeroh, and Erich -- Scholtyseck. A freeze-fracture electron microscope study of -- Trichomonas vaginalis Donn  and Tritrichomonas foetus (Riedm ller) J. Protozool., 31 (1): 116-131, (1984).
- 20.- JOHNSON, A. E. Proc. 69 Annual Meet, U. S., Livestock San. Ass. 183-189, (1966).
- 21.- KERR, W. R. The intradermal test in Bovine Trichomoniasis. The - Vet. Rec. 56 (34): 303, (1944).
- 22.- KERR, W. R. and ROBERTSON, M. J. Comp. Path., 57: 301, (1947).
- 23.- KERR, W. R.; and ROBERTSON, M. Active and Passive sensitization of the uterus of the cow in vivo against Trichomonas foetus antigen and the evidence for the local production of antibody in that site. J. Hyg. Camb., 51: 405-415, (1953).
- 24.- KERR, W. R. and ROBERTSON, M. passively and actively acquired-antibodies for Trichomonas foetus in very young calves. J. Hyg Camb., 52: 253-263, (1954).
- 25.- KLOSTER, A. M.; GONZALEZ, O. E.; ZIELINSKI, G.; PISCITELLI, H. G.; DIAZ, L. R.; VAGO, R. R.; Aspectos sanitarios y productivos de la subcuena lechera, Las Rosas (Santa Fe); Rev. Med. - Vet. 63 (5): 346-362 (1982).
- 26.- LANGONE, J. J.; HELEN VAN VUNAKIS. Methods in Enzymology, 92:-175, (1983).
- 27.- LEVINE, N. D. Protozoan Parasites of domestic animals and man; 2a. Ed.; Edit. Burgess, Minneapolis, Minesota, (1973).

- 28.- MARGNI, R. A. Inmunología e Inmunoquímica. 1a. Edición Edit. - Médica Panamericana, (1982).
- 29.- MARTIN, E. M. ; MALEC, J.; COOTE, J. L.; and WORK, T. S. Studies on protein and nucleic acid metabolism in virus-infected-mamalian cells. 3.- Methods for the disruption of krebe ll mou se-ascites-tumour cells. Biochem. J., 80: 606-611, (1961).
- 30.- MATHEWS, H. M., and REALY, G. R. Evaluation of two serological test for Trichomonas vaginalis infection. Jour. of Clinical Microbiol., 17 (5): 840-843, (1983).
- 31.- Mc ENTEGART, M. G. The application of a haemagglutination technique to the STUDY of Trichomonas vaginalis infections. J. --- Clin. Path., 5: 275, (1952).
- 32.- Mc ENTEGART, M. G. Serological comparison of a strain of trichomonas vaginalis with the Belfast and Manley strains of Trichomonas foetus. J. Path. Bact., 71: 111, (1956).
- 33.- MORGAN, B. B. Normal Agglutinins in vertebrate sera for Trichomonas Foetus. Proc. Helminth Soc. (Washington), 11: 21-23, --- (1944).
- 34.- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel. Methods for immunological analyses. Progr. Allergy, 5: 1, (1958).
- 35.- PIERCE, A. E. Clinical observations on an experimental case of bovine Trichomoniasis. Vet. Rec., 58 (2): 16, (1946).
- 36.- PIERCE, A. E. The demonstration of an agglutinin to Trichom. foetus in the vaginal discharge of infected heifers. J. Comp. -- Path., 57: 84, (1947).
- 37.- PIERCE, A. E. The mucus agglutination test for the Diagnosis -

- of bovine Trichomoniasis. The Vet. Rec., 61 (25): 347 (1949).
- 38.- PIERCE, A. E. Specific antibodies at mucus surface. Proc. R.-Soc. Med., 46: 31-33, (1953).
- 39.- PLASTRIDGE, W. Cultivation of a bacteria free strain of *Trichomonas foetus*. J. Bact. 45: 1946-1947, (1943).
- 40.- RIEDMULLER, L.; Uber die morphologie, Übertragungsversuche und Klinische, Bedeutung der beim sporadischen abortus des rhindes vorkommenden trichomonaden; Zentralbl. Bakt. I. Abt. Orig.; -- 108; 103-118 (1928)
- 41.- ROBERTSON, M.; The antigens of *trichomonas foetus* isolated --- from cows and pigs; J. Hyg. Camb.; 58: 207-213, (1960).
- 42.- ROBERTSON, M. Antibody response in cattle to infection *Trichomonas Foetus*, in immunity to protozoa. Oxford. Blackwell Scientific Publications (Garnham P.C.C., Pierce A. and Roitt I. --- edit.), (1963).
- 43.- SCHEIDEGGER, J. J. Une micro-methode de l'immuno-electrophorése. Intern. Arch. Allergy; 7: 103, (1955).
- 44.- SCHNEIDER, M. *Trichomonas foetus* in cattle with special reference to diagnosis. Thesis, Madison, University of Wisconsin, 33-pp., (1941).
- 45.- SCHNEIDER, W. C. Intracellular distribution of enzymes. III -- the oxidation of octagonic acid by rat liver fractions. J. Biol Chem., 176: 259-266, (1948).
- 46.- SOTO, P.; DICK, A. Campylobacteriosis: Infección experimental-de toros jóvenes. Rev. Med. Vet., 64 (3): 166, (1983).
- 47.- SPATH, E. J. A.; GONZALEZ, R. N.; GONZALES de RIOS, L.; CON---

- DRON, R. J.; NOGUES, E. M.; GUGLIELMONE, A. A.; KUHNE, G. I.; BROADBENT, D. W.; HABICH, G. E.; Estudios sobre sanidad animal en el Noroeste Argentino (Parte V). Gac. Vet., 343: 506 (1979).
- 48.- STOESSEL, F. R. y HABERKOBEN, S. E. M. Estudio comparativo entre el método del raspador a resorte y el lavaje prepucial en el Diagnóstico de Tricomoniasis y Vibriosis genital bovina. -- Gac. Vet. 330: 270-279, (1978).
- 49.- STOESSEL, F.; Las enfermedades venéreas de los bovinos; 1ra. edición, editado por Acribia (1982).
- 50.- VASQUEZ, R.; AVILA, J. D.; ROSSANIGO, C. E.; SAGER, R. L.; Tricomoniasis y Campylobacteriosis en la región semiárida central argentina; Vet. Arg. 1 (10): 940 (1984).
- 51.- VILLAR, J. A.; SPINA, E. M.; Tricomoniasis bovina: una recopilación de datos sobre su incidencia en el período 1966-1977; - Gac. Vet. 371: 544-553, (1982).
- 52.- WEIR, D. M. Handbook of experimental Immunology. Third Ed.; -- Blackwell Scientific Editions; Vol. II y III, (1978).
- 53.- WILLIAMS, R. C. and GIBBONS, R. J. Inhibition of bacterial --- adherence by secretory immunoglobulin A. Science, 177: 697-699 (1972).
- 54.- YANO, A.; YUI, K.; AOSAI, F.; KOJIMA, S.; KAWANA, T.; OVARY, Z. Immune response to Trichomonas vaginalis: IV Immunochemical and Immunobiological analyses of T. vaginalis antigen. Inter.- Arch. of Allergy and Applied Immunology, 72 (2): 150-157, ---- (1983).

RECLAMENTO DE TESIS

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

