

DIAGNOSTICO DE LAS TRIPANOSOMOSIS
MEDIANTE LA REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO.

T E S I S

Presentada para optar al título
de
Doctor en Medicina Veterinaria.

Por: Pedro Aisenberg.

La Plata Noviembrede 1949.--



AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Rector:

Dr. JULIO M. LAFFITE.-

Vice Rector:

Dr. HECTOR CEPPI.-

Secretario General:

Dr. JOSE A. SECO VILLALBA.†

AUTORIDADES DE LA FACULTAD

Decano:

Dr. GUIDO PACELLA. _

Vice-Decano:

Dr. OSVALDO A. ECKELL. $\frac{2}{4}$

Secretario:

Dr. BERNABE AGUERRE. -

CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD:

TITULARES:

- Dr. VICTOR M. ARROYO.--
- Dr. OSVALDO A. ECKELL.--
- Dr. JOSE N. GONZ.--
- Dr. CARLOS M. HARIPE.--
- Dr. CORADINO SEARIGGI.--
- Dr. FRANCISCO A. URACH.--
- Dr. HORIS DEL PRETE.--
- Dr. J. CARLOS DE GIANO.--
- Dr. CARLOS PIAZZA.--
- Dr. JOSE I. OCHOA.--

SUBSTITUTOS:

- Dr. FELIPE ERDMANN.--
 - Dr. MANUEL E. ISOLABELLA.--
 - Dr. CARLOS J. TAUBLER.--
 - Dr. ALEJANDRO C. BAUDOU.--
 - Dr. EDILBERTO M. FERNANDEZ ITHURBAT.--
 - Dr. PABLO NEGRONI.--
 - Dr. ALFREDO MANZULLO.--
 - Dr. GERVASIO OSCAR CLER.--
-

PROFESOR HONORARIO:

Dr. D. LOGIUDICE G. NATALIO.-

DIRECTOR DEL " DEPARTAMENTO DE ANATOMIA ":

Dr. D. ARROYO VICTOR M.-

DIRECTOR DEL HOSPITAL "HERACLIO RIVAS":

Dr. D. LAMAS EDMUNDO.-

NOMINA DEL CUERPO DE PROFESORES

<u>Titulares</u>	<u>Cátedras</u>
ARROYO Victor M.....	Anatomía descrip. del caballo.
CONI MOLINA Eduardo.....	Higiene e Industrias.
BARREIRA JOSE M. de la.....	Microbiología General.
DEL PRATO Ismael O.....	Anatomía Comparada.
BAUDOU Alejandro O.....	Inspección Sanitaria de P. A.
DURRIEUJ. Jorge E.....	Exterior y Zootecnia General.
ECKELL Cavaldo A.....	Patología Médica.
ERDMANN Felipe.....	Zootecnia Especial.
FERNANDEZ ITHURRAT E. M.....	Análisis Clínicos.
GELORNINI Nicolás.....	Enfermedades Parasitarias.
GONI José M.....	Medicina Operatoria.
HARIPE Carlos M.....	Enf. Infecto-Contagiosas.
ISOLABELLA Mameel E.....	Física Biológica.
LANAS Edmundo.....	Polioclínica.
LUCAS GUILLERMO.....	Embriología e Histología N.
NEBRONI Pablo.....	Micología y Microbiología Ind.
RACELLA Guido.....	Fisiología.
ROTTGARDT Abel A.....	Microbiología Especial.
SBARIGGI Coradino.....	Materia Médica y Toxicología.
TAUBLER Carlos J.....	Patología General.
UBACH Francisco.....	Anatomía Patológica.



Profesores Adjuntos

Cátedras

BONFIGLIOLI Hugo.....	Micología y Microbiología Industrial.
BRANDARIZ Constantino.....	Patología Quirúrgica (ac.cátedra.)
CARRARA Italo.....	Higiene e Industria.
CELANI BARRY Rafael.....	Análisis Clínicos.
CINE Gervasio O.....	Polioclínica.
DEL PRETE Horis.....	Insp.san. de Prod. Alimenticios.
DI GIANO J.Carlos.....	Patología General.
ERRECALDE Jorge E.....	Enf. Infecto-Contagiosas.
GALVAN Oscar J.C.....	Semiología (ac.Cátedra).
IPINA Juan M.....	Física Biológica.
MALLIANDI FLORESTAN S.....	Parasitología (ac.Cátedra).
MANZULLO Alfredo.....	Microbiología General.
OCHOA J.I.....	Materia Méd. y Toxicología.
PELLIAGQ Cipriano.....	Sueros y Vacunas (ac.Cátedra).
OTTINO Julio F.....	Embriología e Histología Normal.
PERALTA Oscar D.....	Anatomía Patológica.
PIAZZA Carlos.....	Medicina Operativa.
SPERONI Juan Carlos.....	Exterior y Zootecnia.
TEOBALDO Carlos J.B.....	Fisiología.
TOSO José Carlos.....	Obstetricia y Patología de los Rumiantes (ac.Cátedra).
VIDELA Santiago D.A.....	Química Biológica (ac.Cátedra).

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS

Dña. ANGULO Eusebia.....	Inspección de P.A. (interina).
Dr. BARREYRO Modesto...	Inspección de P. A.
Dr. CARO Gregorio.....	Ert. y Zootecnia G. (interino).
Dra. CHUECA Pilar.....	Micología y Microbiología Ind.
Dr. FELIPE Sebastián.....	Zootecnia Especial.
FORMENTI ROBERTO//.....	Química Biológica (interino).
Dr. GARCIA PIRAZZI A...	Microbiología E. (honorario).
GOUFFIER Nestor A.....	Patología Médica (interino).
Dr. GRAFF Alejandro....	Microbiología Especial.
Dr. ZACCARDI Eduardo...	Inspecc. S.P.A. (ad-Hoc).
Dr. Martino J.J.....	Anatomía Patológica.
Dr. TOMADONI Emilio.....	Materia Med. y Toxicología.

PADRINO DE TESIS

PROFESOR Dr. FLORESTAN S/ MALLIANDI.

A MIS QUERIDOS PADRES

A MIS QUERIDOS HERMANOS.

A LA SEÑORITA DORA VICTORIA CERRA.

*

Exposición del orden seguido en el presente trabajo.

- 1).- Diagnostico de las Tripanosomosis mediante la
Reaccion de Desviación del Complemento.
 - 2).- Estudio de los Antígenos. Su preparación.
 - 3).- Preparación de los elementos necesarios para la
Reacción.
 - 4).- Experiencias realizadas.
 - 5).- Protocolos. Resultados.
 - 6).- Conclusiones.
 - 7).- Bibliografía.
-

Presento a consideración de los Señores Profesores
este trabajo experimental que tiene como único mé-
rito el haber sido hecho con todo cariño y dedica-
ción.

No puede dejar sin consignar mi agra-
decimiento más sincero al Dr. Florestán S. Mallian-
di que fué mi guía en todo el trabajo.

Mi reconocimiento al Dr. Castelli y per-
sonal del Laboratorio del Hospital San Juan de Dios
de La Plata.

Al Sr. Mario Albarifios mi agradecimiento.

La Plata Noviembre de 1949.



Pedro Eisenberg
Pedro Eisenberg.

DIAGNOSTICO DE LAS TRIPANOSOMOSIS MEDIANTE LA

REACCION DE FIJACION DEL COMPLEMENTO.

Los medios de que se vale el Medico Veterinario para hacer el diagnóstico de las Tripanosomosis son muchos, y digámoslo ya, con ninguno de ellos el clínico llega a la conclusión segura de una infección. Ya que la seguridad del diagnóstico debe apoyarse en el hecho de haber encontrado tripanosomas en sangre, y sabemos lo difícil que resulta en ocasiones su hallazgo.

Como con los métodos clínicos, no se llega a la seguridad definitiva de la afección, en que me propongo con este trabajo, y apoyado en otros realizados en el país y en el exterior, llegar al diagnóstico seguro de las tripanosomosis con un método serológico; la Desviación del Complemento.

Numerosos autores han llegado a la conclusión de que el método es excelente para descubrir en el suero de los animales enfermos los anticuerpos específicos.

La técnica ha sido iniciada por Levaditid y Mutermuloh 1909. Estos autores demuestran que una sensibilizadora se puede poner en evidencia en un sujeto infectado y mientras dure ésta.--

A la misma conclusión llegan, Watson 1925, Ciuca 1920-1932, Waldemann y Knuth 1920, Dahmen 1922, Urbain 1927,

En cuanto a los resultados obtenidos usando esta reacción como método diagnóstico y profiláctico ha sido coronado por el éxito, ya que en el Canadá, y en grandes zonas de E.E.U.U. se ha logrado la extinción completa de las Tripanosomosis.

Petrowskaja 1930, al efectuar la reacción en el suero de un sujeto supuesto enfermo, basta una sola reacción positiva para asegurar la existencia de la infección, mientras que un resultado negativo solo tiene valor si se confirma con dos exámenes repetidos del suero sanguíneo. Ya que no debemos olvidar que en algunos estados latentes de la enfermedad, los anticuerpos específicos que se investigan pueden no hallarse en la sangre.

Garwitsch y Subotnik 1933, llegan a la conclusión de que este procedimiento permite diagnosticar la enfermedad 4 ó 5 meses antes que el examen clínico. Aunque en algunas ocasiones el resultado de la Fijación del Complemento fué diferente para un mismo equino realizada con algunos días de diferencia, según los autores la reacción no se produce en el pe-

riodo de incubacion.

Segun Marcos 1933, el método de Desviacion del Complemento permite establecer el diagnostico de la Durina, doce a quince dias después de la infeccion experimental.

Para Debonnera 1938, el metodo es enteramente satisfactorio a condicion de que la tecnica sea impecable y permite descubrir la infeccion a los ocho dias de inoculado el animal/

En lo que respecta a las yeguas preñadas no infectadas Wussang habia observado que podian dar reaccion positiva, pero Debonnera posteriormente ha obtenido siempre reacciones negativas, mientras que las yeguas infectadas daban siempre reaccion positiva.

Estudio de los Antígenos. Su preparación.

Los trabajos realizados son numerosos. Los primeros que trabajaron fueron Levaditi y Mutermilch en el año 1909, a los que siguen trabajos de Offermann 1915, que hace sus primeras experiencias en el conejo con Durina, en ese mismo año Watson fué el que en realidad llegó a fijar los detalles exactos para la obtención del antígeno y el título de los diversos elementos.

La rata blanca inoculada experimentalmente, es un medio óptimo en el que se desarrollan los tripanosomas, la titulación se hace frente a la sangre de caballo infectado también experimentalmente; el suero a estudiar es inactivado una hora a 59 grados.

La precisión de este método como elemento profaláctico permitió hacer desaparecer la Durina del Canadá.

Los antígenos utilizados son numerosos. Bessemans 1922, comparando los antígenos conocidos los divide; desde el punto de vista de su modo de obtención y de su valor en;

- 1.- Extracto acuoso u alcohólico de órganos de animales muertos de infección de tripanosomas; poder anti-complementario elevado, poder antigénico nulo o pobre.
- 2.- Extracto sérico de sangre infectada con tripanosomas; poder anti-complementario pobre, poder antigénico pobre.
- 3.- Suero de ratas fuertemente infectadas experimentalmente; poder anti-complementario fuerte, poder antigénico pobre.
- 4.- Emulsión de tripanosomas separados por centrifugación, diluidos en solución fisiológica, alcohol o la mezcla de Mohler- glicerina y solución fisiológica-; poder anti-complementario pobre, poder antigénico intenso; en el líquido de Watson -solución fisiológica 90, glicerina 10, formol 0.1 - se obtienen los mejores resultados.
- 5.- Emulsión del culote de la centrifugación de sangre infectada por tripanosomas, adicionada de saponina al 0.5 por ciento, procedimiento de Mohler-Reynolds; poder anti-complementario elevado, poder antigénico intenso. Finalmente, Bessemans llega a la conclusión de que los dos últimos métodos son los más eficaces.

Sani 1921, para remediar los diversos inconvenientes que presentan los métodos de obtención del antígeno utiliza el perro al que infecta, luego de comprobada la infección procede a sangrarlo, la sangre es diluida en la mitad de solución fisiológica y centrifugada a pequeña velocidad (700) vueltas durante cinco o diez minutos. Se decanta y vuelve a centrifugar esta vez a gran velocidad de manera que los Tripanosomas y leucocitos que estaban en la parte superior del tubo se reúnen con los otros en la parte inferior del tubo, se trata el el depósito diluido en solución fisiológica por un suero hemolítico y el complemento, el todo estando a 37 grados durante 20 minutos; luego de esta operación una nueva centrifugación no deja en el fondo del tubo mas que a los Tripanosomas listos para la preparación del antígeno.

Chu Jen Ku 1926, para evitar las causas de error, deja de lado el extracto acuoso de parásitos preconizada por Offenbach y utiliza un extracto alcohólico de Tripanosomas preparados siguiendo la técnica de Dahmen.

Con la única condición de emplear una técnica precisa, él obtiene 16 reacciones negativas con el suero de 16 conejos normales y dos 2 reacciones positivas con la sangre de conejos infectados con Tripanosoma equiperdum.

El método de Watson es el que tiene con el correr del tiempo más adeptos, pero Mlle. Cordier y Menager 1933, en razón de las dificultades de su preparación, ensayan una técnica parecida a la utilizada por Calmette Marsol para la Tuberculosis.

Tres son los antígenos utilizados; dos preparados con conejos sacrificados en el estado final de la enfermedad, uno con el bazo y el otro con el hígado y un tercero con el corazón de un asno muerto de Durina. Los resultados no fueron satisfactorios.

Zottner 1934, usa un antígeno alcohólico/ Pero todo antígeno debe reunir las siguientes cualidades valor antigénico elevado y poder anti-complementario relativamente pequeño y según Zottner un inconveniente del antígeno de Watson es su limitada duración de conservación solamente de 10 a 15 días, lo que obliga a mantener un lote de animales y titulación para cada una de las reacciones.

2

Etas blancas inoculadas con *Tripanosoma equiperdum* son sangradas en el período de infección masiva, la sangre es recibida en solución citratada y centrifugada a moderada velocidad, el plasma sobrenadante se centrifuga a gran velocidad para decantar los tripanosomas, el líquido es sacado y conservado en la heladera 24 horas para en una posterior centrifugación poder recuperar los tripanosomas que escaparon a las anteriores centrifugaciones.

El culot conteniendo los tripanosomas son lavados, primero con agua destilada para lizar los glóbulos rojos y luego con solución fisiológica. Se centrifuga nuevamente y posteriormente el culot es lavado con acetona, luego de su evaporación, se la agrega alcohol. Por último el todo es puesto en suspensión con alcohol absoluto a razón de un centígramo de antígeno y 10cc. de alcohol.

Comparando este antígeno con los ya vistos, Zottner dice que es específico y estable y marca un progreso en la técnica de la reacción de Desviación del Complemento en las Tripanosomosis.

Kolomietz 1936, operando con el *Tripanosoma equiperdum* ensayó la extracción del antígeno a partir de tripanosomas desecados, efectuó la extracción con alcohol metílico y alcohol etílico, el primero con mejor resultado.

El antígeno tiene mas poder cuando es preparado con agua adicionada de formol, ácido fénico o glicerina.

Kelser 1936, Trabaja con *Tripanosoma cruzi* e introduce modificaciones a la técnica de preparación del antígeno. Como una infección experimental no permite obtener una gran cantidad de tripanosomas, utiliza cultivos en agar adicionados de peptona (2.5 %), de cloruro de sodio al (0.7 %), después de sembrado se adiciona dextrosa (5% de una solución al 1 %) y de sangre desfibrinada de cerdo al (5 %).

Este cultivo luego de 10 días a 30 grados, es lavado con agua destilada, centrifugado y vuelto a lavar con solución fisiológica y el culot es conservado en una mezcla de agua salada y glicerina en partes iguales.

Este antígeno en el momento del uso es diluido en 20 partes de solución fisiológica.

Los resultados obtenidos con este antígeno en la reacción han sido constantemente positivos con el suero de animales infectados, a la vez

Pigoury 1937, Para poder producir mas cantidad de antígeno utiliza el perro y una gran cantidad de ratas. Inocula, un perro esplectenémico con *Tripanosoma evansi* y cuando la infección es grande sangra a blanco, recoge la sangre en citrato y centrifuga a baja velocidad, el plasma es guardado en heladera dando tiempo a que los tripanosomas sedimenten, luego se centrifuga a gran velocidad. El culot es tratado según el método de Zettner, y se puede con este método obtener 1 a 2 centigramos de tripanosomas desecados por 50 cc. de sangre.

Para obtener emulsiones puras de *Tripanosomas Mannzi-Torini 1938*, emplea la siguiente técnica: luego de una dilución de la sangre en dos volúmenes de solución fisiológica citratada, centrifuga a 1.800 revoluciones durante 4 minutos.

El líquido sobrenadante es desechado, aún así el sedimento, no está formado por los *Tripanosomas* puros, se procede a lavarlo con solución fisiológica y se centrifuga a 1.800 revoluciones.

Este procedimiento ha sido ya utilizado ya utilizado en la investigación de la infección por *Tripanosomas* en el Dromedario por Schoening en el año 1924, quien ha citado en esa oportunidad una aplicación interesante desde el punto de vista sanitario; sobre 15 dromedarios traídos a los E.E.U.U. e investigados sus sueros se obtuvo los siguientes resultados 4 fijaron las alexinas de una manera neta, 2 en forma dudosa y 9 dieron resultados negativos.

Siguiendo esta investigación el autor inocula a partir de los 6 primeros animales receptivos que resultaron infectados. Los restantes resultaron negativos.

Robinson 1927, Utiliza un antígeno a partir de *Tripanosomas congolense* y obtiene la reacción con el suero de animales portadores de ese *Tripanosoma*, pero no con el *Tripanosoma equiperdum*; el autor remarca que el empleo extendido del método choca con la dificultad de obtención de cantidades grande de antígeno.

Posteriormente este autor 1930, ha efectuado la Desviación del Complemento en una tropa constituida por animales inoculados con diversas cepas de *Tripanosoma congolense*, y en el curso del tratamiento. La reacción es menos neta que en la Durina y tiene además un tiempo muy limitado para poder efectuarla. En efecto un suero puede dar reacción positiva definitiva después de una media hora a 37 grados, pero puede hemolizar

particularmente si se espera una hora para efectuar la reacción.

Robinson explica esta particularidad del *Tripanosoma congolense* diciendo que este *Tripanosoma* produciría menor cantidad de antígeno que el *Tripanosoma equiperdum* o *brucei*; sin embargo a juicio de este autor el uso de la reacción puede ser útil para controlar el tratamiento. Para la búsqueda de animales infectados puede ser también útil (*Profilaxis*),

Para la obtención del antígeno de *Tripanosoma congolense* Robinson utiliza diversos procedimientos; el obstáculo más frecuente es que los pequeños animales no presentan una infección masiva y que ésta es fugaz los resultados son malos con el antígeno a partir de: hígado, corazón, bazo de cabayas infectados.

Por otra parte la centrifugación de sangre da pocos tripanosomas probablemente en razón de un fenómeno de adhesión, hecho señalado por otra parte por Van Saceghem en el año 1922 y observado permanentemente en el *Tripanosoma congolense*. Por tanto Robinson prefiere limpiar a los *Tripanosomas* de glóbulos destruyéndolos con formol que es agregado en la proporción de 1 por mil.

Se centrifuga y el culot es adicionado de solución fisiológica y nuevamente centrifugado para eliminar los pocos glóbulos restantes. Se conserva como lo indicó Watson (1 parte de antígeno en dos de una mezcla en partes iguales de glicerina y solución fisiológica y adicionada de formol al 1 por mil).

Se puede decir de una manera general que la Desviación del Complemento da resultado positivo con *Tripanosoma vivax*, poco con el *Tripanosoma congolense* y da bien con el *Tripanosoma brucei*. Desgraciadamente tal como lo señala Hornby, en los laboratorios tropicales los conejos dan un suero hemolítico pobre y que la sangre de los cobayos es deficiente en complemento, de manera que la reacción es difícil de realizar prácticamente.

Por otra parte Randall 1934, dice que las reacciones de Desviación del Complemento que se obtienen en el Surra noes específica y obtiene los mismos resultados que los diversos antígenos a partir de extractos de corazón de bovino, antígeno de aborto epizootico, de muermo; el 50 % de los sueros dan estas reacciones pobres después de una reacción febril de origen desconocido.

Estos sueros contienen una sustancia antilítica termoestable que existe a la vez en la fracción globulínica y en la fracción proteínica. Se eliminan esas pseudos-reacciones sumando el complemento.

Debonnera 1938, para la preparación de su antígeno parte de una cepa africana y para obtener tripanosomas en gran cantidad inocula a cobayos, ratas y raramente al perro; cuando la infección es masiva, por punción cardíaca saca sangre y procede a aleborar su antígeno de acuerdo al método de Watson (emulsión de Tripanosomas, luego lavados repetidos con solución fisiológica y posteriormente conservado en glicerina, solución fisiológica y formol.

El antígeno alcohólico de Zottner, que este autor ha ensayado no le ha dado resultados tan satisfactorios como con el de Watson.

El suero del animal sospechoso es calentado una hora a 60 grados. Al respecto este autor se plantea la siguiente pregunta: La reacción del suero; puede cambiar luego del calentamiento y guardado varios días antes de examinarlo?

Para contestarse esta pregunta examina luego de varios días, el suero de varios animales previamente calentados y encuentra que de los 180 sueros examinados son todos positivos.

Algunos puntos son particularmente importantes para Debonnera : calentamiento del suero del caballo a 60 grados, título exacto de los elementos y sobre todo del antígeno, título elevado del suero hemolítico y poder antigénico elevado del antígeno.

Preparación de los elementos necesarios para efectuar la reacción
Experiencias realizadas.

Preparación y valoración del Antígeno.

A partir de una cepa de *Tripanosoma equinum*, se inoculan 3 ratitas blancas (el 23/X/49) a los 4 días se investiga en la sangre y se hallan solo un *Tripanosoma* por campo. Al 6 día había 4 *Tripanosomas* por campo, por muerte de 2 de las ratitas a partir de la restante se hace un nuevo repique y (el 4/X/49) luego de comprobar una infección masiva se procede a la obtención del antígeno.

Se extrae, de una o varias lauchas blancas juvenes infectadas con *Tripanosoma equinum*, la sangre. Se recoge en una solución de citrato de sodio al 1 % , y centrifugada a 2000 revoluciones, durante 20 minutos, separada la parte superior y centrifugada nuevamente, se agrega al deposito resultante del sedimento de la primera centrifugación; se añade a la mezcla una cantidad de agua destilada para producir la hemólisis lo que requiere unos 20 minutos, se centrifuga nuevamente para reunir en el fondo del tubo todos los *Tripanosomas* y estromas globulares.

La parte líquida se reemplaza con solución fisiológica en el que los *Tripanosomas* quedan en suspensión, se agita y se vuelve a centrifugar. Finalmente el líquido se reemplaza por una solución conservadora compuesta por solución fisiológica y glicerina neutra en partes iguales. Esta mezcla previa agitación se guarda en la heladera.

Como la cantidad de antígeno obtenida era muy pequeña, se inoculan (7/X/49) dos ratas, a los 4 días se investiga en la sangre y no se encuentran *Tripanosomas*, a los 11 días de inoculadas ya había 4 *Tripanosomas* por campo del microscopio. A los 14 días de inoculados vale decir, (el 21/X/49) se procedió a la obtención de mayor cantidad de antígeno con la técnica arriba mencionada.

Titulación del Antígeno.

Sea necesarios los siguientes elementos.

- a) Solución fisiológica (al 9 por mil).
- b) Suero Positivo. Obtenido de una rata sangrada en período masivo de infección
- c) Sistema Hemolítico : Complemento de $1\frac{1}{2}$ U.H. (diluida 1 en 10 de solución fisiológica).
Suero Anti-carnero 2U.H. (como el título es 1/2000, se diluye 0.2 en 99.8 de solución fisiológica).
Glóbulos rojos de carnero (al 5%).
- d) Antígeno : (1 en 25, a los fines de la experiencia se diluye 0.1 de antígeno en 2.4 cc. de solución fisiológica).
- e) Para controlarse prepara suero negativo que irá en la segunda fila.

Reacción. 1er. fila de tubos.

TUBOS	SOLUCION FISIOLÓGICA	SUERO POSITIVO	ANTIGENO	SISTEMA HEMOLITICO			Resultados.	
				COMPLEMENTO $1\frac{1}{2}$ U.H.	SUERO A.C. 2 U.H.	GLÓBULOS ROJOS 5%		
1	0.5 cc.	0.1 cc.	0.025 cc.	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.	No H.
2	0.5 cc.	0.1 cc.	0.05 cc.	0.5 cc.	$\times 5$	0.1 cc.	0.1 cc.	No H.
3	0.5 cc.	0.1 cc.	0.075 cc.	0.5 cc.	$\times 10$	0.1 cc.	0.1 cc.	No H.
4	0.5 cc.	0.1 cc.	0.1 cc.	0.5 cc.	$\times 20$	0.1 cc.	0.1 cc.	No H.
5	0.5 cc.	0.1 cc.	0.125 cc.	0.5 cc.	$\times 30$	0.1 cc.	0.1 cc.	H. P.
6	0.5 cc.	0.1 cc.	0.15 cc.	0.5 cc.	$\times 40$	0.1 cc.	0.1 cc.	H. P.
7	0.5 cc.	0.1 cc.	0.20 cc.	0.5 cc.	$\times 50$	0.1 cc.	0.1 cc.	H. T.
8	0.5 cc.	0.1 cc.	0.25 cc.	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.	H. T.
9	0.5 cc.	0.1 cc.	—	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.	H. T.
10	0.5 cc.	—	—	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.	H. T.

Por lo tanto surge de este protocolo que la Unidad Antigénica; vale decir, la menor cantidad de Antígeno capaz de producir es la contenida en el tubo N° 7.

Segunda fila de tubos.

Tubos	Solución Fisiológica	Suero Negativo		Antígeno	Complemento		Suero. A.C.	Globulos		Resultados
1	0.5 cc.	0.1 cc.		0.025 cc.	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.		H. T.
2	0.5 cc.	0.1 cc.	30 minutos	0.05 cc.	0.5 cc.	30 minutos	0.1 cc.	0.1 cc.	30 minutos	H. T.
3	0.5 cc.	0.1 cc.	30 minutos	0.075 cc.	0.5 cc.	30 minutos	0.1 cc.	0.1 cc.	30 minutos	H. T.
4	0.5 cc.	0.1 cc.	30 minutos	0.1 cc.	0.5 cc.	30 minutos	0.1 cc.	0.1 cc.	30 minutos	H. T.
5	0.5 cc.	0.1 cc.	5%	0.125 cc.	0.5 cc.	5%	0.1 cc.	0.1 cc.	5%	H. T.
6	0.5 cc.	0.1 cc.	5%	0.15 cc.	0.5 cc.	5%	0.1 cc.	0.1 cc.	5%	H. T.
7	0.5 cc.	0.1 cc.	A	0.20 cc.	0.5 cc.	A	0.1 cc.	0.1 cc.	A	H. T.
8	0.5 cc.	0.1 cc.		0.25 cc.	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.		H. T.
9	0.5 cc.	0.1 cc.		—	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.		H. T.
10	0.5 cc.	—		—	0.5 cc.		0.1 cc.	0.1 cc.		H. T.

Sistema Hemolítico .

a) Preparación de los glóbulos rojos de carnero.

Se obtiene sangre de carnero por extracción de la vena yugular externa, se recoge en una solución citratada al 1 %, se llevan a tubos de centrifuga "graduados", se centrifuga a velocidad moderada de manera que los glóbulos rojos vayan al fondo, se extrae la parte líquida que sobrenada (compuesta por suero y citrato) y se reemplaza por solución fisiológica, se agita bien y se lleva a centrifugación durante 20 minutos. Se repite esta operación una vez más y se prepara la suspensión al 5 %. Antes del uso ha de agitarse porque en reposo los glóbulos rojos tienden a sedimentarse.

b) Preparación del Complemento.

Se usa suero reunido de dos a tres cobayos sanos, grandes y bien nutridos y en ayunas de 12 horas, se anestesian, se disecan las venas del cuello y se recoge la sangre en tubos de centrífuga por intermedio de un embudo grande. Se centrifuga durante 20 minutos. El suero sobrenadante se recoge y se guarda.

En el momento del uso se diluye al décimo, vale decir 1 de complemento en 9 de solución fisiológica.

Titulación del Complemento.

Preparación de los elementos.

- a) Suero Hemolítico : Como lo debemos diluir 1/1000 (ya que partimos de un título 1/2000).
- b) Glóbulos rojos : Al 5 % .
- c) Complemento: Lo debemos diluir 1/10. (usamos 1 de complemento en 9 de solución fisiológica.)

Reacción.

TUBOS	SUERO HEMOLITICO 1/1000 D.M.H.	HEMATIES 5%		COMPLEMENTO	SOLUCION FISIOLÓGICA		Resultados
1	1 cc.	1 cc.		0.05 cc.	1.45 cc.		No H.
2	1 cc.	1 cc.	15 minutos	0.1 cc.	1.40 cc.		No H.
3	1 cc.	1 cc.	30 minutos	0.15 cc.	1.35 cc.		No H.
4	1 cc.	1 cc.	30	0.2 cc.	1.30 cc.	30 minutos	No H.
5	1 cc.	1 cc.	30	0.25 cc.	1.25 cc.	30 minutos	No H.
6	1 cc.	1 cc.	30	0.3 cc.	1.20 cc.	30 minutos	H. P.
7	1 cc.	1 cc.	30	0.35 cc.	1.15 cc.	30 minutos	H. T.
8	1 cc.	1 cc.		0.40 cc.	1.10 cc.		H. T.
9	1 cc.	1 cc.		0.45 cc.	1.05 cc.		H. T.
10	1 cc.	1 cc.		0.5 cc.	1. cc.		H. T.

Quiere decir que la Dosis Mínima capaz de producir Hemólisis es la contenida en el tubo N°

Preparación del suero a investigar.

Se recoge sangre del sujeto a investigar y se deja coagular. Se centrifuga, para activar la separación del suero, durante 20 minutos. Se recoge el suero y se lleva a un tubo de ensayo, se numera para luego evitar confusiones. Se lo fenica (al 5 0/00) y se lo lleva a la heladera hasta el momento del uso.

Antes de efectuar las reacciones se inactiva durante 30 minutos a 57 grados.

Preparación y titulación de la Hemolisina Anti-carnero.

Se administra a un conejo (cada 4 días) una inyección intravenosa de dosis crecientes de una suspensión al 5 % de hematias de carnero lavados, repitiendo estas inoculariones varias veces (4 o 5 0).

A los 10 - 12 días de la última inyección se sangra al animal si una titulación previa da por lo menos una unidad en 0.5 cc. de la dilución 1/4000.

Se separa el suero, se inactiva y se conserva mezclándolo a una solución igual de glicerina neutra. Se mantiene en nevera.

Para poder titular nuestros sueros solicitamos y nos fué concedido, por gentileza del Dr. Pirosky del Institute Bacteriológico Nacional Dr. Malbrán, un suero de título conocido 1/2000.

Extracción del suero de 3 caballos y posterior infección con Tripanosoma equinum.

El 26/X/49 se procede a la extracción del suero de los caballos que denominaremos con los números 1 - 2 - 3. Que responden a las siguientes características zootécnicas.

- Nº 1 : Zaino "Malacara", macho, de 10 años de edad, 1.65m. de talla y buen estado general de gordura.
- Nº 2 : Zaino, macho, de 12 años de edad, 1.62 m, de talla y buen estado general de gordura.
- Nº 3 Zaino "Colorado" macho, de 8 años de edad, y 1,62m. de talla con buen estado general de gordura.

En ese mismo día fueron inoculados con Tripanosoma equinum en la proporción de 5 Tripanosomas por campo, de una gota de sangre examinada al microscopio con un aumento de 450 diámetros.

Extracción de un suero positivo, cuyo objeto es servir de control en el momento de efectuar la reacción.

Después de comprobado la infección de una lamina blanca se sangra, se deja la sangre en reposo de manera que se separe el suero. Para acelerar la separación se centrifuga durante 20 minutos, se extrae el suero, se frena y se guarda en la heladera hasta el momento del uso. Se numera para evitar confusiones.

Extracción del suero de lanchas infectadas con Tripanosoma cruzi para efectuar pruebas de inmunidad cruzada.

Se sigue idéntica técnica que la expuesta anteriormente en la extracción de los otros sueros.

El 31/X/49, se extrae el suero de los 3 caballos inoculados y se guardan para su posterior examen, se vuelve a repetir esta operación el 3/XI/49, el 7/XI/49 y el 11/XI/49. Vale decir que se han ido sacando muestras de suero a los 4 - 8 - 12 - 17 días para efectuar la reacción y poder así determinar en que momento es posible, mediante la Reacción de Desviación del Complemento, diagnosticar la infección.

Preparación de los elementos necesarios para efectuar la reacción

- a) Preparación del antígeno : Se diluye el antígeno en solución fisiológica 1/20 (1cc. de antígeno en 19 cc. de solución fisiológica que se agrega gota a gota y agitando continuamente).
Se deja madurar durante 30 minutos.
- b) Solución fisiológica : Al 9 por mil (que será para el tubo testigo, 2da. fila).
- c) Sistema Hemolítico Se prepara de acuerdo al número de reacciones que se hagan(en este caso preparamos 40cc. que alcanzará perfectamente).

En un Erlenmeyer colocamos los siguientes elementos :

38 cc. de solución fisiológica

0.35 cc. de suero hemolítico (de título conocido),

2 cc. de glóbulos rojos de carnero (al 5 %).

- d) Complemento Se diluye 1/10 (1cc. de complemento en 9 cc. de solución fisiológica).
- e) Suero del enfermo Inactivado a 56 grados durante 30 minutos, y cada suero con su pipeta graduada, y con su número para evitar confusiones.

Reacción"Enfermo N^o 1". 1.ª fila de tubos.

Tubos	Antígeno	SUERO NEGATIVO	SUERO ENFERMO 4 días	SUERO ENFERMO 8 días	SUERO ENFERMO 12 días	SUERO ENFERMO 17 días	Complemento	Solución fisiológica	Temperatura	Sistema	Temperatura	Resultado
1	0.2cc	0.1cc	—	—	—	—	0.35cc.	0.2cc.		0.5cc.		Negativo
2	0.2cc	—	0.1cc	—	—	—	0.35cc.	0.2cc.	45 minutos	0.5cc.	15 minutos	Negativo
3	0.2cc	—	—	0.1cc	—	—	0.35cc.	0.2cc.	37°	0.5cc.	37°	Negativo
4	0.2cc.	—	—	—	0.1cc	—	0.35cc.	0.2cc.	A	0.5cc.	A	Negativo
5	0.2cc.	—	—	—	—	0.1cc.	0.35cc.	0.2cc.		0.5cc.		Positivo

Reacción"Enfermo N° 1.2da. fila de tubos.

Tubos	Solucion Fisiologica	Suero Normal	Suero Enfermo 4 Dias	Suero Enfermo 8 Dias	Suero Enfermo 12 Dias	Suero Enfermo 17 Dias	Componentes	Solucion Fisiologica		Sistema Hemolitico		Resultados		
1	0.2cc.	0.1cc.	—	—	—	—	—	0.35cc.	0.2cc.	0.5cc		Negativo		
2	0.2cc.	—	0.1cc.	—	—	—	—	0.35cc.	0.2cc.	0.5cc.		Negativo		
3	0.2cc.	—	—	0.1cc.	—	—	—	0.35cc.	0.2cc.	0.5cc		Negativo		
4	0.2cc.	—	—	0.2	0.1cc.	—	0.35cc.	0.2cc.	A 37° 45 minutos		0.5cc.	A 37° 15 minutos		Negativo
5	0.2cc.	—	—	—	—	—	0.1cc.	0.35cc.	0.2cc.	0.5cc		Positivo		

Reacción

*Enfermo N° 2. 1er fila de tubos.

Tubos	Antígenos	Suero NEGATIVO	Suero ENFERMO 4 días	Suero ENFERMO 8 días	Suero ENFERMO 12 días	Suero ENFERMO 17 días	Complemento	Solución fisiológica	Temperatura	Sistema	Temperatura	Resultado
1	0.20cc	0.1cc	—	—	—	—	0.35cc	0.2cc	45 minutos	0.5cc	15 minutos	Negativo
2	0.20cc	—	0.1cc	—	—	—	0.35cc	0.2cc	45 minutos	0.5cc	15 minutos	Negativo
3	0.20cc	—	—	0.1cc	—	—	0.35cc	0.2cc	A 37°	0.5cc	A 37°	Negativo
4	0.20cc	—	—	—	0.1cc	—	0.35cc	0.2cc		0.5cc		Negativo
5	0.20cc	—	—	—	—	0.1cc	0.35cc	0.2cc		0.5cc		Positivo

Reacción

" Enfermo Nº 2" 2da. fila de tubos.

TUBOS	SOLUCION FISIOLOGICA	SUEROS NEGATIVOS	SUEROS ENFERMO 4 DIAS	SUEROS ENFERMO 8 DIAS	SUEROS ENFERMO 12 DIAS	SUEROS ENFERMO 17 DIAS	COMPLEMENTO FISIOLOGICO	SOLUCION FISIOLOGICA	SISTEMA HUMANO	RESULTADOS
1	0.2cc	0.1cc	—	—	—	—	0.35cc	0.2cc	0.5cc	Negativo
2	0.2cc	—	0.1cc	—	—	—	0.35cc	0.2cc	0.5cc	Negativo
3	0.2cc	—	—	0.1cc	—	—	0.35cc	0.2cc	0.5cc	Negativo
4	0.2cc	—	—	—	0.1cc	—	0.35cc	0.2cc	0.5cc	Negativo
5	0.2cc	—	—	—	—	0.1cc	0.35cc	0.2cc	0.5cc	Positivo

A 3% 45 minutos

A 3% 15 minutos

Reacción*Enfermo Nº 32. 1er fila de tubos.*

TUBOS	ANTIGENO	SUERO NEGATIVO	SUERO ENFERMO 4 dias	SUERO ENFERMO 8 dias	SUERO ENFERMO 12 dias	SUERO ENFERMO 17 dias	COMPLEMENTO	SOLUCION FISIOLOGICA	tiempo en minutos	HEMOLITICA	tiempo en minutos	Resultado
1	0.2 cc.	0.1 cc.	—	—	—	—	0.35 cc.	0.2 cc.	45	0.5 cc.	15	Negative
2	0.2 cc.	—	0.1 cc.	—	—	—	0.35 cc.	0.2 cc.	30	0.5 cc.	30	Negative
3	0.2 cc.	—	—	0.1 cc.	—	—	0.35 cc.	0.2 cc.	A	0.5 cc.	A	Negative
4	0.2 cc.	—	—	—	0.1 cc.	—	0.35 cc.	0.2 cc.		0.5 cc.		Negative
5	0.2 cc.	—	—	—	—	0.1 cc.	0.35 cc.	0.2 cc.		0.5 cc.		Positive

Reacción

* Enfermo N° 3". fila 2da. de tubos.

TUBOS	SOLUCION FISIOLOGICA	SUERO NEGATIVO	SUERO ENFERMO 4 DIAS	SUERO ENFERMO 8 DIAS	SUERO ENFERMO 12 DIAS	SUERO ENFERMO 14 DIAS	COMPLEMENTO FISIOLOGICO	SOLUCION FISIOLOGICA	SISTEMA HUMANO	RESULTADOS
1	0.2cc.	0.1cc	—	—	—	—	0.35cc	0.2cc.	0.5cc	Negativo
2	0.2cc	—	0.1cc	—	—	—	0.35cc.	0.2cc	0.5cc.	Negativo
3	0.2cc	—	—	0.1cc	—	—	0.35cc.	0.2cc.	0.5cc.	Negativo
4	0.2cc.	—	—	—	0.1cc	—	0.35cc.	0.2cc	0.5cc.	Negativo
5	0.2cc	—	—	—	—	0.1cc.	0.35cc.	0.2cc.	0.5cc.	positivo

A 37° 45 minutos

A 37° 45 minutos

Resultado de la prueba de fijación efectuada con el suero de una laucha enferma con tripanosoma cruzi:

Fila N° 1 de tubos.

TUBOS	ANTIGENO	SUERO ENFERMO	COMPLEMENTO	SOLUCION FISIOLOGICA	37° 45m.	SISTEMA HEMOLITICO	37° 15m.	Resultado
1	0.2cc	0.1cc	0.35cc	0.2cc	A	0.5cc	A	Positivo

Fila N° 2 de tubos.

TUBOS	SOLUCION FISIOLOGICA	SUERO ENFERMO	COMPLEMENTO	SOLUCION FISIOLOGICA	37° 45m.	SISTEMA HEMOLITICO	37° 15m.	Resultado
1	0.2cc	0.1cc	0.35cc	0.2cc	A	0.5cc	A	Positivo

Conclusiones:

Trabajando con el antígeno por mí utilizado y preparado de la manera ya expuesta, y siguiendo las diferentes técnicas utilizadas he llegado a las siguientes conclusiones:

1)º.- Que el método a mí parecer es preciso y permite diagnosticar las Tripanosomosis en animales infectados experimentalmente antes de la 3er. semana de infectados, en mi caso 17 días.

2)º.- La reacción positiva que obtuve con el Tripanosoma cruzi frente al antígeno preparado con Tripanosoma equinum demuestra que la especificidad es relativa, desde que también es positiva frente al suero de lanchas infectadas experimentalmente con un Tripanosoma distinto. Se trata pues de una "reacción de grupo", lo cual en realidad fué demostrado por otros autores.

3)º.- Por último y como las técnicas empleadas no representan ninguna dificultad en su realización es que se recomienda como elemento diagnóstico y profiláctico.

BIBLIOGRAFIA

- Quiroga S.- "La prueba de Fijación del Complemento en el diagnóstico del Mal de Caderas" Revista Zootecnia Julio de 1924 pág 195.
- Debonnera G., "La Dourine en Grèce" Rec. Medical Veterinaire pág 459 año 1938.
- Zottner,- "Possibilité d'obtention d'un antigène alcoolique stable dans le diagnostic de la dourine par déviation du complément," C.R. Soc. Biologie pág 289, Febrero de 1932.
- Ciuca A.- "La dourine" Bulletin Office Intern. Epiz. pág 169 de Mayo de 1933.
- Bessemans A.- "La réaction de Bordet-Gengou dans le diagnostic de la dourine" Comptes Rendus de la Soc. Biologie pág 256 Tomo 24 año 1921.
- Curasson G.- "Sur le diagnostic sérologique des trypanosomiasés" Bulletin Soc. Zoot. et des Epizoo. octubre de 1940.
- Hornby H.E.- "la diagnostic de la trypanosomiasés équine africaine" Veterinaire Journal pág 218 del año 1919.
- Levaditi S. y Mutermilch.- "La diagnostic de la maladie du sommeil par l'examen des propriétés attachantes du sérum" C.R. Soc. Biologie pág 336 del año 1909.
- Mannzzi-Forini N.- "Technique por la séparation des trypanosomes du sang circulant" Bollettano dell' Instituto sieroterapico Milan pág. 824 del año 1938.
- Pigoury L.- "Préparation à partir d'un chien spléctenémise, d'un antigene applicable au diagnostic des trypanosomes animales" C.R. Soc. Biologie pág 1186 del año 1931.
- Sani L.- " La maladie coitale maligne en Italie. Diverses methodes de diagnostic expérimental" Clinica Veterinaria pág 87 y 121 del año 1922.
- Serdelli y Krauent.- "Técnica de las reacciones de Bordet-Wassermann y de Kahn" Revista del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene. Mayo del año 1931.

**Art.9º.- La facultad no se hace solidaria
con las opiniones vertidas en las tesis.-**