


204



**"RELACION DEL PROPERDIN, COMPLEMENTO,
ANTICUERPOS ESPECIFICOS Y PROPIEDADES
BACTERICIDAS DEL SUERO SANGUINEO CON
LA INMUNIDAD NATURAL PARA LA
BRUCELLA MELITENSIS."**

TESIS PROFESIONAL

Gloria Antonia Osollo Rodríguez

MEXICO. D. F.

1962



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS
Universidad Femenina de México

"RELACION DEL PROPERDIN, COMPLEMENTO, ANTICUERPOS ESPECIFICOS
Y PROPIEDADES BACTERICIDAS DEL SUERO SANGUINEO CON LA INMUNI
DAD NATURAL PARA LA BRUCELLA MELITENSIS"

T E S I S

Que para su examen profesional de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

presenta:

GLORIA ANTONIA OSOLLO RODRIGUEZ.

Con profundo cariño y veneración
a mis padres:

Sr. José Ocello Cortés

y

Sra. Josefina Rodríguez de Ocello.

Quienes sin reparar en sacrificios,
para forjar mi destino, han
hecho realidad mi más
grande anhelo.

Con fraternal cariño a mi
querida hermana:
Zenaida Osollo R.

A quien estoy muy agradecida porque
supo alentarme con sus consejos
y por quien elegí la carrera.

A mis queridos tios:

Rafael Osollo C.
Petra Cornejo de Osollo
Rita Osollo y
Carmen R. Vda. de Martines.

Al Dr. Alberto P. León.

**Con todo respeto, admiración
y gratitud por la acertada
dirección de ésta tesis.**

A mis queridos maestros:

Que con sus enseñanzas y sus sabios
consejos, supieron encausar mis dudas;
por tanto debo la más profunda gratitud
y respeto.

A la memoria de mis queridos maestros.

A mis queridas escuelas:

Universidad Femenina de México y

Facultad de Ciencias Químicas.

**Al Instituto de Enfermedades Tropicales
en donde fué posible una realidad
agradeciendo a todos los que me ayu-
daron a realizarla.**

**Con todo cariño a mis compañeros
y amigos.**

RESPETUOSAMENTE AL HONORABLE JURADO:

Alfredo Sánchez Marroquin

Paula Coppola de Rivas

Oscar Amor Dodero

Catalina Grosco V

Ignacio Raudón G.

INMUNIDAD NATURAL INNATA PARA LA BRUCELLA MELITENSIS

- I.- Su relación con el Properdín, Complemento,
las propiedades bactericidas del suero y
la formación de anticuerpos específicos.

Es un hecho bien conocido que entre animales de una misma especie existen diferentes grados de resistencia natural frente a las infecciones, fenómeno al cual se le da el nombre de INMUNIDAD NATURAL INDIVIDUAL y cuando el hecho, también conocido es común a todos los miembros de una misma familia (descendientes de una misma pareja) se designa como INMUNIDAD FAMILIAR. Una y otra son formas de la Inmunidad Natural Innata y parecen ser una característica hereditaria. Ni los factores de los cuales depende, ni los modos como se hereda la Inmunidad Innata son bien conocidos. Tampoco se sabe mucho contra cuales infecciones y en que especie de animales se observa éste tipo de Inmunidad.

En los últimos años varios investigadores han tratado de estudiar éste problema por la experimentación directa y sus resultados indican que es posible aumentar o disminuir la resistencia promedio de cepas de ratas, ratones y otros animales por medio de cruces selectivas. Entre éstos investigadores se encuentran Webster (1923, 1924, 1925, 1933a,b), Pritchett (1925, 1926a,b), Lambert y Knox (1928), Irwin (1929, 1933), Schott (1932), Gowen (1933), Schütze (1936) y Gowen y Calhoun (1943).

Por lo tanto las investigaciones sobre la Inmunidad Innata frente a determinada infección y en alguna o varias especies animales, serán de interés científico por ampliar los conocimientos sobre sus factores determinantes y las leyes que rigen su herencia, así

como porque pueden ser también de utilidad práctica.

En el curso de nuestras investigaciones sobre inmunización artificial contra Brucella melitensis en varias especies animales, especialmente en conejos y cabras, al inocularlos por la vía oral que se consideró la ruta natural de infección probablemente más frecuente, se observó que una importante proporción de los animales no se infectaban a pesar de inocularse con dosis fuertes y repetidas; de donde inferimos que en esos animales probablemente existía inmunidad innata, individual ó familiar cuyos hechos nos propusimos investigar, para precisar:

- 1) Si en realidad existe inmunidad innata a la Brucella melitensis;
- 2) los factores de que dependa;
- 3) si es hereditaria y
- 4) los modos o leyes de su herencia.

El presente trabajo tiene por objeto referir las investigaciones realizadas y los resultados obtenidos hasta el presente en relación con los dos primeros puntos de éste tema.

Proyecto, material y métodos.

La investigación fué proyectada para averiguar los siguientes puntos:

I.- Si existe Inmunidad Natural Innata para la Brucella melitensis en individuos de las especies caprina y conejuna.

II.- Si se observa éste tipo de inmunidad depende de:

a) La existencia en la sangre de los animales inmunes de una mayor proporción de los factores inespecíficos de la inmunidad, tales como el Properdín, el Complemento y las propiedades bactericidas del suero ?

b) De una inmunidad potencial específica o sea, mayor aptitud para dar una respuesta enérgica y rápida al estímulo antigénico, formando anticuerpos específicos?

Para resolver el primer punto, es decir, si existe inmunidad natural innata en individuos de las especies animales en estudio, cabras y conejos, contra la infección por Brucella melitensis introducida por la ruta natural de infección, se inoculó un lote de 10 conejos y un lote de 7 cabras con Brucella melitensis por vía oral. Los conejos fueron seleccionados aproximadamente del mismo peso, (cerca de 2 kilogramos) y edad, de los criados en local especial de éste Instituto, descendientes de una misma pareja.

Las cabras eran seis hembras y un macho, procedentes del mismo redil, criadas en éste Instituto y aproximadamente de 12 a 14 kilogramos de peso.

El inóculo fué una suspensión de la Brucella melitensis "8", virulenta, cuya dosis L_{50} para el ratón blanco era de 55 millones de gérmenes suspendidos en mucina gástrica e inoculados por vía intraperitoneal según técnica de León y Cano (1950) y cuya dosis mínima infectante por vía oral para el conejo (D.I.O.C.) fué de 100 millones de gérmenes, suspendidos en leche estéril.

Los conejos fueron inoculados por vía oral con 200 millones de gérmenes (2 D.I.O.C.) suspendidos en 5 c.c. de leche descremada estéril. Las cabras fueron inoculadas con 1000 millones de gérmenes (10 D.I.O.C.) suspendidos en 10 c.c. de leche descremada esteril. La inoculación por vía oral se hizo a los conejos por medio de una aguja de rúquia y a las cabras por medio de una sonda vesical metálica soldada a un ajuste de jeringa, ambas provistas de una esfera de plomo en la punta para evitar traumatismos.

Antes de inocular a los animales por vía oral se les practicaron las siguientes investigaciones en el suero sanguíneo:

A los conejos Titulación del Properdín, del Complemento y de las propiedades bactericidas del suero; con objeto de conocer los títulos de los factores inespecíficos de la inmunidad. A los conejos y las cabras: titulación de las aglutininas para la Brucella melitensis con la técnica de Eddleson y Abell (1928), determinación del Índice Opsonocitofágico y Fijación del Complemento a la Brucella melitensis, con objeto de descartar una previa infección natural por éste germen.

A partir de la segunda semana los conejos y de la primera semana las cabras, después de la inoculación oral, y periódicamente después, fueron sangrados para practicarlas todas o algunas de las siguientes reacciones:

- a) Titulación de las aglutininas
- b) Fijación del Complemento
- c) Índice Opsonocitofágico y
- d) Hemocultivos.

Estas reacciones se practicaron con objeto de conocer cuales animales se infectaron y cuales resistieron la inoculación y no se infectaron después de la inoculación oral. Una vez precisado lo anterior, todos los animales fueron reinoculados por la vía subcutánea, los conejos con 55 millones de gérmenes o sea 1 D.I. OR, suspendidos en 1 cc. de mucina gástrica al 3%.

Los conejos fueron sangrados 2, 4, y 7 semanas después de la inoculación y las cabras periódicamente, y hasta el séptimo mes después de inoculadas subcutáneamente, para practicar las siguientes reacciones: Titulación de las aglutininas para Brucella meli-

tensio y hemocultivos con todas las sangrias y eventualmente de-terminación del Índice Opsono-citofágico y Título de la Fijación del complemento, para determinar si los animales inmunes a la inoculación por vía oral le eran también a la inoculación por vía pa-renteral, así como la capacidad de cada animal para responder a la inoculación parenteral con la formación de anticuerpos especí-ficos, o sea conocer su inmunidad potencial y si éste hecho tenía alguna relación con la inmunidad innata observada frente a la ino-culación oral.

Técnica de las reacciones y preparación de los reactivos

a) Titulación del Properdín.

Símbolos usados en ésta titulación:

- | | |
|-----------------|-------------------------------------|
| P | Properdín |
| HP | Suero deficiente en Properdín |
| Z | Zymosín |
| PZ | Complejo Properdín-Zymosín |
| C' | Complemento |
| C' ₁ | Primer componente del Complemento |
| C' ₂ | Segundo " " " |
| C' ₃ | Tercer " " " |
| C' ₄ | Cuarto " " " |
| R ₁ | Suero deficiente de C' ₁ |
| R ₂ | Suero " " C' ₂ |
| R ₃ | Suero " " C' ₃ |
| R ₄ | Suero " " C' ₄ |
| G.R. | Glóbulos rojos de conejo. |
| Hem. | Hemolisina. |

Preparación de reactivos

Zymosan.- El que se usó en éste estudio fué el lote No. B 298 Tipo A de The Fleischman Laboratories, Stand Brands Incorporated.

Cada lote de Zymosán debe ser probado para obtener la mínima cantidad requerida específicamente para inactivar el tercer componente del complemento (C₃). Para ésto primero se prepara una solución Stock de la cual se toma la cantidad necesaria en cada caso.

Preparación de la Solución Stock de Zymosán.

Se siguió la técnica descrita por Pillemer et. al., (1956), con pequeña modificación en la práctica.

Se pesan exactamente y analíticamente 500 mg de zymosán, en cápsula de porcelana se suspenden con 20 ml. de Buffer barbital y se calienta a ebullición, durante 1 hora en B.M. moviéndolo se constantemente hasta formar una suspensión homogénea.

Después se afora a 100 ml. con el mismo Buffer de pH 7.4. Queda así una suspensión 0.20 ml. que equivalen a 1 mg. de zymosán.

En ésta forma se guarda a un grado centígrado durante un mes. Cada vez que se usó se agitó para homogeneizar la suspensión.

Estandarización del Zymosán.

Para ésto se requiere de sueros de cobayo, se sangran por punción cardíaca sin anestecia en ayunas, y la sangre así obtenida se deja a la temperatura ambiente por espacio de 2 horas,

se separa el coágulo y se guarda en el refrigerador toda la noche, para el día siguiente separar el suero.

De la solución Stock de zymosán se miden cantidades en ml. que contengan 2, 3, 4 y 5 mg. de zymosán, las cuales se ponen en tubos de hemolisis y se centrifugan durante 15 ó 20 minutos a 3 mil r.p.m., el sobrenadante se quita y al precipitado se le agrega 1 c.c. del suero de cobayo. Se numeran los tubos, se agitan y se ponen en B.M. durante 1 hora a 37°C agitando los tubos de vez en cuando para homogeneizar la mezcla. Después de la incubación son centrifugados nuevamente los tubos y el sobrenadante es probado para saber la cantidad de zymosán que inactiva totalmente el C'_3 .

Para esta se pone 0.1 c.c. del sobrenadante (R_3) suero deficiente de C'_3 frente a un sistema hemolítico de células sensibilizadas de carnero con 4 unidades de hemolisina, se incuban a 37°C durante 30 minutos en B. M., con testigo para sistema hemolítico y de glóbulos rojos. Se hace la lectura y la cantidad mínima en que no hay hemolisis es la que inactiva totalmente a C'_3 .

Determinación de la cantidad óptima de Zymosán para inactivar totalmente el C'_3

Tubos	Suero	Zymosán	R_3	S. erig.	C.R.+Hem.	Lectura
1	10.c	2 mg.	incu-	0.1c.c.	- c.c.	10.c incubar ++
2	1	3	bar en	0.1	-	1 a 37°C ***
3	1	4	B.M.	0.1	-	1 duran- ****
4	1	5	a 37°C	0.1	-	1 te 30' ****
5	-	-	en	-	0.1	1 en B.M. -
6	-	-	1 h.	-	-	1 ****

La cantidad mínima que se determinó fué de 5 mg. para inactivar totalmente el C'_3 .

Preparación de reactivos RP y R₃

A partir de sueros de cobayos en ayunas, se sangran por punción cardíaca en número de 10 a 15 cobayos sanos y adultos, se dejan los tubos con la sangre a la temperatura del laboratorio por espacio de dos horas; se remueve el coágulo y se guardan a 1°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugan por 30 minutos a 4°C, se separa el suero en tubos, en cantidades de 1 c.c. y se guardan en congeladora a -20°C hasta su uso.

Como requisito debe ser titulado el suero de su contenido en complemento, el cual no debe ser menor de 25 unidades por ml. de suero.

Titulación del complemento de cuyo uso para la preparación de los reactivos RP y R₃. Se diluye el complemento 1:30 con Buffer barbital.

<u>Tubos</u>	<u>Suero(1:30)</u>	<u>Buffer</u>	<u>G.R. Hem.</u>	<u>Lepturas</u>
1	0.1 c.c.	0.40 c.c.	1 c.c.	++++
2	0.15	0.35	1	Incubar
3	0.20	0.30	1	a 37°C
4	0.25	0.25	1	durante
5	0.30	0.20	1	30 minu-
6	0.35	0.15	1	tos en
7	0.40	0.10	1	B.M.
8	0.45	0.05	1	-
9	0.50	-	1	-
10	-	0.50	1	++++

Para determinar cuantas unidades contiene el complemento se divide la dilución 1:30 entre la cantidad mínima de suero que produce hemólisis completa de 1 c.c. de células sensibilizadas de

carnero en un volúmen final de 1.5 c.c. después de incubar a 37°C durante 30 minutos. En éste caso el suero tuvo 85.6 unidades por c.c. ($\frac{30}{0.35} = 85.6$)

Preparación de RP (suero deficiente en Properdín)

De la solución Stock de symosán se mide la cantidad necesaria (5 mg. para 1 c.c. de suero de cobayo) de acuerdo con la cantidad de suero que se vaya a preparar para reactivo. En un tubo de ensayo se centrifuga durante 30 minutos a 3,000 r.p.m. Al sedimento que queda se adiciona el suero con mucho cuidado y se agita para ponerse en contacto con el symosán, una vez así se mantiene en B.M. a 17°C de temperatura constante durante 75 minutos. El control de temperatura es muy importante ya que temperaturas menores de 15°C dan por resultado una separación incompleta del Properdín del suero, mientras que temperaturas mayores de 18°C producen una pérdida mayor de la actividad de C₃. La mezcla debe agitarse manualmente cada 10 minutos. Terminado el tiempo de incubación se centrifuga nuevamente de tres a cuatro mil r.p.m. durante 30 minutos a 2°C, (en éste caso por no haber centrifuga refrigerante, se usó una centrifuga pequeña de cuatro tubos con cantidad medida de hielo seco en trozos, que se depositaban en el fondo de la misma, dejando libre el movimiento, logrando así bajar la temperatura hasta 1° a 2°C) El sobrenadante claro es distribuido en tubos conteniendo 5 c.c. cada uno de RP, y se almacenó en congeladora a - 20°C hasta su uso. Así se mantuvo activo hasta seis semanas. (El sedimento P^Z se usa para preparar R₃).

Normalización de RP

a) Un RP adecuado deberá tener al menos el 75% del título del complemento del suero original.

- b) No deberá ser anticomplementario contra suero fresco ó alguno de los reactivos del suero empleados en la Titulación del Properdín.
- c) El RP debe ser deficiente sólo en Properdín pero debe contener cantidades adecuadas de C_1' , C_2' , C_3' , C_8' , para la hemolisis de células sensibles de borrego en el ensayo final de Properdín.

Preparación de R_3 (suero deficiente en C_3')

Se hace la mezcla de xmozán con suero de cobayo como en RP. La mezcla es incubada en B.M. a 37°C durante 60 minutos agitando periódicamente cada 10 minutos y terminado el tiempo de incubación el sobrenadante claro es transvasado al tubo que contiene el complejo PZ, se agita y se incuba nuevamente a 37°C durante 60 minutos, moviendo la mezcla cada 10 minutos. Se centrifuga después de 1°C durante 30 minutos. El sobrenadante claro es envasado en tubos con cantidades de 1 c.c. y mantenido a -20°C en congeladora hasta su uso.

Estandarización de R_3

R_3 debe llenar los siguientes requisitos:

- a) 0.1 c.c. de R_3 más 1 c.c. de G.R. sensibilizados con hemolisis no debe hemolizar como se observa en la siguiente prueba:

<u>Tubo</u>	<u>R_3</u>	<u>Suero original</u>	<u>G.R.+hem.</u>	<u>Lectura:</u>
1	0.1 c.c.	- /	1 c.c. incubar	+++
2	-	-	1 a 37°C	+++
3	-	0.1 c.c.	1 en $30'$	-

b) 0.05 c.c. de R_3 aumentaría por lo menos el 200% del título del complemento original, añadiendo a esa cantidad de R_3 0.10 c.c. de una dilución 1:15 de suero fresco de cobayo.

c) RP tratado con Zymosán a 37°C durante 60 minutos y comparado con RP sin tratar en las siguientes mezclas:

0.05 c.c. de R_3 para 1 c.c. de RP tratado con zymosán.

0.05 c.c. de R_3 para 1 c.c. de RP sin tratar.

Debe dar un título no menor de 120 unidades por c.c. de C_3^1 en RP sin tratar y no menor de 90 unidades por c.c. de C_3^1 en RP previamente tratado con zymosán a 37°C durante 1 hora.

Titulación de C_3^1 en RP sin tratar

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	Diluciones
0.2 c.c.	0.2	0.2	0.2	0.2	c.c. de RP
0.024	0.024	0.024	0.024	0.24	c.c. de R_3 (2 unidades)
0.276	0.276	0.276	0.276	0.276	c.c. de Puffer (ajustar a 0.50)
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	c.c. de G.R. + Hem.

Incubar a 37°C durante 30'

Esta misma titulación se hace con RP tratado con zymosán y después de la incubación se procede a la lectura:

Dilución: Lectura de RP tratado más R_3 Lectura de RP sin tratar más R_3

1:1	-	-
1:2	•	•
1:3	•• 50%	±
1:4	•••	•• 50%
1:8	••••	••••
1:16	••••	••••

Testigo de Glóbulos rojos ••••

Testigo de sistema hemolítico -

Nota: La dilución que da el 50% de hemolisis se multiplica por 7.5 (que es igual a la dilución de C_3 con los reactivos).

En éste caso el 50% fué:

Para RP tratado en la dilución 1:3 resultando 112.5 unidades.

para RP sin tratar en la dilución 1:4 resultando 150 unidades.

Definición de unidades.

R_3 .- Una unidad de R_3 es igual al volúmen más pequeño del suero original del que fué preparado que cuando se agrega a 1 c.c. de células sensibilizadas de borrego en un volúmen final de 1.5 c.c. hemolisan 100% de las células en 30 minutos a 37°C . Por ejemplo, si 0.12 c.c. de una dilución 1:5 del suero original antes de preparar R_3 da el 100% de hemolisis, entonces 2 unidades de R_3 preparado de éste suero, está contenida en $2 \times 0.12/5 = 0.05$ c.c.

Determinación de la Unidad d R_3

Se dispone de una serie de once tubos de hemolisis, y como reactivos se preparan G.R. sensibilizados con hemolisina (técnica descrita anteriormente en titulación del complemento) y el Buffer barbital. En cada tubo se mide el suero del cual se preparó R_3 y el Buffer con pipeta de 0.2 c.c. graduada en 0.001 c.c. y con otra en 1 c.c. los glóbulos rojos sensibilizados, hasta un volúmen final en cada tubo de 1.5 c.c. Se incuban a 37°C durante 30 minutos.

Dicha determinación se puede observar objetivamente en forma de cuadro para seguir cuidadosamente los pasos que se hicieron, y la lectura que se obtuvo después de incubar los tubos.

<u>Tubo</u>	<u>Suero (1:5)</u>	<u>Buffer</u>	<u>G. R. + Neg.</u>	<u>Lectura:</u>
1	0.005	0.495	1.0 c.c.
2	0.01	0.490	1.0	incubar
3	0.02	0.48	1.0	a 37°C
4	0.03	0.47	1.0	durante
5	0.04	0.46	1.0	30 minutos
6	0.05	0.45	1.0	en B.M.
7	0.06	0.44	1.0	-
8	0.07	0.43	1.0	-
9	0.08	0.42	1.0	-
10	0.09	0.41	1.0	-
11	-	0.50	1.0

Una unidad es 0.06 (1:5) por lo tanto 2 unidades están en:

$0.12/5 = 0.024$ c.c. de R_3 sin diluir.

Definición de C_3'

Una unidad de C_3' es aquella cantidad que, en la presencia de dos unidades (generalmente 0.05 c.c.) de R_3 y 1 c.c. de células sensibles de borrego en un volumen final de 1.5 c.c. hemolisa el 50% de las células en 30 minutos a 37°C. Por ejemplo: si 0.2 c.c. de una dilución 1:24 de la muestra da 50% de hemolisis, bajo estas condiciones, la concentración de C_3' es $24/0.2 = 120$ unidades por c.c.

Definición de Properdín

Una unidad de properdín es aquella cantidad, que en la presencia de una cantidad óptima de zymosán (5mg) inactiva completamente 20 unidades de C_3' en 1 c.c. de HF en 1 hora a 37°C. Por ejemplo:

el 0.1 c.c. de la muestra es la mínima cantidad que completamente inactiva 120 unidades de C_3 en 1 c.c. de RP en la presencia de Zymosán, la muestra contiene $1/0.1 = 10$ unidades de Properdín por c.c.

Titulación de Properdín

Reactivos empleados:

- 1) Solución Stock de Zymosán (0.20 ml. = 1 mg.) 5 mg. por cada ml. de suero problema.
- 2) RP sin diluir (0.25 ml. para cada tubo)
- 3) E_3 sin diluir (0.024 ml. equivalentes a 2 unidades)
- 4) Suero problema (de conejo sin diluir)
- 5) Buffer barbital (con pH 7.4 para ajustar cantidades y contener iones de Mg^{++} y Ca^{++}).
- 6) Glóbulos rojos de carnero (sensibilizados con hemolisina).

Nota: Antes de la preparación de los reactivos de RP y E_3 a partir de suero de cobayo, se hicieron pruebas para prepararlos a partir de suero humano, pero por no cumplir los requisitos necesarios no se usaron, preparándose entonces solamente a partir de suero de cobayo.

Pasos que se siguieron para la Titulación de Properdín.

- 1) Se numeran 9 tubos de hemolisis y se colocan en una gradilla que esté sobre un baño de hielo, en los tubos de 1 al 6 se miden 5 mg. de zymosán de la sol. Stock, se centrifugan todos los tubos a 3 mil r.p.m. durante 15 minutos y el sobrenadante se tira.
- 2) Se adiciona a cada tubo 0.25 c.c. de RP excepto el 9
- 3) Se adicionan a los 5 primeros tubos cantidades decrecientes del suero problema de conejo (0.25, 0.125, 0.060, 0.030 y

- 0.015). Los tubos 8 y 9 llevan 0.25 c.c. cada uno para control.
- 4) Se adiciona la cantidad necesaria de Buffer Barbital para ajustar a un volumen de 0.75 c.c. (hasta aquí el baño de hielo)
 - 5) Se tapa cada tubo con tapón de hule, se agitan y se incuban a 37°C durante 1 hora en B.M. con agitación periódica cada 10 minutos.
 - 6) Se centrifugan por 10 minutos a 2 mil r.p.m. y el sobrenadante se pasa a otra serie de tubos igualmente numerados. La siguiente parte es determinar la concentración de C_1 en los sobrenadantes obtenidos.
 - 7) Con cada sobrenadante del paso 6 se hacen diluciones: 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, y 1:16 con Buffer barbital tomando 0.2 c.c. de cada dilución en otra nueva serie de tubos.
 - 8) Se adicionan 2 unidades de R_3 (0.024 ml.) a cada tubo de cada dilución.
 - 9) Ajustar con Buffer barbital a 0.50 ml.
 - 10) Adicionar a todos los tubos G.R.-Em. (células sensibilizadas de carnero conteniendo 4 unidades de hemolisina) 1 ml. para obtener un volumen final de 1.5 c.c.
 - 11) Se incuban a 37°C durante 30 minutos.
 - 12) Se sacan del baño a 37°C , se guardan en el refrigerador a 6 ó 4°C y se hace la lectura al día siguiente.

Tubos de control:

Nota: de los tubos 7, 8 y 9 se hacen diluciones hasta 1:4 solamente.

Tubo 6.- Es testigo para observar la pérdida de C_1 en RP

Tubo 7.- Es para observar la concentración de C_3 en RP

Tubo 8.- Es testigo de actividad anticomplementaria de RP

Tubo 9.- Es testigo de la actividad anticomplementaria de la muestra.

Cuadro de la Titulación de Progerdín.

Tubos	Sol. Stock de Eryceán	RP sin diluir	Suero prob. de conejo	Buffer ajustar a 0.75 ml.
1	5 mg.	0.25 ml.	0.25 ml.	0.15 ml.
2	5 mg.	0.25	0.125	0.275
3	5 mg.	0.25	0.060	0.34
4	5 mg.	0.25	0.030	0.37
5	5 mg.	0.25	0.015	0.385
6	5 mg.	0.25	-	0.50
7	-	0.25	-	0.50
8	-	0.25	0.25	0.25
9	-	-	0.25	0.50

Todos los tubos en baño de hielo

Tapar cada tubo e incubar a 37°C durante 1 hora, agitando periódicamente cada 10 minutos, después se centrifuga todos los tubos a 2 mil r.p.m. durante 10 minutos y el sobrenadante se pasa a otra serie de tubos numerados igual y con cada uno se hacen diluciones como sigue:

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	diluciones
0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	ml. del sobrenadante
0.024	0.024	0.024	0.024	0.024	ml. de R_3 (2 unidades)
0.276	0.276	0.276	0.276	0.276	ml. de Buffer (ajustar 0.50)
1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	ml. de G.R. + Hem.

incubar a 37°C durante 30'

La lectura se hace tomando en cuenta el 50% de hemolisis de la dilución que contenga la cantidad mínima de muestra (suero problema). Si el 50% de hemolisis está intermedio entre dos diluciones, entonces se toma como punto final la intermedia entre esas dos diluciones.

Para determinar la unidad de Propiedad, se divide la unidad entre la cantidad de muestra mínima que da el 50% de hemolisis (tomando la intermedia) después el resultado se multiplica por la recíproca la dilución en que se encuentra y finalmente se divide el resultado entre 4 por ser la cuarta parte de RP (0.25 c.c.) sin diluir. Por ejemplo: se hizo la lectura en la dilución 1:8 del tubo que contiene 0.25 c.c. de suero de conejo problema, por lo tanto el cálculo es: $\frac{1}{0.25} \times 8 = 8$ unidades.

b) Titulación del complemento

En la titulación del complemento, tanto para usarlo en las reacciones de Fijación del complemento al antígeno de Brucella melitensis como en las determinaciones del contenido de éste complejo por los sueros de los conejos, se siguió la técnica descrita por Kolmer y Boerner (1938), un protocolo de la cual se detalla en los cuadros Nos. I y II. La titulación del complemento que se usó como reactivo en la reacción de Fijación del Complemento se hizo en presencia de dos unidades antigénicas del antígeno de Brucella melitensis, en un volumen total de 3 c.c. y con tres clases de sueros de 5 ó más cobayos; en cambio en las titulaciones que se hicieron para determinar el contenido en complemento por los sueros sanguíneos de los conejos de nuestra investigación, se hizo sin antígeno en un volumen total de 1.5 c.c. e individual y separadamente para cada suero. Las diluciones de los sueros se hicieron con Buffer barbital según lo indican Alsever y Ainslie

(1941). En las reacciones de fijación del complemento se usaron dos unidades completas (U.C.) de complemento en 1 c.c. de la solución y solamente se usaron sueros con 30 U.C. ó más por c.c.

CUADRO No. I

Titulación del complemento en el suero de los cobayos usados en reacciones de fijación del complemento.

Tubo	Suero 1:30 c.c.	Antígeno Br. meli- tensis.	Sol. salí na. c.c.	Hem. G.R. c.c. 2% c.c.	Lectura:	
1	0.1	0.5	1.4	0.5	0.5	****
2	0.15	0.5	1.4	durante 0.5	0.5	nueva- ****
3	0.20	0.5	1.3	1 hora 0.5	0.5	mente ****
4	0.25	0.5	1.3	a 37°C 0.5	0.5	a 37°C ****
5	0.30	0.5	1.2	en B.M. 0.5	0.5	durante ****
6	0.35	0.5	1.2	0.5	0.5	1 hora. -
7	0.40	0.5	1.1	0.5	0.5	-
8	0.45	0.5	1.1	0.5	0.5	-
9	0.50	0.5	1.0	0.5	0.5	-
10	-	-	2.5	-	0.5	****
Unidad exacta 0.35			2 unidades completas 0.8			
Unidad completa 0.40			2 unidades en 0.5 c.c. de C' en la dilución 1:37			

CUADRO No. II

Titulación del complemento en el suero de los conejos.

Tubo	Suero de co nejo	Du- ffer c.c.	G.H. Hem. ml.	LECTURAS DEL GRADO DE HEMOLISIS												
				Números de los conejos:												
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1	0.1	0.40	1.0
2	0.15	0.35	1.0	-
3	0.20	0.30	1.0	-	-
4	0.25	0.25	1.0	-	-	-

Tubo	Suero de conejo	Diferencia c.c.	O.H. Hem. ml.	LECTURAS DEL GRADO DE HEMOLISIS.									
				Números de los conejos:									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	0.30	0.20	1.0	-	.	-	-	-	-
6	0.35	0.15	1.0	-	-	-	-	-	-	.	.
7	0.40	0.10	1.0	.	-	-	-	-	-	-	-	.	.
8	0.45	0.05	1.0	.	-	-	-	-	-	-	-	-	.
9	0.50	-	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	.
10	-	0.50	1.0
No. de unidades exactas.....				10	12.5	33.3	14.2	16.6	16.6	25	20	10	-5

Se consideró como unidad exacta la cantidad mínima de suero que produjo hemolisis total.

....	inhibición total de la hemolisis												
...	"	parcial,	75% ó más de glóbulos rojos sin hemolizar										
..	"	"	50% a 75% "	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
.	"	"	25% a 50% "	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
.	"	"	menos de 25%	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
-	Hemolisis total		0%	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"

c) Titulación de las propiedades bactericidas del suero de los conejos.

En ésta prueba usamos la cepa "8" de Brucella melitensis No. 899 de nuestra colección y las siembras se hicieron en gelosa triptosa Difco. Para cada suero problema se pusieron 0.5 c.c. del suero sin diluir en un tubo estéril de hemolisis a los cuales se agregaron 0.5 c.c. de una suspensión de Brucella melitensis en suero fisiológico, preparada de un cultivo de 48 horas en gelosa triptosa y conteniendo 10 000 bacterias por c.c. Se agitaron los tubos para mezclar bien su contenido y se incubaron a 37°C durante 3 horas agitándolos nuevamente a cada media hora. Se puso un testigo del número de bacterias en la

suspensión de Brucella melitensis. Al término del período de incubación se sembró 0.1 c.c. de cada muestra en cada uno de otros tantos tubos con 15 c.c. de gelosa triptosa Difco mantenida fluida a la temperatura de 43-50°C, se mezclaron bien y se vertió su contenido en cada una de otras tantas cajas de Petri que luego de solidificarse se incubaron a 37°C durante 72 horas. Al término de este período se contaron las colonias desarrolladas, con la ayuda de un microscopio estereoscópico con un aumento de 20 diámetros. Se hizo la cuenta del número de colonias en 15 campos y se calculó el número promedio por campo, el que se anotó en los resultados.

d) Titulación de las aglutininas de los sueros para la Brucella melitensis.

Para la investigación de la presencia de aglutininas para la Brucella melitensis y su titulación en los sueros sanguíneos de los conejos y cabras, antes y después de ser inoculados por vía oral y subcutánea con Brucella melitensis. Se siguió la técnica de Huddleson y Abell (1928). En los resultados se anotó como título de aglutinación de las diluciones máximas de los sueros que aglutinaron al antígeno.

e) Fijación del Complemento.

Para la reacción de Fijación del Complemento se siguió la técnica descrita por Kolmer y Boerner (1938). Los reactivos empleados tuvieron las siguientes características:

- I) Glóbulos rojos de carnero.- Se preparó la suspensión al 2% en Buffer barbital a partir de sangre de carnero conservada en solución de Alsever (1941). En la reacción de Fijación del Complemento se emplearon 0.5 c.c. de la suspensión al 2%.
- II) Hemolisina.- Se usó la solución madre al 1:100 de Difco y se tituló según la técnica descrita por Kolmer y Boerner (loc. cit),

en las reacciones de Fijación del complemento se emplearon 0.5 c.c. conteniendo 2 unidades hemolíticas.

- III) Complemento.- Como anteriormente se indicó se usó la mezcla de varios cobayos, se tituló conforme a la técnica descrita por Kolmer y Boerner (loc. cit.) y en la reacción se emplearon 2 unidades completas en 1 c.c.
- IV) Antígeno.- Se usó un antígeno de Brucella melitensis preparado y titulado conforme a las técnicas descritas por León y Bernal (1943). En las reacciones de Fijación del complemento se usaron 2 unidades antigénicas (2 U.A.) en 0.5 c.c., las cuales se encontraron en una dilución del antígeno al 1:200. El antígeno no presentó propiedades hemolíticas ni anticomplementarias en titulaciones periódicas que se hicieron de éstas propiedades siguiendo las técnicas descritas por Kolmer y Boerner (loc. cit.), para antígenos bacterianos.
- V) Sueros problema.- Los sueros se obtuvieron por punción del corazón de los conejos y de la vena yugular externa de las cabras. Se dejaron coagular y coágulo retraerse a la temperatura del laboratorio durante 18 horas. El suero fue separado y si es necesario centrifugarse para liberarlo de glóbulos rojos. Los sueros se conservaron en tubos de ensayo con tapón de hule a la temperatura de 4°C a 10°C hasta el día en que se usaron, generalmente menos de un mes, y se inactivaron a la temperatura de 56°C durante 30 minutos el mismo día en que se hizo la reacción de Fijación del Complemento.

Técnica de la reacción.

Se usaron 12 tubos de hemolisis para cada suero problema; además un testigo con suero positivo conocido, un testigo con suero negativo conocido, testigo de actividad anticomplementaria

del antígeno, del sistema hemolítico y de la suspensión de los glóbulos rojos. En el primer tubo se pusieron 1.4 c.c. de suero fisiológico y 0.5 c.c. en los siguientes hasta el 14avo. tubo. Al primer tubo se agregaron 0.6 c.c. del suero problema, se mezclaron bien y se transfirieron 0.5 c.c. al segundo y al 10mo. tubos, nuevamente se mezclaron bien y se transfirieron sucesivamente de tubo en tubo 0.5 c.c. del 2do. al 9mo. y del 11vo. al 14vo. tubos. Las diluciones finales de los sueros y sus testigos, las cantidades que se adicionaron de los demás reactivos y demás detalles de la técnica se especifican a continuación. En el cuadro No. III.

CUADRO No. III

Técnica de la reacción de fijación del complemento

Tubo	Suero Prob. 0.5c.c.	Antígeno 2 U.c.c.	Joi. Salina c.c.	Comple-mento 2 U.C.	Hem. 2 U. c.c.	Susp. G.R. 2%	
1	1:20	0.5	-	1.0	0.5	0.5	
2	1:40	0.5	-	agi-	1.0	agi-	0.5
3	1:80	0.5	-	tar	1.0	tar	0.5 mezclar
4	1:160	0.5	-	cada	1.0	cada	0.5 bien
5	1:320	0.5	-	tubo	1.0	tubo	0.5 y
6	1:640	0.5	-	y	1.0	y	0.5 poner
7	1:1280	0.5	-	reponer	1.0	poner	0.5 todos
8	1:2560	0.5	-	los	1.0	los	0.5 los
9	1:5120	0.5	-	30' a	1.0	2 ha.	0.5 0.5 tubos
Testigos:							
10	1:20	-	0.5	la tem	1.0	a B.M.	0.5 0.5 a B.M.
11	1:40	-	0.5	para	1.0	a la	0.5 0.5 durante
12	1:80	-	0.5	tura	1.0	tempe	0.5 0.5 1 hora
13	1:160	-	0.5	del	1.0	ratu-	0.5 0.5 a la
14	1:320	-	0.5	labo	1.0	ra	0.5 0.5 tempera-
15	1:20 S.	0.5	-	rato	1.0	de	0.5 0.5 tura de
16	1:20 S-	0.5	-	rio	1.0	37°C	0.5 0.5 37°C
17	-	0.5	0.5	-	1.0	-	0.5 0.5
18	-	-	1.0	-	1.0	-	0.5 0.5
19	-	-	2.5	-	-	-	0.5 0.5

Los tubos Nos. 10 al 14 son testigos de actividad anticomplementaria del suero problema.

El tubo No. 15 es testigo con suero positivo conocido.

El tubo No. 16 es testigo con suero negativo conocido.

El tubo No. 17 es testigo de actividad anticomplementaria del antígeno.

El tubo No. 18 es testigo del sistema hemolítico.

El tubo No. 19 es testigo de la suspensión de glóbulos rojos.

f) Indice Opsono-citofágico

En la determinación del Índice Opsono-citofágico de la sangre de los conejos y cabras para la Brucella melitensis, se siguió la técnica de Jersild (1941), usando para la coloración de los frotos la técnica de León (1948). La actividad fagocitaria de las células se clasificó según Huddleson, Johnson y Hamman (1933) en:

Negativo. Cuando no hubo fagocitosis

Débil. cuando el promedio de bacterias fagocitadas por leucocito polimorfonuclear joven fué menor de 20

Moderado. cuando fué el promedio de 20 a 40 bacterias fagocitadas

Intenso. cuando fué mayor a 40 bacterias fagocitadas.

RESULTADOS

Ausencia de infección natural por Brucella melitensis previa a la experimentación. - Ninguno de los 10 conejos y las siete cabras que usamos en nuestra investigación habían sido infectadas con Brucella melitensis previamente a nuestros experimentos, ha juzgar por la ausencia completa de anticuerpos específicos en su suero sanguíneo - es decir, las reacciones de aglutinación, el Índice Opsono-citofágico y la fijación del complemento a la Brucella

melitensis, fuerza negativa con los sueros de todos los animales. Véase el primer renglón de los cuadros Nos. IV y V.

Inmunidad natural innata a la infección oral por *Brucella melitensis*.- Cuatro de los diez conejos y dos de las siete cabras mostraron inmunidad natural innata a la infección por vía oral con *Brucella melitensis*, a juzgar por la negatividad persistente en todas las reacciones serológicas, reacción de Huddleson y de Fijación del complemento, así como los hemocultivos, durante todo el período del estudio; contrariamente a lo observado en los 6 conejos y 5 cabras restantes, en los que esas reacciones fueron consistentemente positivas y en una cabra también el hemocultivo fué positivo, como puede observarse en los cuadros Nos. IV y V.

Ausencia de relación entre la inmunidad natural innata a la infección por vía oral con *Brucella melitensis* y los factores inespecíficos de la inmunidad.- En el cuadro No. VI se observa que el contenido de Properdín en el suero de los 10 conejos varió entre 8.0 y 16.6 unidades por c.c.; el contenido de complemento varió entre 5.33 unidades y las propiedades bactericidas o bacteriológicas de los sueros se manifestaron con un desarrollo de colonias de *Brucella melitensis* que varió entre 2 y 200 por campo. Comparados los resultados observados en los conejos que no se infectaron después de la inoculación oral con los observados en los que sí se infectaron, no se encuentra una definida relación entre los factores inespecíficos de la inmunidad y la resistencia a la infección con *Brucella melitensis* por vía oral, pues lo mismo resistieron la infección conejos con alto que con bajo contenido en éstos factores que se infectaron por igual los que tuvieron alto o bajo el conte-

nido de los mismos.

CUADRO No. VI

Ausencia de relación entre la susceptibilidad y la inmunidad a la infección oral por Brucella melitensis y el contenido de factores inespecíficos de la inmunidad por el suero sanguíneo de 10 conejos.

Conejo No.	Proporcion unidades por c.c.	Complemento unidades por c.c.	Acción bactericida No. de colonias por campo.	Resistencia a la infección oral por <u>Br. melitensis</u> .
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1	16.6	10.6	5	<u>Inmune</u>
2	8.0	12.5	7	Susceptible
3	8.32	33.3	6	Susceptible
4	8.32	14.2	6	<u>Inmune</u>
5	11.1	16.6	9	Susceptible
6	8.3	16.6	2	<u>Inmune</u>
7	11.1	25.0	200	Susceptible
8	11.1	20.0	20	Susceptible
9	8.32	10.0	4	<u>Inmune</u>
10	8.32	-5.0	9	Susceptible
			T ₁ 3	
			T ₂ 200	

T₁ Testigo del número de bacterias en la suspensión.

T₂ Testigo del desarrollo de la Brucella melitensis en presencia de conejo calentado.

Ausencia de inmunidad natural innata a la infección por vía parenteral con *Brucella melitensis*.- Los cuatro conejos y las dos cabras que habían mostrado inmunidad natural innata frente a la infección por vía oral se mostraron totalmente susceptibles frente a la infección por vía parenteral, ha juzgar por la aparición de aglutininas para *Brucella melitensis* a títulos persistentemente positivos de 1:200 a 1:1000 en el suero sanguíneo de éstos conejos y cabras, así como por la positividad del hemocultivo en las cabras, como puede observarse en los cuadros Nos. IV y V.

Ausencia de relación entre inmunidad natural innata y la inmunidad potencial específica.- En los cuadros Nos. IV y V, se observa que después de la inoculación con *Brucella melitensis* por vía parenteral:

a) El título de las aglutininas para éste germen aumentó en todos los conejos y las cabras en relación al que presentaban inmediatamente antes, en los animales que se habían infectado por vía oral, ó se hizo positivo en los casos que eran negativos por no haberse infectado por vía oral, ó se hizo positivo en los casos que eran negativos por no haberse infectado por vía oral;

b) Los títulos máximos de aglutinación alcanzados variaron entre 1:200 y 1:1000.

Comparados los resultados observados en los animales que no se infectaron después de la inoculación oral con los observados en los que sí se infectaron, no se encuentra una definida relación entre los títulos máximos alcanzados ó la rapidez con que se alcanzaron y la resistencia a la infección con *Brucella melitensis* por vía oral que habían mostrado, pues lo mismo resistieron la infección los animales con altos títulos y rápida respuesta que los animales con bajos

títulos y lenta respuesta al estímulo antigénico constituido por la infección parenteral, que se infectaron por igual los que mostraron altos o bajos títulos o rápida o lenta respuesta. Por lo tanto es aparente que no hay relación entre la inmunidad natural innata a la infección por vía oral y la inmunidad potencial específica a la infección por vía parenteral por Brucella melitensis.

Si habiéndose observado que hay inmunidad natural innata a la infección por vía oral con Brucella melitensis no se encuentra relación entre ésta y los factores inespecíficos ni los específicos de la inmunidad demostrables en la sangre, es de inferirse que la inmunidad natural innata en éste caso depende de factores que probablemente actúan en el tubo digestivo y que están quizás presentes en las mucosas que lo revisten. La demostración de la existencia de esos factores y su naturaleza debe ser objeto de posteriores investigaciones.

CONCLUSIONES

1a. Existe en algunos individuos de las especies caprina y conejuna inmunidad natural innata a la infección por vía oral con Brucella melitensis.

2a. Ni los individuos inmunes ni los susceptibles a la infección por vía oral con Brucella melitensis mostraron inmunidad a la inoculación por vía parenteral con los mismos gérmenes.

3a. La inmunidad natural innata a la inoculación por vía oral con Brucella melitensis no depende ni de los factores serológicos inespecíficos ni de los factores serológicos específicos de la inmunidad.

4a. Es de presumirse que la inmunidad natural innata a la inoculación por vía oral a la Brucella melitensis depende de factores inherentes a las mucosas que revisten el tubo digestivo.

CONJUNTO No. IV

REACCIONES INMUNOLÓGICAS - HEMOCULTIOS PRACTICADOS A 10 CONJUNTOS NÚM. DE REACCIONES POR CONJUNTO POR VÍA ORAL Y SUBCUTÁNEA CON BR.

PROYECTO	TÍTULO DE LA REACCIÓN DE AGREGACIÓN										TÍTULO DE LA REACCIÓN DE FLOTACIÓN DE C.										HEMOCULTIVO			
	10 DE CONJUNTO										10 DE CONJUNTO										No.			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4
PROYECTO 1961																								
REACCIÓN DE																								
PROYECTO 1962																								
PROYECTO 1963																								
PROYECTO 1964																								
PROYECTO 1965																								
PROYECTO 1966																								
PROYECTO 1967																								
PROYECTO 1968																								
PROYECTO 1969																								

30 MARZO 1961 REACCIÓN DE AGREGACIÓN CON 500 DE INOCULO PARA CADA CONJUNTO DE REACCIONES (10 DE C.) DE CONJUNTO NÚM. 1961 CON C. SUSPENSA

2 FEBRERO 1962 REACCIÓN DE AGREGACIÓN POR VÍA SUBCUTÁNEA CON UN INOCULO DE 55 MILIONES DE C. DE SUSPENSIÓN EN UNO DE LOS ESTERILIZADOS INYECTANDO 1 C.C. A

Cursos No. IV

• ANIMALES INOCULADOS A 10 CONEJOS ANTES Y PERIODICAMENTE DESPUES
 DEBENTE POR VIA ORAL Y SUBCUTANEA CON BRUCELLA MELITENSIS.

TITULO DE LA REACCION DE FIJACION DE C.										HEMOCULTIVO										INDICE ORSONO CITOPAGICO									
No. DE CONEJO										No. DE CONEJO										No. DE CONEJO									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	2	11	2	11	3	0
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	11	2	11	2	2	2	11	11	11
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	-	-	-	0	0	0
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-			
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
										-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										

PREPARAR UN S.C.C. DE INOCULO PARA CADA CONEJO CONTeniendo 200 MILLONES
 (1) DE BRUCELLA MELITENSIS POR CADA UNO DE LOS DOS ESTOS DESCONTADO.

SUBCUTANEA CON UN INOCULO DE 55 MILLONES DE ORGANISMOS POR UNO DE CADA UNO
 DE LOS DOS ESTOS DESCONTADO 1 C.C. A CADA CONEJO.

0 - SIN
 1 - POCO
 11 - MUCHO

REACCIONES INMUNOLÓGICAS Y HEMOCULTIVOS PERIFÉRICOS A 7 CABROS ANTES Y PERIÓDICAMENTE
DE INOCULACIÓN SUCCESIVAMENTE POR VÍA ORAL Y SUBCUTÁNEA CON BRUCELLA MELITENSIS

PERÍODO DE LA PRUEBA	TÍTULO DE LA REACCIÓN DE AGLOTRINACIÓN							TÍTULO DE LA REACCIÓN DE FLUORESCENCIA							HEMOCULTIVOS					
	Nº DE CÁMERA							Nº DE CÁMERA							Nº DE CÁMERA					
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6
ANTES DE INOCULARSE	-	1.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INOCULACIÓN ORAL																				
DESPUES DE 8 DIAS	1.50	1.00	-	-	-	-	-	1.10	1.00	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DESPUES DE 24 DIAS	1.50	1.50	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DESPUES DE 34 DIAS	1.50	1.00	1.00	-	1.25	-	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DESPUES DE 51 DIAS	1.00	1.00	1.00	-	1.25	-	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DESPUES DE 71 DIAS	1.50	1.00	1.00	-	1.50	-	1.25	1.00	1.00	1.00	-	1.50	-	1.40	-	-	-	-	-	-
DESPUES DE 116 DIAS	1.50	1.00	1.00	-	1.50	-	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DESPUES DE 126 DIAS	1.50	1.00	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INOCULACIÓN POR VÍA SUBCUTÁNEA																				
DESPUES DE 15 DIAS	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-
DESPUES DE 30 DIAS	1.50	1.00	1.00	1.50	1.50	1.50	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
DESPUES DE 60 DIAS	1.50	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	1.00
DESPUES DE 75 DIAS	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-
DESPUES DE 105 DIAS	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	1.00	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-
DESPUES DE 135 DIAS	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	1.00	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-
DESPUES DE 145 DIAS	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.00	-	-
DESPUES DE 195 DIAS	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	1.00	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1.00 = 100% DE REACCIÓN POSITIVA
 0.50 = 50% DE REACCIÓN POSITIVA
 1.50 = 150% DE REACCIÓN POSITIVA
 - = REACCIÓN NEGATIVA ANTES Y DESPUES DE

PRUEBAS Y HEMOCULTIVOS REALIZADOS A 7 CABRAS ANTES Y PERIÓDICAMENTE DESPUÉS DE LA INYECCIÓN SUBCUTÁNEA POR VÍA ORAL Y SUBCUTÁNEA CON BRUCELLA MELITENSIS.

PERSONA	TÍTULO DE LA REACCIÓN DE FUJICIÓN DEL G.							HEMOCULTIVOS							ÍNDICE OPSOMO CITOFÁGICO						
	No. DE CABRA							No. DE CABRA							No. DE CABRA						
	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	1.40	1.520	1.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25								-	-	-	-	-	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-
25	1.640	1.780	1.80	-	1.80	-	1.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500								-	-	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
100								-	-	-	Ar	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-
50								-	-	-	Ar	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-
50								-	-	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25								-	-	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50								-	-	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150								-	-	-	Ar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25								-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ar, 10 D.T.C. = 1000 MILLONES DE GERMINALES

Ar, 1959, 10 D.L. = 550 MILLONES DE GERMINALES

CON 10 MILLONES DE GERMINALES P.C. NEGATIVA ANTES Y ANTES DE MOYER CON LAS CABRAS

REFERENCIAS :

- Alsever, J. B. 1941 " A New Method for the Preparation of Diluted Blood Plasma and the Operation of A. Complete Transfusion Service". New York State J. Med. 41:126
- Aintlie, R. B.
- Baker, E. E., 1943 " Immunochemical Studies on human Serum. I.- Human Complement and its Components". Journal of Immunology 47:185
- L. Fillemer, y
S. Seifter.
- Cohen, J. W. 1933 Quart. Rev. Biol., 8:338
- Coven, J. W. 1943 " Factors affecting Genetic resistance of mice to mouse typhoid". J. Infec. Dis., 73:40-56
- y H.L. Cal-
houn
- Coven, J. W. 1933a, J. Hyg., Camb., 33:370;
1933b, Amer. J. Hyg., 18:674
1933c. Ibid., 18:688
- E. G., Schott.
- Hans Hirs- 1954 Department of Biochemistry, Western Re-
chman. serve University, referido por Fillemer,
L.L., Blum.
- Huddleson, I.F. 1928 " Rapid microscopic agglutination for the serum diagnosis of Bang's abortion disease", J. Inf. Dis. 42:242-247
- Irving, H. E. 1929 Genetics, 14:3371
1933 J. Immunol., 24:285
- Irving, H. E. 1931 Proc. Soc. exp. Biol., N.Y. 29:2951
y T. P., 1933 J. Immunol., 24:343
- Hugs.
- Kolser, J.A. 1938 " Approved Laboratory Technic"
y D. Appleton Century Co. New York
P. Boerner. 622-625
- Kolser, John A 1943 Methodos para llevar a cabo las reac-
y ciones de fijación del Complemento
Free., Boerner. en la Sífilis u otras enfermedades.
Métodos de laboratorio Clínico. 657-661

- Lambert, W. V. 1932 Journal Immunology, 23:229
- Lambert, W. V. 1928 Iowa State Coll. Sci., 2:179
- J
C. W. Knox.
- Landsteiner, 1945 "The Specificity of Serological Reactions" Harvard Univ., Press., Cambridge, Mass.
- K.
- León, A.P. 1948 "Acción sinérgica del Sulfamida y la Penicilina sobre la Salmonella Typhy" Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop. Méx. Tomo IX, 1:12
- León, A.P. 1957 Estudio piloto en laboratorio de Bacteriología, sobre la Inmunidad Natural para Br. melitensis, comunicación personal.
- León, A.P. 1948 "Identificación de la especie de Br. infectante, por la reacción de fijación del Complemento en los casos de Brucelosis". Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop. Méx. IX 3:199-229
- y E.
Bernal.
- Pillemer, L., L., 1956 "The Properdin System and Immunity: III.- The Zymosan Assay of Properdin". Journal of Experimental Medicine, 103: 1-13.
- Blum, I. H. Lepow,
L., Ware y E. W.
Todd.
- Pillemer, L. 1941 "Anticomplementary Factor in French Yeast". Journal Biology Chem., 137:129.
- J
E. H., Ecker.

- Pillemer, L., Blum, L., Lepow, H. L., Ross, O.A., Todd, E. W., y Wardlaw, A.C. 1954 " The Properdin System in Immunity. I.- Demonstration an Isolation of a New Serum Protein, Properdin, and its Role in Immune Phenomena". Science 120:279-285
- Pillemer, L., Blum, L., Pensky, J., y I.H., Lepow. 1953 " The requeriment for Magnesium Ions in the Inactivation of the Third Component of Human Complement (C₃) by insoluble Residues of Yeast Cells (Zygosán) ". J. of Immunology, 71:331-338.
- Pillemer, L. Schoenberg, M.D. Blum, L., y L. Wurs. 1955 " Properdin System in Immunity. II.- Interaction of Properdin System with Polysaccharides". Science 122:545
- Pritchett, I.W. 1925 J. exp. Med., 41:195
1926a, Ibid., 43:161
1926b. Ibid., 43:143
- Schott, R. O. 1932 Genetics, 17:203
- Schütze, H., Gorer, P.A. y Finlayson, M.E. 1936 J. Hyg., Camb., 36:37
- Webster, L. T. 1923 J. Exp. Med., 38:451
1924a, Ibid., 39:1291
1924b, Ibid., 39:8791
1925 Ibid., 42:111
1933a, Ibid., 57:7931
1933b, Ibid., 57:819.