

ESTUDIO DE LA PRECIPITACION EN EL DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LAS CARNES (1)

Por ENRIQUE EMILIANI ROMAN

Médico Veterinario.

INTRODUCCION

No tiene el presente trabajo la finalidad exclusiva de cumplir con un requisito para optar el título de doctor en Medicina Veterinaria, sino el de contribuir a un estudio no abordado aún por nuestros investigadores y que merece nuevas iniciativas para llevarlo a un campo más práctico.

La aplicación que hoy en día se da a la precipitación se reduce al campo de la medicina legal, quedando amplias perspectivas inexploradas, pero no por eso menos importantes que la que tiene hoy en la medicina humana.

El franco problema de las posibles adulteraciones y fraudes en las industrias de la chacinería podría encontrar en la reacción de la Precipitación un valioso aporte. Hoy en día no contamos con un procedimiento de orden distinto que permita a ciencia cierta identificar las carnes que constituyen el fraude, y es de grande importancia investigar el papel que pueda tomar esta clase de investigaciones.

Pero antes de tratar directamente el problema de los fraudes es de especial importancia agotar todo el significado de los antisueros, así como señalar las propiedades de los mismos. Por esta razón, y queriendo dar el primer paso hacia un estudio más completo y práctico, dediqué mis esfuerzos a la apreciación de la especificidad de los sueros precipitantes obtenidos con sueros sanguíneos naturales, lo que considero básico para entonces entrar a aplicarlos.

No he dispuesto del tiempo ni de los medios necesarios que hubiera querido para realizar todas las investigaciones hasta agotar el tema y llegar a conclusiones definitivas, pero me complacería y me sentiría satisfecho si el presente trabajo pudiera servir de guía u orientación a nuevos experimentos que conduzcan a investigaciones de mayor trascendencia.

En este trabajo explico algunas conclusiones que considero interesantes, así como observaciones y detalles que no por pequeños dejan de tener grande importancia.

HISTORIA DE LAS PRECIPITINAS

El principio de la reacción de la precipitación se basa en los trabajos que llevó a cabo Rudolf Krauss en 1897 en los que quedó demostrado que inmunizando conejos con inyecciones de un cultivo bacteriano podía obtenerse un suero que al añadirle a un filtrado estéril de esa bacteria, producía un precipitado. Al tiempo observó que la reacción tenía carácter específico por el hecho de no presentarse sino con el correspondiente filtrado bacilar.¹

Krauss en sus investigaciones trabajó con filtrados de bacilos *Pestis* y del espirilla del cólera, observando que al mezclar los filtrados claros de tales cultivos con sus respectivos sueros inmunes, las mezclas se hacían turbias y luego tenía lugar un precipitado, fenómeno que no se presentaba cuando la mezcla se verificaba entre antígenos y antisueros de distinto origen.

El mismo investigador realizó más tarde innumerables experiencias y dedujo la utilidad práctica de la reacción como un me-

(1) Tesis de Grado.

dio de diagnóstico valioso de aquellas enfermedades de naturaleza infecciosa, capaces de desarrollar precipitinas en el suero de los animales atacados.

Luego Wladimiroff (1) utilizó el fenómeno para el diagnóstico del muermo observando que el suero del caballo enfermo daba la reacción con los filtrados de los cultivos en caldo de los bacilos del muermo. La técnica fue más tarde perfeccionada por diversos investigadores, siendo hoy de grande utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad.

La conocida Reacción de Ascoli es también reacción de precipitación, y los extractos acuosos de los animales con carbunco producen precipitados típicos con los sueros correspondientes, resultando positiva aun cuando se trate de un material completamente putrefacto (1), "en el cual ya no sea posible demostrar la presencia de los bacilos ni por el estudio microscópico, ni por los cultivos, ni por las inoculaciones experimentales".

Dos años más tarde, y conocido el fenómeno por la mayoría de los investigadores, la precipitación abarcó nuevos campos más prácticos al ponerse en evidencia y comprobarse que las precipitinas no solamente eran originadas por sustancias proteínicas vegetales (1) provenientes del cuerpo de las bacterias, sino también del cuerpo albuminoso de origen animal, de tal manera que después de las numerosas experimentaciones realizadas principalmente por Bordet, Ehrlich, Wasserman, Uhlenhuth, se comprobó que en la reacción de precipitación hay un medio seguro para diferenciar las distintas clases de albúminas.

Pero la principal aplicación que recibió la reacción fue en medicina forense al comprobarse que los sueros de conejos preparados previamente con sangre humana precipitaban exclusivamente la sangre humana o de la especie empleada especialmente para tal objeto.

Uhlenhuth (1) "logró así demostrar

el origen humano o animal de muchas manchas de sangre que habían desempeñado un importante papel en pruebas forenses; sin conocer de antemano las circunstancias de cada caso, determinó por medio de la precipitación la naturaleza de la sangre, comprobándose después la rectitud del diagnóstico al confrontarse los resultados con los datos judiciales".

El diagnóstico, dice el mismo autor, pudo hacerse con seguridad inclusive en una mancha de sangre de más de cincuenta años, y en otra prueba de sangre ya totalmente putrefacta que había sido conservada durante dos años en un tubo de ensayo.

Las propiedades de la precipitación fueron más tarde objeto de especulaciones filosóficas y tratóse de ver en ella un medio comprobatorio del origen del hombre (1) lo mismo que "un aporte y una demostración de las relaciones filogenéticas entre el hombre y el mono", por el hecho de que el suero que precipita la sangre del hombre precipita también la de los monos antropoides (gorila, chimpancé, orangután).

Nattural pudo también comprobar que existía afinidad sanguínea entre el perro y el zorro, el caballo y el asno, el cordero y el buey.

También se ha observado que todos aquellos órganos que contienen albúmina procedente de un órgano animal, producen la reacción al ponerse en contacto con el suero homólogo debido a que en la mayor parte de los humores existe la albúmina de la sangre, siendo el cristalino la única excepción (1); debido, según la mayoría de los tratadistas, "a que el cristalino está formado por un tejido epitelial al que no llega la irrigación sanguínea, y compuesto por una sustancia albuminoide muy particular de la misma naturaleza biológica en todos los animales." Así se ha anotado que los antisueros formados por inoculaciones de la albúmina del cristalino dan precipitación cruzada sin ningún carácter específico.

En el laboratorio también se han observado algunas diferencias entre las albúminas de los diferentes órganos (1), y cierta semejanza entre órganos de especies distintas, dedicados a una misma función, lo cual resulta lógico si se tiene en cuenta que siendo albúminas diferentes debe haber comportamiento distinto en el desarrollo del fenómeno, al tiempo que cierta semejanza por la constitución histológica de órganos dedicados al mismo trabajo, como, verbi, gracia, los hígados de especies, no afines.

Las primeras prácticas para la identificación de las carnes las llevó a cabo Uhlenhuth y más tarde Fornet; sin embargo, no me ha sido posible conseguir el resultado de esos trabajos, siendo la literatura sobre esta materia sumamente escasa. De los muchos autores que he estudiado muy pocos tratan extensamente el tema, y los que más, tan sólo hablan de la aplicación de la precipitación en la medicina forense.

Albúminas y su importancia

Las proteínas son los elementos básicos de todo elemento vivo. Ellas constituyen el protoplasma y el núcleo que controla la actividad de cada célula.

Los prótidos están formados de la reunión y entrelazamiento de aminoácidos entrando en su fórmula como elementos indispensables el carbono, el hidrógeno, el oxígeno, y el nitrógeno; en fórmulas más complejas el azufre y generalmente el fósforo (8).

En esa forma simple son asimilados y aprovechados por el organismo, aunque pequeñas cantidades de ciertas albúminas, como la clara de huevo cruda y el suero sanguíneo, son algunas veces absorbidos desde el intestino hacia el torrente circulatorio (8).

Estos aminoácidos no solamente son distintos en cuanto a su composición química, sino en sus propiedades metabólicas, ya que no todos los aminoácidos forman

indistintamente uno u otro tejido, habiendo grupos con funciones específicas. En esta forma varias proteínas son fuentes de hormonas, y otras de bilis, como la taurina (9); algunas son indispensables para el crecimiento (8), y otras para la formación del azúcar.

Pero lo importante de anotar es que si bien las proteínas que van a formar determinados órganos tienen el mismo origen, van a la larga a constituir albúminas en las distintas especies.

Se sabe que mientras mayor sea la proporción de aminoácidos de los prótidos de la dieta "que puedan servir para la construcción de tejido protídico, mayor será el valor nutritivo del prótido. "En otras palabras, entre más se parezcan los aminoácidos presentes en el prótido alimenticio a los prótidos del organismo, menor cantidad de aquellos se necesitarán."

Se sabe, pues, que la semejanza o identidad que haya entre la albúmina ingerida y la del cuerpo influye en la formación de los tejidos, pero no la manera como la célula sintetiza ya en forma específica los aminoácidos.

Herbert Best y Burke Taylor, en su obra anteriormente citada, refiriéndose a la acción dinámica específica de los prótidos dicen: se admite que los aminoácidos ejercen de algún modo un efecto estimulante directo y específico sobre las células de los tejidos, elevando a un nivel mayor el metabolismo de aquéllos.

En esa misma forma sería consecuente meditar sobre la manera como actuarían las células para seleccionar y formar sus proteínas.

En todo caso, el mecanismo no es claro y sólo nos interesa el carácter específico distintivo de las albúminas animales.

Precipitinas y Reacción de Precipitación

Para hablar de las precipitinas, tenemos previamente que entra a definir lo que es un antígeno y lo que es un anticuerpo. La definición más sencilla de an-

tígeno es la que da Merchant y que dice: "Toda sustancia que introducida parenteralmente al organismo es capaz de estimular a ciertas células para la producción de anticuerpo." Y anticuerpo es cualquier sustancia presente en el suero sanguíneo capaz de neutralizar o sensibilizar al antígeno que lo ha producido.

En un principio se pensó que únicamente las proteínas poseían poder antigenético, pero posteriores investigaciones han venido a demostrar que hay sustancias diversas de proteínas a las que pueden ir unidos algunos azúcares, constituyendo los antígenos parciales o haptenes. (La reacción de precipitación se presenta no sólo entre el anticuerpo y el antígeno completo, sino también con antígenos parciales o haptenes. Un suero antineumococo, por ejemplo, reacciona no sólo con una suspensión de neumococos, sino también con extracto capsular de constitución polisacárido) (27).

Se han descubierto, en fin, factores distintos que influyen en el carácter y poder antigenético del antígeno como la parcela llamada *virulina* (4), que se cree formada por la misma bacteria entrando los hidratos de carbono en su composición. Asimismo sustancias no nitrogenadas derivadas del neumococo pueden provocar la formación de anticuerpos (3).

En el presente trabajo el antígeno que nos interesa —el suero sanguíneo de las diferentes especies animales, incluyendo el humano— parece ser más simple y es posible que se comporte como antígeno constante cuidando de no tomar con él los componentes proteicos que se encuentran durante el período de la digestión.

Se trataría pues de las proteínas sanguíneas que serían específicas para cada especie, entre las que la seroalbúmina y seroglobulina tendrían el principal papel.

La naturaleza de los anticuerpos ha sido más difícil de determinar y muchas son las ideas y teorías expuestas hoy sobre su constitución. Entre ellas, la de que los anticuerpos son los mismos antígenos modificados (3), teoría desechada.

Más bien los anticuerpos se definen por sus propiedades no por lo que física y químicamente puedan significar. El anticuerpo es específico para el antígeno que lo ha producido, y su presencia en los sueros inmunes puede determinarse sólo por sus reacciones con su antígeno homólogo: El suero inmune no muestra ninguna diferencia química distinta de la del animal normal (2).

Es importante tener en cuenta la existencia de anticuerpos normales capaces de reaccionar con muchos antígenos (2), y tanto los *anticuerpos inmunes* como los *naturales* son altamente específicos. y ambos dan el mismo tipo de reacción (3) como sucede con el suero normal de muchos animales que a diluciones del 1:25 presentan reacción positiva con una suspensión de brucela abortus.

La relación entre anticuerpo normal y anticuerpo inmune no se conoce todavía, y los primeros los dividen en varios grupos según su origen (2): el primer grupo compuesto por anticuerpos que se han formado como resultado de un contacto desconocido entre el animal y el antígeno específico; el segundo consta de aquellos formados como resultado de un antígeno heterólogo; el tercero constituido por los llamados isoanticuerpos que son un carácter hereditario; y el cuarto grupo menos definido que los anteriores, y que consta de anticuerpos formados por el resultado de una madurez fisiológica.

Más adelante al hablar de la especificidad de los antiseros me referiré a estos anticuerpos normales para explicar algunos fenómenos que he observado en mis experiencias.

La reacción de precipitación obedece a los dos factores descritos anticuerpo y antígeno, los cuales al combinarse producen el fenómeno que denota la presencia de ellos en el medio. En esa forma se sirve la serología para el diagnóstico de un gran número de enfermedades que la sola clínica puede en muchos casos sospechar pero no evidenciar.

El estudio de la precipitación y de la aglutinación revelan una similitud estrecha, y el principio físico de las dos reacciones es el mismo; la aglutinación consiste en una floculación de grandes partículas en suspensión (bacterias), mientras que en la precipitación se trata de unidades más pequeñas (antígeno en solución) (12).

Otro autor dice que la aglutinación tiene lugar cuando el antígeno está en suspensión en forma de células individuales o dividida en finas partículas, en tanto que la precipitación se presenta cuando el antígeno está en solución coloidal (2).

La forma como se realiza la reacción en el laboratorio la explicaré en la segunda parte del trabajo al referirme a la experimentación realizada.

Como pude observar algunos fenómenos de zona, me parece conveniente referirme al hecho aun cuando sea para explicar en qué consiste. Algunos sueros, especialmente aquellos sometidos a temperaturas de 60 a 70 grados centígrados (3), tienen la particularidad de no presentar reacción positiva a diluciones bajas, presentándola a la más altas.

Se ha tratado de explicar el fenómeno diciendo que algunos coloides protectores interfieren el resultado de la reacción la que no se presenta en las diluciones mayores porque el coloide está más diluido. Sin embargo en ocasiones el fenómeno de zona se presenta únicamente en las diluciones medianas y no en las menores (2).

El fenómeno, pues, no ha tenido hasta ahora una explicación satisfactoria.

Utilidad de la Precipitación en el Laboratorio.

Desde el descubrimiento de la precipitación por Krauss en Viena, la reacción ha tenido cada día nuevas aplicaciones en el laboratorio. Entre ellas por vía de ilustración citaremos las siguientes:

1º Para reconocimiento de manchas de sangre o sea en la medicina forense;

2º En la clasificación de razas bacterianas;

3º Para el diagnóstico de algunas enfermedades como el carbón bacteriano;

4º Para el diagnóstico de la sífilis (reacción de Kahn);

5º Para el diagnóstico de infestaciones parasitarias como la triquinosis (21);

6º Para la standarización de toxinas y antitoxinas como la diftérica y del tétano;

7º Para la identificación de plantas íntimamente relacionadas;

8º Para la identificación de proteínas de origen animal;

9º Para el diagnóstico de la erisipela del cerdo.

Especificidad y sensibilidad

Es conveniente tratar de explicar el significado de estos dos términos antes de entrar de lleno en el tema que nos ocupa.

Cuando un suero inmune se pone en presencia de varios antígenos y sólo reacciona con su homólogo, se dice entonces que es específica.

La sensibilidad es el factor de la reacción que indica los límites de terminación de la especificidad.

Los términos, sin embargo, pueden tener distintas interpretaciones en algunas pruebas serológicas conforme a las modalidades que le son propias o a factores que si bien pueden ser determinantes en unas, no toman parte en otras.

Cada prueba tiene, por tanto, sus propiedades en cuanto a especificidad y sensibilidad, y así en la sífilis existe lo que se llama sensibilidad no específica y sensibilidad específica (10). La primera implica aquellas enfermedades no sifilíticas o estados no sifilíticos capaces de hacer positiva la reacción; la sensibilidad específica se refiere a la capacidad de las distintas reacciones de resultar positivas en los individuos sifilíticos.

La especificidad, pues, es un factor variable debido a la complejidad con que las

diversas parcelas antigénicas se combinan para formar lo que conocemos con el nombre genérico de antígeno.

No podría referirme autorizadamente a las precipitaciones bacterianas, pero hay fundamento para suponer que existan diferencias en cuanto al carácter específico, al igual que los sueros precipitantes obtenidos al inmunizar conejos con sueros sanguíneos naturales, según he apreciado en el transcurso de mis investigaciones.

El criterio de los autores sobre la especificidad de los sueros precipitantes no es uniforme, y las opiniones más bien son contradictorias.

No podría con franqueza asegurar si los autores consultados se refieren exclusivamente a las precipitaciones bacterianas, que es lo probable; a los sueros precipitantes obtenidos con suero sanguíneo, que es lo que nos interesa; o a la precipitación en términos generales.

En todo caso es este punto uno de los principales motivos de nuestro trabajo y a él nos referiremos más o menos extensamente.

“La precipitación (12) está limitada en su especificidad por grupos de reacciones. Este hecho no interfiere el valor práctico de la reacción en ninguna forma, porque la eliminación del grupo secundario de reacciones, que en la aglutinación se obtiene por diluciones del antisuero, puede aquí obtenerse, como dice Krauss, disminuyendo la cantidad del suero precipitante sin diluir añadido a los filtrados bacterianos.”

Bryand (6) difiere en su opinión con la emitida por el autor anterior y dice que “las precipitinas son altamente específicas contra las proteínas que han estimulado su producción. Se forman contra la sangre, tejidos y bacterias.

Still expresa que “la reacción es específica para la proteína empleada en la inmunización. Grupos de precipitinas análogos a los grupos de aglutininas, se presentan en las especies íntimamente rela-

cionadas. El suero normal parece no contener nunca precipitinas” (26).

Sanz Egaña (23) en cambio, dice que los sueros precipitantes presentan reacciones positivas cruzadas por el hecho de existir en el suero sanguíneo precipitinas naturales.

Jordan (27) es de opinión que la reacción de precipitación como otras reacciones inmunológicas, es altamente específica pero que se observan reacciones cruzadas entre antígenos químicos similares que son análogos a los grupos de aglutininas. Tal reacción, dice, se presenta entre el hombre y el chimpancé, coincidiendo con la opinión anterior.

Otros autores van más lejos, y Gradwohl nos dice que “las precipitinas que se forman por inyecciones de sangre humana no sólo son precipitantes para su sangre homóloga, sino para la proteína humana. Por esta razón la prueba sirve y puede emplearse para las manchas seminales, fragmentos óseos y adulteraciones de carnes” (11).

Vemos que tal autor no sólo concede importancia meramente específica, sino que dice sirve también la precipitación para la identificación de los fragmentos óseos.

Pigoury (14) se aparta un poco de las opiniones expuestas, y en un resumen de algunos de sus trabajos concluye lo siguiente: la mayor parte de los sueros dan reacciones no específicas con antígenos heterólogos, pero no se observan floculaciones netas más que con cierta proporción óptima suero-antígeno. Los tiempos de reacción son vecinos de las floculaciones específicas. La intensidad de las reacciones no específicas es muy variable: trazas de opalescencia, opalescencia más o menos ocusada, o floculación típica idéntica a la floculación específica del antígeno diluido al 1:500 o 1:1.000. Las reacciones no específicas son siempre más débiles, a dilución dada, que las específicas. La máxima floculación no específica para la misma cantidad de un suero dado, exi-

ge cantidades de antígeno heterólogo cinco a diez veces mayores que las necesarias de antígeno homólogo para la floculación específica.”

Puede apreciarse pues, que Pigoury acepta que no son específicos los sueros precipitantes, siendo posible la reacción positiva con antígenos heterólogos.

Pero Kitt (1) dice que se ha visto que el suero de los conejos preparado con sangre animal o humana precipita exclusivamente la sangre de la especie animal que ha servido para la preparación del conejo, y que no solamente se presenta la precipitación empleando diluciones del antígeno fresco, sino también con las de sangre seca envejecida, putrefacta o congelada.

Más adelante al explicar la realización de los trabajos y en la discusión de mis experiencias, haré nuevamente referencia a los anteriores conceptos, con el fin de establecer una comparación nítida con las conclusiones a que he llegado.

Hemos hablado de la especificidad de los sueros precipitantes restándonos sólo el referirnos a la sensibilidad de los mismos.

La sensibilidad de las precipitaciones sobrepasa en mucho a los medios químicos empleados con fines semejantes. La sensibilidad es grande y se han obtenido sueros con los cuales se han determinado los antígenos específicos a diluciones al uno por cien mil (12).

Kitt también dice que la sensibilidad de la reacción es extraordinaria, y que puede demostrarse la existencia de albúmina correspondiente hasta en diluciones del uno por cien mil, en tanto que las reacciones químicas fallan ya a una dilución del uno por mil.

Se desprende de los datos anteriores que por medio de la precipitación es posible identificar porciones centesimales de albúmina, lo que encuentra una valiosísima aplicación en la práctica forense.

CAPITULO II

En este capítulo trataré de las prácticas seguidas durante los experimentos, discusión de los mismos, resultados y conclusiones finales. Me he permitido dividirlo en las siguientes partes:

1º Obtención de sueros precipitantes y técnicas.

2º Choques anafilácticos en los conejos.

3º Sangría de conejos y resistencia de los mismos.

4º Técnica de la precipitación y presentación del fenómeno.

5º Condiciones del antígeno y del antisuero.

6º División del fenómeno.

7º Tiempo de la reacción e influencia de la temperatura.

8º Influencia del tiempo sobre el antígeno.

9º Especificidad de los antisueros.

10. Discusión de los cuadros.

11. Conclusiones del capítulo.

1º *Obtención de sueros precipitantes y técnicas.*

Existen innumerables métodos sugeridos por los distintos investigadores, y podría decirse que cada cual tiene el suyo propio. Entre ellos los hay largos de duración hasta de dos años, y otros cortos seguidos por el autor del presente trabajo por razones obvias.

Siguiendo técnicas suministradas por algunos autores he hecho algunas modificaciones con resultados satisfactorios, que expondré más adelante.

Parece que es el conejo el animal que mejores condiciones presenta para la producción de antisuero, y se aconseja aquellos jóvenes de dos a dos y medio kilos, prefiriéndose los conejos salvajes que parecen dar sueros más potentes, al tiempo que mejor resisten las inoculaciones.

Sherwood (7) dice que los distintos métodos de inmunización ofrecen resultados iguales, “desde que la capacidad indivi-

dual para producir anticuerpos varía, debiéndose inocular varios animales para obtener antisueros satisfactorios sin considerar la técnica empleada", y suministra los siguientes métodos:

Técnica de Kolmer:

Injectar medio centímetro cúbico de antígeno intravenoso cada día por tres semanas, y titular diez días después de la última inyección. Si el título es bajo, inyectar 5 c. c. intraperitonealmente y 24 horas después iniciar una nueva serie de inyecciones endovenosas.

Técnica de Dean:

Dean recomienda dos series de inyecciones, cada una de las cuales consiste en 6 a 8 aplicaciones de 2 c. c. de antígeno con cinco días de intervalo. Las primeras se aplican intravenosamente y las restantes por vía intraperitoneal. Después de dos a seis meses se inicia la segunda serie.

Técnica de Sherwood:

Aconseja inyectar uno a dos centímetros cúbicos de antígeno intravenosamente, y tres a seis días después una segunda de la misma cantidad, o 4 a 5 c. c. intraperitonealmente. Una tercera, cuarta, y frecuentemente una quinta inyección se aplica intraperitonealmente con tres a seis días de intervalo. Se sangra el animal 7 a 10 días después de la última inoculación.

Entre los métodos más empleados se cita el de Telistovich y Bordet (13) que aconsejan efectuar 3 ó 4 inoculaciones subcutáneas o intraperitoneales en conejos, con una semana más o menos de intervalo.

Igualmente se han preconizado métodos más rápidos con los seguidos por Fornet (17) y Muller que acostumbra inocular durante tres días consecutivos, por vía intraperitoneal, dosis de 5 a 15 c. c. de

suelo antígeno, sangrando doce días después de la última inyección.

Dos investigadores argentinos (13) utilizan una técnica sencilla, consistente en aplicar dos inoculaciones con uno a dos meses de intervalo. Dicen haber obtenido sueros precipitantes de alta potencia de 1:20.000.

Por circunstancias casi inesperadas, y habiendo tenido que ausentarme de Bogotá por el término de un mes, y no queriendo suspender los trabajos, encontré en este método ya conocido un medio de proseguir las investigaciones ininterrumpidamente.

Pero los resultados obtenidos en la Facultad sirviéndome de esta técnica, no fueron los mismos de sus autores, ya que de tres conejos tratados en ninguno se obtuvo tal título, habiendo sido la máxima del 1:5.000.

Sin embargo, una modificación de la anterior proporcionó uno de los sueros más potentes, por lo cual daré las fechas de las distintas inoculaciones. El título fue del 1:20.000.

Inoculaciones de 2 c. c. endovenosas:

1^a 30 de diciembre.

2^a 1^o de febrero.

3^a 16 de febrero.

4^a 13 de marzo.

5^a 20 de marzo.

6^a 22 de marzo.

7^a 25 de marzo.

El conejo fue sangrado el día 3 de abril para la titulación del antisuelo.

En el capítulo III al hablar de las técnicas para la obtención de sueros precipitantes por medio de las albúminas modificadas daré cuenta de un método que siendo más sencillo y más corto permitió obtener un antisuelo doblemente potente que el anterior.

De todos los anteriores medios utilizados para la obtención de los sueros se emplearon los de Kolmer, el que llamaría-

mos Argentino, y la modificación indicada del anterior seguida por el autor.

Auncuando el método de Kolmer es bastante satisfactorio presenta el inconveniente del enflaquecimiento progresivo de los animales. —tal vez por las 21 inyecciones diarias de albúmina extraña que reciben— algunos de los cuales llegan a verdadero estado caquéctico.

A pesar de todo, y de la práctica derivada de estas investigaciones, considero que cualquiera de los métodos puede emplearse y aún más podrían practicarse inoculaciones caprichosas, con la seguridad de obtenerse también antisueros satisfactorios.

29 Choques anafilácticos en los conejos

No entraré a definir los términos anafilaxia, hipersensibilidad, alergia, etc., pero sí deseo referirme al fenómeno debido a la relación estrecha que guarda con la obtención de los sueros precipitantes, y por la idea general de la susceptibilidad especial de los conejos a padecer de choques una vez inoculados en diversas ocasiones con una misma proteína.

Los autores dan medios para evitar el shock, y así Schmidt (16), aconseja aproximar las inyecciones, diciendo que el mejor resultado se obtiene dejando dos días sin inoculación, y que en ningún caso deben hacerse las inyecciones dejando intervalos mayores de seis días. A pesar de ello los conejos números 73 y 77, se inocularon por seis veces el uno y cinco el otro, con una semana de intervalo sin presentación de shock. No hay, por tanto, inconveniente en el inocular con intervalos de seis días por ofrecer el procedimiento un alto porcentaje de seguridad.

En mis experiencias he observado, pues, que los conejos no son muy sensibles a la anafilaxis, o sea que el fenómeno se presenta en muy raros casos, y en bajísimas proporciones después de un crecido número de inoculaciones.

Kolmer (25) también dice que para

evitar el choque anafiláctico los conejos deben ser desensibilizados por medio de una inyección de 0.2 c. c. media hora antes de la inyección de cada una de las dos últimas dosis, y Choise (11) aconseja inoculaciones intramusculares al iniciar cada serie.

“Algunas especies de animales (15) son más fáciles de sensibilizar que otras. De todas las especies el curí es el más susceptible y la vía intravenosa es probablemente la mejor. Le sigue en orden el conejo, un poco más difícil de sensibilizar que el curí. La sensibilización se ha obtenido en casi todos los animales con diversos grados de éxito”.

Para dar una idea de la tan poca sensibilidad de los conejos, bástenos decir que tres de ellos recibieron más de 30 inoculaciones por vías subcutáneas e intravenosas sin que hayan presentado el más leve síntoma anunciador del fenómeno. De éstos, dos cedieron suero precipitante en tres ocasiones diferentes habiendo recibido una serie de inoculaciones antes de cada una de las sangrías.

Del resto de los conejos dos padecieron el shock, entre ellos el que nos sirvió para emplear el método modificado del argentino, habiéndolo presentado al aplicarle la primera inyección de 2 c. c. para prepararlo para una nueva sangría. Esta inoculación tuvo lugar 15 días después de la primera sangría, o sea, a los cuatro meses de haberse estado inoculando, lo que ofrece un muy bajo índice de peligro.

De los dos conejos que presentaron el shock anafiláctico ninguno murió, y éste apareció a los 15 minutos de inoculados por vía endovenosa.

Aprovecharé para referirme a la etiología del fenómeno en el conejo, para de su conocimiento deducir un posible tratamiento, que auncuando no se ha empleado es de suponerse satisfactorio.

“El tejido (15) del choque es la media de las anteriores. Si el antígeno se inyecta intravenosamente en la vena marginal de la oreja, las primeras en afectarse son

las pulmonares. El precipitígeno se une a las precipitinas en las células musculares de la media de estas arteriolas, provocando un estado irritativo que degenera en espasmo y constricción de ese punto. Esto ofrece una obstrucción en tal forma que el ventrículo derecho no puede hacer pasar la sangre a través de los pulmones. Proviene una congestión cardíaca, claudicación del mismo órgano y la muerte." Si inmediatamente presentado el estado anafiláctico se aplica un antiespasmódico adecuado intracardiamente —nitrato de amilo, por ejemplo—, a lo cual da tiempo el conejo por no ser la muerte tan repentina como se piensa, el fenómeno debe ceder inmediatamente y eliminar el peligro de muerte.

También es conveniente en este capítulo dar cuenta de otra experiencia, que si bien no establece un principio, abre un precedente.

El curi (15) es el animal más susceptible al choque anafiláctico.

Basado en el principio anterior y queriendo investigar la especificidad del fenómeno, trabajé con el animal anotado en la siguiente forma: se inocularon cinco curis con 5 c. c. de sueros sanguíneos de caballo, buey, perro, cerdo, al tiempo que se dejaron tres testigos. Considerado pasado el período suficiente de incubación se inocularon nuevamente a los trece días con los antígenos respectivos, lo mismo que los testigos.

En ninguno se presentó el shock.

De esto puede concluirse que en un período de incubación de trece días no fue suficiente para producir el fenómeno de la anafilaxia.

3ª Sangría de los conejos

Hemos acostumbrado a practicar una sangría parcial previa de 5 c. c. para titular el suero, y ya conocida la potencia una segunda abundante al siguiente día.

El conejo no debe haber comido desde el día anterior para evitar la obtención de sueros turbios (16).

Para las dos sangrías empleamos siempre la punción cardíaca, a pesar de que los autores casi todos aconsejan usar la vena marginal de la oreja para obtener la sangre para la primera titulación, y la cual no pude emplear con éxito.

La punción cardíaca se practica a nivel del tercer espacio intercostal izquierdo en el borde esternal, inclinando la aguja un poco hacia el plano medio y hacia adelante.

La cantidad de sangre por extraer varía según el tamaño, peso y estado del animal. Hemos extraído hasta 55 c. c. en un conejo grande sin mayor peligro. Siempre se ha reemplazado el volumen de sangre por uno igual de solución salina al 0.85% endovenosa.

Si la punción se verifica cuidadosamente y una vez obtenida la sangría se toman medidas post-operatorias, y se suministra al animal una alimentación adecuada, éste puede emplearse para sangrías sucesivas con dos inyecciones del antígeno —2 c. c. endovenosas cada vez— con una semana de intervalo, antes de cada sangría.

Algunos acostumbran a sangrar por punción estéril de la carótida, lo que presenta inconvenientes por hacerse necesario anestesiarse el conejo y practicar la disección cuidadosa de la región.

La sangre se recoge con jeringa estéril y se deposita en tubos de ensayo de la misma condición, y perfectamente secos para evitar la hemólisis por presencia de un medio hipotónico en contacto con los glóbulos rojos. Debe tenerse la precaución de no cchar en cada tubo más de la tercera parte de su capacidad con el fin de que suelte el máximo posible de suero y evitar la hemólisis que es frecuente cuando se ocupa un mayor volumen del recipiente.

Se inclinan los tubos y a las 12 y 24 horas se recoge el suero para centrifugarlo si fuere preciso y pasarlo a nuevos frascos estériles.

En esa forma queda listo para su uti-

lización inmediata. Algunos autores (11) indican, cuando el antisuero se almacena, preservado con mertiolato en la proporción del 1:1.000. En cambio otros (23) condenan tal sistema o indican emplearlo con las precauciones debidas por las posibles alteraciones que puede sufrir el antisuero.

4º Técnica de la precipitación.

La precipitación se efectúa poniendo en contacto el precipitógeno con el suero precipitante. La reacción se lleva a cabo con antisuero sin diluir o ligeramente diluido (12) en presencia de diluciones crecientes de antígeno. En esta forma, por ejemplo, al probar el poder precipitante de suero de conejo inmunizado con suero sanguíneo de oveja, se coloca una serie de tubos cada uno de los cuales contiene una cantidad constante de suero precipitante, pero cantidades progresivamente mayores de antígeno en diluciones isotónica de suero fisiológico, y a un volumen igual al del antígeno.

Para este objeto hemos empleado los tubos de Kahn.

Los autores en tesis general aconsejan usar medio centímetro cúbico del antisuero y un volumen igual del antígeno a sus distintas diluciones. En nuestros trabajos nos han sido suficientes de dos a tres décimas de cada uno. Estas cantidades permiten apreciar con nitidez y sin inconvenientes el resultado de la prueba.

La dilución del antígeno se suele realizar en la siguiente forma: Se toman 4 tubos de ensayo comunes colocando en cada uno 9 c. c. de suero fisiológico; se vierte 1 c. c. del antígeno en el primero para hacer una dilución al 1:10, homogeneizándolo lo mejor que se pueda. De éste se pasa al segundo una igual cantidad agitándolo en la misma forma, quedando al 1:100. Así sucesivamente formando los dos últimos diluciones al 1:1.000 y al 1:10.000. De éstos es fácil partir para hacer diluciones mayores o intermedias.

Para la titulación del antisuero debe comenzarse por probar la dilución más alta o sea la del 1:10.000, que considero el título mínimo más aconsejable. En caso de resultar positiva se preparan soluciones más diluidas del 1:15.000 y 1:20.000. De lo contrario es preferible reforzar el poder precipitante con una nueva serie de inyecciones al conejo.

Es importante e imprescindible disponer de pipetas en cantidad suficiente para cada antisuero y cada antígeno, con el objeto de evitar la confusión posible cuando se trabaja con mucho material.

Primero se lleva el antisuero a los tubos de Kahn en las cantidades anotadas y luego el antígeno, comenzando por el título más alto, y no al contrario.

Es conveniente con el objeto de que antisuero y antígeno queden superpuestos y no se mezclen, inclinar hasta cerca de la posición horizontal el tubo de precipitación y con la punta de la pipeta humedecer la pared del tubo hasta el límite del antisuero; si no, el precipitógeno se acumula en ésta y cae en todo su volumen mezclándose con el antisuero. Personalmente he acostumbrado después de humedecer las paredes colocar el antígeno gota a gota; en esta forma y si se tiene cuidado nunca se entremezclan los líquidos quedando perfectamente delimitados.

5º Condiciones de antígeno y antisuero.

La preparación del antígeno varía según su origen y según para lo que se vaya a emplear. Si se trata de suero sanguíneo debe obtenerse en forma aséptica en recipientes completamente secos, y en general con los mismos requisitos seguidos para la sangría de los conejos.

(“Teobb y Sangford (22) indican que el antígeno debe llenar los siguientes requisitos: a) Debe ser casi completamente claro, visto con luz reflecta; b) Calentándola con un poco de ácido nítrico debe dar sólo un ligero enturbiamiento; c) Debe producir espuma abundante al agitar-

la; d) No debe ser fuertemente ácida ni fuertemente alcalina al tornasol. Para neutralizarla puede emplearse soda o ácido clorhídrico débil''.)

Cuando el antígeno es de naturaleza distinta a la del anterior, como son los productos de chacinería, varía la técnica según vaya a inocularse o según se emplee para la verificación de la reacción. En el primer caso he acostumbrado el siguiente procedimiento con mucho éxito: se toman unos 30 gramos y se dividen en finas partículas que se dejan en maceración en una igual cantidad de agua destilada por 24 horas en nevera. En el mortero se procede entonces a triturar hasta formar un amasijo, para dejarlo nuevamente en maceración por 12 horas, después de las cuales se filtra por gasa varias veces y luego por papel de filtro. A pesar del filtrado, si éste no ha sido muy riguroso, se forma una sedimentación abundante cuando se deja en reposo, por lo cual conviene dejarlo en la nevera 24 horas más, o centrifugarlo repetidas veces.

Se recomienda lavar el macerado con cloroformo (19) para eliminar los residuos grasos. Sin embargo, en la forma antes descrita se inoculó por varias veces a los conejos sin fenómeno desagradable.

Cuando el macerado se destina a la reacción en calidad de antígeno es preciso filtrarlo sucesivamente por papel hasta obtener un líquido claro y transparente. La filtración por bujía no es necesaria, y debido a las diluciones a que se someterá éste, no es necesario llevar la filtración hasta una clarificación absoluta.

Con el antisuero, en cambio, es conveniente evitar la hemólisis ya que ésta impide apreciar y oscurece, grado mayor, el resultado final; además de que su empleo sería todavía menos apropiado con un antígeno de chacinería. La hemólisis ya hemos visto que se evita empleando recipientes secos, eliminando movimientos bruscos, y ocupando la tercera parte del recipiente.

6º Presentación del fenómeno

Podemos dividir el fenómeno de la precipitación en dos tiempos:

a) Formación del anillo.

b) Precipitación propiamente dicha.

“La primera (24) consiste en el fenómeno general de la unión específica del antígeno o del haptene con el anticuerpo; mientras que la segunda es producida cuando se manifiestan cambios en la suspensión coloidal del precipitógeno, que se traducen por la transformación de precipitados visibles.”

En pocos casos y con antisueros potentes en contacto con diluciones concentradas de precipitógeno el segundo tiempo es casi inmediato.

La formación del anillo es muy semejante o igual al que se presenta en la investigación de la albúmina por el ácido nítrico nitroso.

El tiempo de la presentación varía naturalmente con el carácter positivo de la reacción, haciendo su aparición con mayor prontitud según sea su poder. El anillo va aumentando poco a poco de intensidad hasta llegar a un límite máximo, iniciando un descenso aproximadamente de los 90 minutos en adelante. Este descenso es lento siendo su rapidez proporcional al tamaño; es, pues, cuestión de gravedad. Es curioso que los anillos nítidos al descender, conservan la forma en el trayecto tomando cierta concavidad inferior.

La cantidad de precipitado, al igual que el anillo, depende exclusivamente de la potencia del suero, siendo más abundante en cuanto más positivo.

Para los fines diagnósticos no parece ser imprescindible el cumplimiento de los dos tiempos. En ocasiones a pesar de observarse el anillo con bastante nitidez, el precipitado es más bien escaso, y a veces difícil de apreciar. El anillo en cambio es suficiente para el diagnóstico ya que únicamente se presenta en los casos positivos.

Cuando no se emplea material de labora-

torio debidamente lavado y estéril, y se hace preciso esperar un tiempo más o menos largo —para mejor discernir sobre el resultado final del fenómeno— los gérmenes de contaminación encuentran medio propicio para su propagación, y pueden afectar e intervenir en el estado final de la reacción, sobre todo si se llevan los tubos a incubación. El cultivo en caso de formarse puede dar lugar a un precipitado y hacer interpretar la prueba como positiva.

Para las diluciones igualmente debe emplearse un suero estéril por las mismas razones anotadas anteriormente.

7º *Tiempo de la presentación de la reacción.*

Pocos autores hablan del término para considerar positiva o negativa la reacción, como en la aglutinación de Bang, en la que se toma como positiva sólo aquellas que se presentan dentro de un determinado tiempo.

A este respecto Schmidt (16) dice: “si dicho anillo no aparece dentro de quince minutos la reacción se considera negativa”.

Francamente no sé en qué se basa el autor anterior para hacer semejante aseveración. Una observación clarísima he hecho, y es que el tiempo no afecta el resultado positivo de la precipitación; las negativas no se convierten en positivas en virtud del tiempo, sino que se mantienen en tal estado aún después de 72 horas.

Zinsser (12) también opina que el tiempo de precipitación puede prolongarse en casos hasta exageradamente; así, cita cómo la sangre —antígeno en estado de putrefacción puede presentar una débil reacción hasta 6 semanas de haberse puesto en contacto con el antisuero específico.

Generalmente las reacciones más demoradas presentan el anillo dentro de la primera hora, y en pocos casos cumplido este término.

8º *Influencia de la temperatura en la precipitación.*

Kolle y Hetsch (17) indican la temperatura de 37 grados centígrados como la óptima para verificarse la precipitación.

Dopter y Sacquepee (5) parecen compartir la opinión y dicen “que la acción precipitante del suero parece manifestarse mejor a la temperatura de 38 grados centígrados que a la de laboratorio; todavía se discute a qué temperatura deja de manifestarse. Algunos autores fijan 58 grados centígrados como temperatura límite; otros 70 grados.

A este respecto me he limitado a experimentar la diferencia de acción de las temperaturas ambiente y de la estufa de 37 grados.

Para establecer tal diferencia me serví de la siguiente prueba: tomé como punto de partida un antisuero caballo que a una dilución de 1:10.000 demoraba 20 minutos a temperatura del laboratorio para precipitar su antígeno. Establecido el principio se prepararon 4 tubos, dos de los cuales se llevaron a la estufa y los dos restantes se dejaron al medio ambiente. Observaciones de cada cinco minutos se hicieron con el siguiente resultado: los 4 tubos precipitaron al mismo tiempo.

Nada puedo decir de temperaturas mayores o menores a las ya citadas, y creo no tenga la experiencia mayor interés práctico en nuestro país.

9º *Influencia del tiempo sobre el antígeno.*

Una observación de gran importancia fue la de que parece existir cierta relación entre la edad del antígeno y su poder de precipitación. La investigación del fenómeno no me fue dado realizarla completamente por falta de tiempo, como por salirse del plan inicial de trabajos, pero quiero consignar aquí el hecho observado dándole una interpretación que juzgo posible.

El fenómeno observado es como sigue: el 22 de abril se sangraron los conejos 100

y 101 inoculados con antígeno caballo y perro, respectivamente. La titulación realizada dio una potencia del 1:10.000 en ambos a los 35 minutos. Esta titulación se verificó con antígenos que tenían aproximadamente 24 días en la nevera.

Además, la precipitación cruzada dio resultados positivos a títulos bajos; el antisuero caballo dio al 1:10.

El 27 de abril se repitió la titulación del antisuero caballo para corroborar los resultados anteriores; éstos fueron distintos por lo que se resolvió repetir nuevamente la titulación del mismo antisuero con iguales resultados, esto es: al 1:10.000 positivo a los diez minutos; al 1:20.000 positivo a los 5 minutos (posiblemente el fenómeno de zona). A la reacción cruzada el antisuero caballo aumentó al 1:10.000.

Desgraciadamente a esta dilución se agotó el antisuero, por lo que no fue posible llevar la reacción a títulos más altos.

El mismo día 27 en vista de los anteriores resultados se tituló el antisuero canino del conejo número 101 con el antígeno de igual edad que el anterior. Los resultados fueron paralelos, esto es: positivo al 1:20.000, ligeramente positivo a los diez minutos y franco a los quince.

En vista de la apreciación anterior, o sea de que la diferencia de edad de cinco días parecía haber alterado la potencia de uno de los dos factores: antígeno o antisuero, resolví hacer la titulación con el antisuero número 101 y antígeno canino fresco. En la tarde del mismo día 27 ya había obtenido el precipitígeno en estado fresco y se procedió a la reacción. Los resultados fueron los mismos que los del día 22 o sea: positiva al 1:10.000 en 35 minutos.

Los hechos, pues, demuestran que hubo una diferencia en los resultados por haberse dejado envejecer el antígeno posiblemente de los 24 a los 29 días.

Ahora, Schmidt (16), dice "que el suero antígeno no debe usarse, sino después

de un mes de su preparación"; sin explicar la razón de este envejecimiento.

Así, pues, en mi concepto y de acuerdo fenómeno anormal me indica que tal vez con este hecho observado casualmente, el envejecimiento de un suero antígeno guardado a la nevera se alcanza lo que podríamos designar "como edad crítica", la que produciría un aumento de su capacidad de reacción. Si esto es cierto dicha edad estaría comprendida cerca de los 30 días en los antígenos de nuestra observación, y explicaría la necesidad de usar sueros antígenos de un mes como la anota Schmidt.

Podríamos además agregar que si este fenómeno se comprobase con posteriores investigaciones extensivas, el factor edad en un suero antígeno sería de una real importancia para su estabilidad como agente rector en la precipitación, lo que ciertamente sería de un enorme interés para la sensibilidad de la reacción.

99 Especificidad de los antisueros.

He querido consignar independientemente, todo lo relacionado con esta importante parte de mi trabajo.

Al hablar de especificidad tuve oportunidad de exponer los criterios contradictorios de varios autores; sin embargo, todos solamente expresan conceptos generales sin entrar en forma concreta a definir las propiedades de cada antisuero.

Confieso que mis conclusiones no las expongo sin temor a equivocarme. Ello es probablemente cierto y espero que pronto sufran rectificaciones fundadas. Nada sería más satisfactorio que lo que aquí consigo sirva de base para nuevas investigaciones y nuevas inquietudes de orden científico.

Me referiré primeramente a la especificidad de los antisueros con inoculaciones de suero sanguíneo natural, frente a antígenos también naturales, o sea, sin modificar.

En otro capítulo anoto unas pocas ob-

servaciones relacionadas con otro tipo de antisuero obtenido con un precipitógeno de naturaleza también distinta, y de sus posibles aplicaciones.

He trabajado con los siguientes sueros precipitantes:

- a) Suero bovino.
- b) Antisuero caballo.
- c) Antisuero canino.
- d) Antisuero cerdo.
- e) Antisuero ovino.
- f) Antisuero humano.

Para la investigación de la especificidad he seguido la siguiente conducta:

a) Preparación del antígeno que en este caso ha sido siempre suero sanguíneo a las diluciones del 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 y 1:20.000.

b) Tubos de Kahn en los cuales se deposita el antisuero que se va a probar, en cantidades dos a tres décimas de centímetro.

c) Los tubos anteriores he acostumbrado a marcar así: primero en letra grande las iniciales de la especie a que pertenece el suero precipitante y más abajo las iniciales de la especie a que pertenece el antígeno, con un número convencional que indica el título de la dilución; 1 indica uno por diez; 2, uno por ciento, y así sucesivamente.

Es recomendable al trabajar no experimentar con más de dos antisueños distintos porque resulta físicamente imposible apreciar debidamente 20 o más tubos a un tiempo.

Luégo de depositado el suero precipitante se llevaba a los tubos las diluciones del antígeno, anotando el tiempo, y los resultados que fueron interpretados en la forma siguiente:

1º Ligeramente positivo cuando el anillo zonal iniciaba su formación sin ser aparente (L +).

2º Francamente positivo cuando el anillo se hacía bien aparente (F +).

En las precipitaciones entre especies diferentes pero afines —caballo y asno; buey-cordero que fueron las que me sirvie-

ron para las pruebas— existe un gran afinidad que varía según las especies, como puede derivarse del siguiente hecho: entre el caballo y el asno no existe ninguna diferenciación específica a tal punto que con el antisuero caballo no puede distinguirse si un suero pertenece a esta especie o a la afín. Aún más: el precipitado entre este antisuero y el asno fue mayor que entre el mismo y el antígeno homólogo.

No sucede lo mismo entre el bovino y el ovino que aun cuando dan una precipitación cruzada notoria, siempre deja apreciarse una diferencia entre bovino y bovino, y bovino con ovino. A pesar de ello la precipitación cruzada se efectúa a las mismas diluciones.

Con respecto a especies completamente distanciadas en el sentido zoológico de la palabra, las cualidades varían y podríamos clasificarlas en los cinco grupos siguientes:

a) Antisueños sin ninguna especificidad con respecto a antígenos de especies afines, como en el caso del caballo y el asno.

b) Antisueños de gran afinidad como el bovino y el ovino que precipitándose las mismas diluciones dejan ver diferencias con la homóloga correspondiente.

c) Antisueños absolutamente específicos con respecto a los demás antígenos como el humano.

d) Antisueños con características precipitantes para la mayoría de los antígenos, como el anticaballo.

e) Antisueños absolutamente específicos con respecto a algunos antígenos, pero de especificidad relativa con respecto a otros como el anticainino y el cerdo.

El hecho de la ninguna especificidad que distingue al caballo y al asno, o a la especificidad afín que guardan el buey y el cordero, en cuanto a la precipitación cruzada, podría explicarse por la relación zoológica que tienen entre sí; pero resulta casi paradójico que especies tan distintas y tan distanciadas en todo sentido

como lo son el caballo y el perro, presentan una marcada precipitación cruzada, al igual que el primero con otras especies como se verá en los cuadros correspondientes.

¿En qué forma podría explicarse el fenómeno?

En el capítulo correspondiente a la especificidad se da cuenta de los conceptos que el hecho merece a muchos autores, que como Saequepec que habla de las precipitinas de grupo.

Sin embargo, se me hace difícil una clasificación en ese sentido, ya que los antisueros no se comportan siempre de la misma manera, estando sometida tal conducta al poder precipitante o sea a la potencia, y posiblemente a la edad del antígeno que parece aumentar su capacidad de reacción; ya habíamos anotado al hablar de la edad del antígeno cómo ésta no sólo influye en la sensibilidad de la reacción, sino también en la relación de ésta con la especificidad.

Sanz Egaña (23) hemos visto ya que admite que "todos los sueros frescos contienen los citados anticuerpos, por lo que, todos son aptos para provocar el fenómeno de la precipitación". En cambio, Still (26), habla de que el suero normal parece no contener nunca precipitinas, contrario al concepto "de las precipitinas naturales". El fenómeno es bastante complejo y difícil de darse una explicación satisfactoria, por lo que los investigadores se limitan a lanzar hipótesis basados en fenómenos semejantes.

En principio las conclusiones de mis trabajos son semejantes a las de L. Pigoury (14) sin saber hasta qué punto se identifican porque en las publicaciones que he consultado no aparecen los detalles de las reacciones que tal investigador ha realizado.

El mismo autor anota que "la mayoría de los sueros dan reacciones no específicas con antígenos heterólogos", sin decir cuáles son estos antisueros, por lo que

me ha sido imposible establecer un paralelo de las dos conclusiones.

La observación evidente que también consigna Pigoury es que "las reacciones no específicas son siempre más débiles, con una dilución dada de un antígeno, que la reacción específica de aquél".

He podido apreciar que no dejan de ser frecuentes que las reacciones entre un suero y un antígeno heterólogo pueden mostrarse positivas antes que la específica respectiva, auecuando al final la intensidad de ésta sea mayor.

El antisuero caballo v. gr., con diluciones de antígeno perro se inició a los ocho minutos, en tanto que la específica lo hizo a los diez. En cambio, ésta fue fuertemente positiva antes que la primera. El hecho anotado probablemente obedezca a "fenómeno de zona".

Inmediatamente paso a discutir los cuadros que he confeccionado para una fácil interpretación de los trabajos desarrollados.

10. Discusión de los cuadros.

a) Antisuero caballo. Título: 1:20.000. 15 m.

El suero precipitante menos específico es el de caballo.

Como se verá en el cuadro número 1 precipita con el antígeno buey hasta diluciones de 1:10.000. A diluciones del 1:20.000 no presentó signos positivos antes de la primera hora.

Los tiempos de precipitación fueron bien distintos a los de la reacción específica, y se verá que en tanto que demoró al 1:10 veinticinco minutos para hacerse fuertemente positiva la específica al 1:20.000 tardó once minutos.

Con el antígeno perro la conducta fue distinta, ya que resultó rápidamente positiva al 1:20.000 antes que la específica a la misma dilución y que las demás diluciones mayores. En cambio la intensidad final fue menor.

Con el cerdo fue con el que tal vez de-

mostró más fuerte reacción ya que fue fuertemente positiva a los quince minutos a la dilución del 1:20.000. Sin embargo, para la misma intensidad demoró quince minutos más que la específica. *

Con el antígeno ovino fue con el que demostró menor reacción, pues sólo al 1:100 mostró carácter fuertemente positivo a los 30 minutos. Al 1:1.000 y 1:10.000 la reacción fue levemente positiva dentro de la primera hora, y fuertemente positiva al 1:10.000 pasada ésta. Al 1:20.000 se mantuvo negativa.

Con el asno, como se anotó anteriormente, el comportamiento fue igual al específico.

Estos resultados son completamente opuestos a los que nos da Valle (23), que nos dice que el antisuero caballo es absolutamente específico.

Las experiencias con el antisuero caballo no se terminaron por haberse agotado el suero, y sólo puedo señalar que con éste titulado al 1:20.000 como mínimo no hay precipitación cruzada al mismo título con los antígenos heterólogos buey y cordero; pero sí con los antígenos perro y cerdo, los cuales toman más tiempo para la misma intensidad que la reacción específica.

Antisuero cerdo titulado 1:15.000, en un minuto.

Si bien el antisuero caballo precipita al antígeno heterólogo cerdo, no podemos derivar de allí que el antisuero de esta especie precipite en igual forma que el antígeno de aquella (cuadro número 2).

El suero precipitante de cerdo con el suero antígeno de caballo se mantuvo negativa dentro de la primera hora, y ligeramente positiva después de la segunda al 1:10. De la dilución del 1:100 en adelante fue negativa dentro de las dos primeras horas.

Con el antígeno buey al 1:10 la reacción fue ligeramente positiva después de la primera hora, y negativa a las demás diluciones.

Con el precepitógeno canino ligeramente positiva a los 40 minutos y fuertemente a la hora a la dilución del 1:10. Negativa en las restantes.

Con el ovino el comportamiento fue igual al anterior con la diferencia de haber dado ligeramente positiva al 1:10 a los 15 minutos y fuertemente positiva a la hora. Negativa a las demás diluciones.

Por los datos anteriores se aprecia que el antisuero cerdo al título anotado posee un carácter específico muy marcado si lo comparamos con el correspondiente de caballo.

Antisuero perro- Título 1:15.000 en 5 m.
(Cuadro número 3).

Este suero lo mismo que el anterior es también más específico que el primero de los estudiados. Los resultados de las precipitaciones cruzadas realizadas fueron los siguientes:

Con el caballo al 1:10 ligeramente positivo a los 35 minutos y fuertemente positivo a la hora. Negativo a la dilución del 1:100 dentro de la primera hora, y ligeramente positivo a la hora y media. Las reacciones siguientes fueron negativas.

Con el antígeno buey al 1:10 ligeramente positivo a los 60 minutos. A la dilución del 1:100 el mismo resultado pasada la primera hora, y negativo del 1:1.000 en adelante.

Con el antígeno cerdo mostró una mayor identidad: al 1:10 ligeramente positivo a los 8 minutos y fuertemente positivo a los 15 minutos. Al 1:100 ligeramente positivo a los 20 minutos y fuertemente positivo a los 50 minutos. Al 1:1.000 negativo antes de la primera hora, ligeramente positivo después de ésta. Del 1:1.000 en adelante fue negativa.

Con el bovino se mantuvo negativo al 1:10 a la primera hora y ligeramente a las dos y media horas. Las diluciones siguientes fueron negativas.

Antisuero buey. Título 1:15.000. 14 m.
(Cuadro número 4).

La especificidad de este antisuero podemos resumirla así: negativo con perro y caballo a todas las diluciones; y negativo con cerdo del 1:1.000 en adelante; con este antígeno presenta una reacción ligeramente positiva a los 25 minutos y positiva a los 30 minutos al 1:100, y ligeramente a la hora al 1:1.000.

Con el antígeno ovino es con el único que presenta reacción positiva cruzada con todas las diluciones.

Antisuero humano

El antisuero humano obtenido fue bastante débil y en la prueba específica a dilución del antígeno homólogo al 1:10.000 presentó resultado ligeramente positivo a las dos horas. Es por tanto necesario investigar con un suero de más alta potencia.

En las precipitaciones cruzadas y el citado título dió negativa con todos los antígenos.

Sin embargo, los datos consignados por los autores parecen coincidir en su carácter específico a excepción de algunos antropoides que dan precipitación cruzada con el hombre.

11. Conclusiones relativas a la especificidad de los antisueros y del capítulo.

La principal conclusión que se deduce de las anotaciones que acabamos de hacer, es que a excepción probable del antisuero humano, ningún otro posee carácter específico en forma absoluta.

La especificidad varía con la especie siendo entre todos los estudiados, el caballo el menos específico.

El antisuero cerdo puede considerarse como específico cuando da positivo de la dilución del 1:100 en adelante.

El suero precipitante canino puede considerarse como específico cuando las reacciones resultan positivas del 1:100 en ade-

lante, a excepción de reacciones con el precipitígeno cerdo, con el cual presenta precipitaciones positivas hasta diluciones del 1:1.000. Por tanto como específicas deben considerarse del 1:10.000 en adelante.

Las especies afines como caballo-asno, y cordero-buey, presentan una menor diferenciación específica, siendo menos específicas entre más semejanza guarden las especies.

Para aquellos casos en que sea necesario hacer pruebas forenses en la medicina veterinaria, debe procederse con mucha cautela, efectuándose reacciones testigos con antígenos de varios animales aun cuando su presencia no se sospeche.

El tiempo no influye sobre el carácter positivo o negativo de la reacción, y aquellas negativas permanecen como tales aún después de 72 horas.

Las precipitaciones de antisueros con antígenos heterólogos pueden manifestarse en el sentido positivo antes que la homóloga respectiva, pero ésta, al final, es más intensa que la primera.

El fenómeno de zona es frecuentemente observado en la precipitación.

El transcurso del tiempo parece aumentar la potencialidad del antígeno, no debiendo ser por tanto titulados los sueros precipitantes sin establecer antes la valoración exacta e influencia posible del tiempo sobre el antígeno.

Un mismo antisuero, por la razón anterior, puede ser de distinta potencia según la calidad del antígeno que se tome para su titulación.

CAPITULO III

Albúminas modificadas. Consideraciones sobre la identificación de carnes.

Para diferenciar las carnes de las distintas especies animales existen varios métodos que son el químico, el biológico y el físico. El primero se orientaría por la riqueza glicogénica del músculo, y pa-

rece servir para la identificación de la carne de caballo que es rica en este sacárido (16). El físico se guiaría por los caracteres organolépticos; y el biológico por sistemas serológicos entre los cuales la precipitación es la que nos interesa.

Es nuestro objeto expresar en el capítulo presente algunas observaciones, y de ninguna manera sentar doctrinas y lanzar conceptos definitivos. Más aún cuando apenas alcanzamos a realizar unas pocas experiencias por la premura del tiempo y por la fuerza de las circunstancias.

Acercas de este tema puede decirse que no hay dos autores que coincidan en sus investigaciones y apreciaciones.

Porque no podemos perder de vista que en este fenómeno como en otros semejantes, interviene un importante factor de interpretación personal que puede llevar a apreciar en distinta forma una misma reacción.

El presente capítulo lo podemos dividir en las siguientes partes:

- a) Coctoprecipitinas.
- b) Obtención de sueros precipitantes con albúminas modificadas.
- c) Precipitación en antisueros normales y macerados de salchichas.
- d) Discusión de los cuadros.
- e) Conclusiones del capítulo.
- f) Conclusiones finales.

a) Coctoprecipitinas.

Por coctoprecipitinas entendemos aquellos antígenos modificados por el calor.

Sobre las cualidades de estas precipitinas únicamente nos habla Zinsser (12) que da las conclusiones de trabajos efectuados por diversos investigadores.

“Obermeyer y Pick (12) observaron que las precipitinas producidas con suero de buey sin modificar no reaccionaban con el suero de esta misma especie si se le sometía a calentamiento, así se trataba de un antisuero potente. En cambio, cuando los animales inmunizados con suero sanguíneo calentado (hervido), el antisue-

ro así producido reaccionaba no sólo con el suero normal de buey sino también con el antígeno calentado, lo mismo que con toda una serie de productos derivados que no reaccionaban con precipitinas naturales.”

“Schmidt (12) afirma que el calentamiento del suero proteico a 70 grados centígrados por 30 a 60 minutos alteraba su precipitabilidad por “precipitinas nativas producidas por inmunización con suero sanguíneo no calentado. La ebullición, según el mismo autor, impide que el antígeno sea precipitable por tales precipitinas nativas, pero por otra parte parece destruir sus propiedades antigenéticas de producir precipitinas al inyectarla a animales.”

“En experimentos efectuados por Zinsser y Ostemberg se trató de determinar si se podía o no producir precipitinas inyectando animales con proteínas que habían sido hervidas, y apreciar la acción de tales sueros precipitantes sobre proteínas hervidas. Al contrario de los resultados de Fornet y Muller se halló que el suero hervido de tres a cinco minutos inyectado en conejos inducía precipitinas que actuaban sobre proteínas hervidas, pero al tiempo se comprobó que los anticuerpos así producidos no eran estrictamente específicos.”

Podemos apreciar que en forma unánime los autores parten del suero sanguíneo para obtener los sueros precipitantes destinados a la identificación de las carnes. Al respecto dice Sanz Egaña (23) “el antígeno más fácil de obtener es el suero sanguíneo conseguido por coagulación espontánea”; y los autores mencionados anteriormente efectúan diversas experimentaciones sometiendo el suero sanguíneo a calentamientos, etc., para investigar las propiedades de los sueros así obtenidos en su empleo para la identificación de carnes.

Vemos igualmente que las opiniones y conclusiones son contradictorias, y Ruppel (23), por ejemplo, dice que los pro-

ductos ahumados o ligeramente cocidos dan siempre una reacción muy clara, y que Rigler ha obtenido sueros activos que reaccionaban con los macerados de carnes hervidas y asadas, tan bien como si se tratara de carnes frescas.

Más adelante encontramos el concepto de que (23) los inconvenientes del método para la diferenciación de las carnes consiste en que no se puede aplicar a las carnes cocidas, a causa de la coagulación de las albúminas que, por lo mismo, resultan insolubles. Así, pues, la acción precipitante es sólo aplicable a las carnes frescas, saladas o ahumadas.

Francamente es imposible comprender la razón de tanta contradicción y el motivo de resultados tan opuestos. En tanto que Obesmayer y Pick fracasan al tratar de precipitar albúminas modificadas con antisuero normal, Ruppín sostiene que los productos ahumados o ligeramente cocidos dan siempre una reacción muy clara; mientras Schmidt dice que el calentamiento del antígeno destruye las propiedades antigenéticas, Zinsser y Ostemberg obtienen sueros precipitantes potentes con tales antígenos, resultado al tiempo opuesto a los de Fernet y Muller.

Mis experimentos, como dije anteriormente, son pocos, y en síntesis tuvieron como punto de partida la obtención de sueros precipitantes con albúminas modificadas.

b) Obtención de sueros precipitantes con albúminas modificadas.

El antígeno se preparó con macerado de jamón de cerdo de acuerdo con la técnica dada en la primera parte del trabajo. Se inocularon los conejos números 73 y 77 en la siguiente forma: el número 77 en las siguientes fechas: Marzo 12, marzo 20, marzo 22, marzo 28.

Para el número 77 cada inoculación fue de 2 c. c. del macerado. La sangre se precipitó para la prueba de la titulación el 9 de abril con el resultado negati-

tivo. Se inyectó seguidamente con 5 c. c. por vía intraperitoneal, habiéndose sangrado definitivamente el 25 del mismo mes, con el resultado satisfactorio. La potencia obtenida fue del 1:10.000 en 40 minutos, usando suero de cerdo como antígeno.

El número 73 se inoculó por cinco veces con 2 c. c. endovenosos con una semana de intervalo entre cada inyección, con sangría al décimo día después de la última. El antisuero obtenido fue de una potencia ligeramente positiva en 15 minutos al 1:40.000, título máximo obtenido durante todas las investigaciones.

Se procedió, como se había hecho con los demás antisueros de que hemos hablado en la segunda parte de la tesis, a probar el primer antisuero número 77 con los antígenos buey, perro, ovino y caballo a diluciones crecientes hasta del 1:10.000.

Con estas pruebas efectuadas con antígenos heterólogos se observó uno de los fenómenos más interesantes del trabajo, y como podrá verse en el cuadro número 5 los resultados obtenidos fueron absolutamente negativos aún 72 horas después de realizada la operación. Se trata por tanto de una alta especificidad absoluta para el cerdo obtenida con inoculaciones sucesivas de un macerado preparado con jamón de cerdo.

Para una mejor comprobación de los tan interesantes resultados anteriores, procedimos a verificar la misma experiencia con el antisuero número 73 obtenido en la forma descrita, y como se verá en el cuadro número 6 las conclusiones derivadas fueron idénticas, a pesar de tratarse de un suero precipitante de gran potencia.

El hecho tiene una mayor trascendencia que la que a primera vista pueda dársele, ya que probablemente de allí es posible sacar una técnica para obtener sueros de propiedades de especificidad absoluta para todas las especies animales.

También podemos deducir que para la

apreciación de la naturaleza de un antígeno modificado (jamones, salchichas, etc.), la reacción debe hacerse entre el antisuero obtenido con tales antígenos y suero-antígeno normal de las especies sospechosas.

No nos fue posible obtener el fenómeno inverso que anotan como real los autores citados al comienzo del capítulo.

c) Preparación del antígeno modificado y de sus divisiones.

Del primero ya hemos hablado más o menos extensamente, restándonos referirnos a sus diluciones.

No es posible hacer diluciones exactas con un antígeno alterado y menos si se trata de carnes. La proteína coagulada e insoluble no es posible determinarla cuantitativamente para hacer diluciones exactas. Pero la maceración permite sustraer sustancias antigenéticas con las cuales preparar las diluciones.

Los autores exponen procedimientos aproximados, pero en ningún caso exactos, para preparar el antígeno y dicen que debe ser tal que agitándolos debe formar un poco de espuma, o bien comparando con diluciones albuminosas conocidas.

He hecho caso omiso, y preparado el antígeno en la forma que he anotado para la inoculación; pero filtrando quince y veinte veces por papel cuando se le ha destinado como factor integrante de la reacción.

La mezcla antígeno-suero fisiológico para la maceración se preparó en forma de que unos 20 gramos de carne modificada y más o menos tres veces su volumen de suero fisiológico diera 5 a 10 c. c. de filtrado.

De este filtrado se partió para las diluciones.

d) Precipitación entre antisueros normales y macerados de salchichas.

Las salchichas a que me he venido refiriendo se prepararon con los condimen-

tos ordinarios, y ahumadas por unos cuatro días consecutivos a calentamiento bajo. Así que los resultados de estas pruebas no son aplicables a modificaciones distintas, por desconocer la forma en que dichas modificaciones influyen en la precipitación.

La experiencia únicamente la realizamos con los antisueros cerdo y bovino; de los demás carecíamos en ese momento.

Si bien la precipitación resultó negativa entre el suero precipitante producido con macerado de jamón de cerdo y los macerados de las salchichas, hubo resultados positivos entre los antisueros normales y el mismo antígeno anterior. Estos resultados en cambio como veremos en la discusión de los dos cuadros correspondientes, dejan entrever claramente que el ahumado y el calor modifican indefectiblemente y en manera notorisima las cualidades del antígeno, no ya como factor productor de anticuerpos como habíamos visto, sino como factor integrante de la precipitación misma. Con ello quiero significar que el antígeno jamón fue capaz de producir precipitinas, pero no de reaccionar con esos mismos anticuerpos que había formado.

e) Discusión de los cuadros.

1º Antisucro normal ovino. Titulado 1:20.000 (cuadro número 9).—Con todos los antígenos a diluciones del 1:10, hubo reacción positiva a diferentes tiempos.

Con el caballo se mantuvo negativo por una hora y fuertemente positivo a las dos horas, lo mismo que con el perro.

Con el antígeno cerdo se presentó positiva a la hora y cuarenta y cinco minutos.

En cambio, con el ovino fue positivo a la hora, y a la hora y media inició el descenso del precipitado.

Con el buey inició, como en el caso anterior, el descenso dentro del mismo término.

A las diluciones del 1:100 fue negativo

en todos, a excepción del buey y ovino, pero en forma muy leve a las dos horas.

2º *Antisero normal del cerdo. Título 1:20.000. 1 minuto.* (cuadro numero 10). Con el antisuero cerdo los resultados fueron diferentes y en la forma siguiente: positivo en todos al 1:10, siempre con una mayor intensidad con el antígeno homólogo con el cual el anillo se percibió más nítido. Las diluciones siguientes fueron negativas con todos los antígenos.

3º *Precipitación entre antisuero normal y antígeno homólogo calentado.*—Queriendo conocer el grado en que el calor podía influir sobre las cualidades del antígeno y siguiendo las experiencias de Schmidt (12) sometí suero sanguíneo normal de cerdo a calentamiento en baño de maría, a la temperatura de 65 grados centígrados por 30 minutos.

Paralelamente se hizo la precipitación del mismo antisuero con suero normal.

Realizadas las pruebas se obtuvieron los datos que consignamos a continuación: reacción positiva rápida y casi inmediata al 1:10 y 1:100 con mayor intensidad en ésta por fenómeno zonal. Al 1:1.000 reaccionó a los 50 minutos, al 1:10.000 permaneció negativo. En cambio con el suero sin alterar precipitó hasta el 1:20.000.

4º *Conclusiones del capítulo.*—Se ha podido obtener un antisuero de especificidad absoluta, que por los medios ordinarios no pudo producirse.

Los antígenos ahumados a calor lento (jamón de cerdo) inoculados en forma de macerados en conejos, provoca la formación de sueros precipitantes de alta potencia específica para el suero sanguíneo de la especie correspondiente.

Los antisuros así obtenidos no dan precipitados con el antígeno que provocó su formación.

Los antisueros normales dan precipitados con los macerados de salchichas, pero con resultados posiblemente inciertos.

Las precipitaciones al 1:10 siempre se presentan, aun cuando parece que las reacciones con los antígenos heterólogos de-

moran más que los homólogos para presentar el carácter positivo.

Es posible que el calentamiento del antígeno normal a temperaturas mayores de 66 grados centígrados por 30 minutos, haga disminuir la potencialidad de la reacción hasta la mitad.

Conclusiones finales del trabajo.

1º Los antisueros obtenidos con suero sanguíneo son de especificidad relativa, y la mayoría de ellos presenta reacciones positivas cruzadas con antígenos heterólogos.

2º Se establecen los límites en los cuales las reacciones presentadas por los diversos antisueros, a títulos iniciales óptimos conocidos, son específicos.

Los anteriores límites señalados son los siguientes:

a) Antisuero caballo (Cuadro número 1) específico para los antígenos buey y ovino y a diluciones del 1:20.000 en adelante;

b) Antisuero cerdo (Cuadro número 2) específico para los antígenos caballo, buey, canino, y ovino, a las diluciones del 1:100, 1:1.000 y siguientes;

c) Antisuero canino (Cuadro número 3) específico para el suero caballo a diluciones del 1:1.000, 1:10.000 y siguientes.

Con el antígeno ovino es más específico, y como tales puede considerarse aquellas diluciones del 1:100 en adelante.

Para el suero cerdo las específicas son sólo aquellas del 1:10.000 en adelante.

d) Antisuero buey (Cuadro número 4) específico para los antígenos caballo y canino a todas las diluciones.

Para el cerdo es específico para la dilución del 1:10.000 en adelante.

Para el ovino no hay diferenciación específica.

3º El envejecimiento parece influir sobre la calidad del antígeno en el sentido de aumentar hasta el doble la potencialidad de la reacción.

4º Por el fenómeno anterior se deduce

que el título de un antisuero varía de acuerdo con la calidad del antígeno que se emplea para medir su potencialidad.

5º Se ha obtenido un antisuero de especificidad absoluta, imposible de producir por los medios comunes.

El citado antisuero se ha obtenido con inoculaciones sucesivas de macerado de jamón de cerdo (Cuadros números 5 y 6), el cual resultó ser absolutamente específico para los antígenos empleados, a excepción del suero sanguíneo de cerdo.

6º Como consecuencia del hecho anterior, deducimos que si al obtener un antisuero por inoculaciones de un antígeno problema reacciona positivamente con diluciones de un determinado suero sanguíneo, es probable que el mencionado antígeno pertenezca a la especie cuyo suero-antígeno normal se empleó para la reacción.

7º La temperatura posiblemente ejerce influencia preponderante sobre la calidad del antígeno, y parece disminuir la potencialidad de la reacción hasta la mitad.

CUADRO NUMERO 1

ANTISUERO NORMAL DEL CABALLO

Diluciones Antígeno	Suero buey	Suero canino	Suero ovino	Suero cerdo
1:10	F - 25 M.	F - 7 M.	F - 30 M.	F - 10 M.
1:100	F - 30 M.	F - 10 M.	F - 30 M.	F - 10 M.
1:1.000	F - 30 M.	F - 10 M.	L - 1 hora	F - 15 M.
1:10.000	L - 35 M.	F - 35 M.	F - D 1 hora	F - 30 M.
	F - 45 M.			
1:20.000	_____	L - 8 M.	_____	F - 15 M.

CUADRO NUMERO 2

ANTISUERO NORMAL DEL CERDO

Tít. 1:15.000 — 1 M.

Diluciones Antígeno	Suero caballo	Suero buey	Suero canino	Suero ovino
1:10	L - D. 2 horas	L - D. 1 hora	L - 40 M.	L - 15 M.
1:100	_____	_____	_____	_____
1:1.000	_____	_____	_____	_____
1:10.000	_____	_____	_____	_____

CUADRO NUMERO 3

ANTISUERO NORMAL DEL CANINO

Soluciones Antígeno	Suero caballo	Suero buey	Suero ovino	Suero cerdo
1:10	L - - 35 M. F - - 1 hora	L - - 1 hora	L - - 2½ horas	L - - 8. M. F - - 15 M.
1:100	L - - 1½ horas	L - - 70 M.	_____	L - - 20 M. F - - 50 M.
1:1.000	_____	_____	_____	L - - D. 1 hora
1:10.000	_____	_____	_____	_____
1:15.000	_____	_____	_____	_____
1:20.000	_____	_____	_____	_____

CUADRO NUMERO 4

ANTISUERO NORMAL DEL BUEY

Tít. 1:15.000 — 15 M.

Diluciones Antígeno	Suero caballo	Suero canino	Suero ovino	Suero cerdo
1:10	_____	_____	- -	L - - 10 M. F - - 20 M.
1:100	_____	_____	- -	L - - 25 M.
1:1.000	_____	_____	- -	L - - 25 M.
1:10.00	_____	_____	- -	_____

CUADRO NUMERO 5

ANTISUERO JAMON DE CERDO NUMERO 71

Tit. 1:10.000 — 40 M.

Diluciones Antígeno	Suero caballo	Suero buey	Suero canino	Suero ovino	Suero cerdo
1:10	—	—	—	—	F - 4 M.
1:100	—	—	—	—	F - 5 M.
1:1.000	—	—	—	—	F - 8 M.
1:10.000	—	—	—	—	F - 45 M.

CUADRO NUMERO 6

ANTISUERO JAMON DE CERDO NUMERO 73

Diluciones Antígeno	Suero caballo	Suero buey	Suero canino	Suero ovino	Suero cerdo
1:10	—	—	—	—	F - 3 M.
1:100	—	—	—	—	F - 4 M.
1:1.000	—	—	—	—	F - 4 M.
1:10.000	—	—	—	—	F - 5 M.
1:20.000	—	—	—	—	F - 15 M.
1:40.000	—	—	—	—	L - 25 M.

CUADRO NUMERO 7

ANTISUERO JAMON DE CERDO NUMERO 73

Tít. 1:40.000 — 15 M.

Diluciones Antígeno	Macerado salehi- cha caballo	Macerado salehi- cha buey	Macerado salehi- cha canino	Macerado salehi- cha ovino	Macerado salehi- cha cerdo
1:10	_____	_____	_____	_____	_____
1:100	_____	_____	_____	_____	_____
1:1.000	_____	_____	_____	_____	_____
1:10.000	_____	_____	_____	_____	_____

CUADRO NUMERO 8

ANTISUERO JAMON DE CERDO NUMERO 7

Diluciones Antígeno	Macerado salehi- cha caballo	Macerado salehi- cha buey	Macerado salehi- cha canino	Macerado salehi- cha ovino	Macerado salehi- cha cerdo
1:10	_____	_____	_____	_____	_____
1:100	_____	_____	_____	_____	_____
1:1.000	_____	_____	_____	_____	_____
1:10.000	_____	_____	_____	_____	_____

CUADRO NUMERO 9
ANTISUERO NORMAL OVINO
Tit. 1:20.000

Diluciones Antígeno	Macerado salchi- cha caballo	Macerado salchi- cha buey	Macerado salchi- cha canino	Macerado salchi- cha ovino	Macerado salchi- cha cerdo
1:10	F - - 2 horas	F - - 1 hora Descenso precipitado L - - 2 horas	F - - 2 horas	F - - 1 hora Descenso precipitado L - - 2 horas	F - - 1 hora 45 M.
1:100	_____	_____	_____	_____	_____
1:1.000	_____	_____	_____	_____	_____
1:10.000	_____	_____	_____	_____	_____

CUADRO NUMERO 10
ANTISUERO NORMAL DE CERDO

Diluciones Antígeno	Macerado salchi- cha caballo	Macerado salchi- cha buey	Macerado salchi- cha canino	Macerado salchi- cha ovino	Macerado salchi- cha cerdo
1:10	F - - 2½ horas	L - - 2½ horas	L - - 2½ horas	_____	L - - 2½ horas
1:100	_____	_____	_____	_____	_____
1:1.000	_____	_____	_____	_____	_____
1:10.000	_____	_____	_____	_____	_____

CUADRO NUMERO 11

ANTISUERO NORMAL DE CERDO

Diluciones Antígeno	Suero normal calentado 65° C. 30 M.	Suero normal sin calentar
1:10	F - 1 M.	F - inmediato
1:100	F - 1 M.	F - inmediato
1:1.000	L - 50 M.	F - 1 M.
1:10.000	_____	F - 1 M.
1:20.000	_____	F - 15 M.

CUADRO NUMERO 12

ANTISUERO JAMON DE CERDO

Titulado con suero sanguíneo de cerdo 1:40.000

Soluciones Antígeno	Suero caballo	Suero buey	Suero canino	Suero ovino
1:10	_____	_____	_____	_____
1:100	_____	_____	_____	_____
1:1.000	_____	_____	_____	_____
1:10.000	_____	_____	_____	_____

BIBLIOGRAFIA

1. *Patología General Veterinaria*.—Theodor Kitt. Traducción de la sexta edición alemana, revisada y ampliada por el autor, expresamente para la edición española. 1942. Pginas 122, 123. Editorial Labor, S. A.
2. *Veterinary Bacteriology*.—Ival Arthur Merchant. Páginas 178, 179. The Iowa State College Press.
3. *The Infectious diseases of domestic animals with special reference to etiology, diagnosis, and biologic therapy*.—William Arthur Hagan. Página 20. Año 1945.
4. *Conferencias de Bacteriología*.—Doctor Ernesto Sáenz Londoño. M. V. D.
5. *Manual de Bacteriología*.—Dopter Sacquepee. Edición 5ª. Página 101, 102, Salvat Editors.
6. *Principle and practice of bacteriology*. M. A. Briand. Edición 3ª.
7. *Immunology by Noble Pierce Chermwood*.—Secund Edition. Página 222. Sant Louis. The C. V. Mosby Company. 1941.
8. *Las bases fisiológicas de la práctica médica*. Herbert Best. Burke Taylor. Tercera edición. Tomo II. P.
9. *The Physiology of domestic animals*. H. H. Dukes. Edición 5ª. Pahaca, New York. Comstock Publishing Company.
10. *Serology in syphillis control*.—Reuben L. Kahn. Principles of sensivity specificity quith and appendix of healt officers and industrial physicians. Páginas 10, 13. Año de 1942. The Williams C. Williams Company Baltimore.
1. *Clinical Laboratory methods and diagnosis. A tex book on laboratory proceures with their interpretation*.—R. B. H. Gradwoll. Therd Edition. Vol. II. Página 1.704. Año 1943, St. Louis. The C. V. Mosby Company.
12. *Immunity. Principles and aplication in immedicne and public heat*.—Hans Zinser. John F] Ender. 5th. Edition. Páginas 244, 246 y 252. The Mac Millan Company.
13. *Contribución al estudio de la preparación de los sueros precipitantes de alto título para el diagnóstico de las carnes embutidas*, por Fagonde Amalia y Bordner Manuel. Boletín técnico número 8. Ministerio de Agricultura de la República Argentina.
14. *Los sueros precipitantes preparados en el conejo con inyecciones de proteínas musculares, son específicos?*—L. Pigoury Veterinaria. Revista técnica mensual. Tomo IX. Julio de 1945. Número 7.
15. *Essentials of allergy*.—Leo A. Crip. Páginas 5, 8 y 12. L. B. Lippincott Company, 1945.
16. *Tratado de Bromatología. Química de alimentos*.—Profesor doctor Hermann Schmidt Hebbel. Páginas 197, 198. Editorial Nascimento. Santiago de Chile.
17. *La Bacteriología experimental y las enfermedades infecciosas*, por W. Kolle y H. Hetsch.
18. *Veterinary pathology and bacteriology*.—S. H. Gaiger and Gwillgn O. Davies. Second Edition. Página 160.
19. *Food inspection and analysis*.—Albert E. Leach. Edition 4ª. Página 236.
20. *Manual of veterinary bacteriology*. Raymond. A. Kalser. H. W. Schaening. Edition 4ª. Página 629.
21. *Trichinosis*.—Syvester E. Gould. Página 140.
22. *Diagnóstico Clínico por el laboratorio*, por Hames Campbell, Todd y Arthur Hawley Sanford. Second Edition. Página 635. Año de 1943.
23. *La inspección veterinaria en los ma-*

laderos, mercados y vaquerías, por F. Sanz Egaña. Tercera edición, 1935. Página 441.

24. *Microbiología*, por Carlos M. Barziza y Alberto Manso Soto. Edición tercera. Página 256.

25. *Métodos de laboratorio clínico*, por J. A. Koomer y F. Boerner. Adaptación de la tercera edición inglesa. Página 716.

26. *Practical bacteriology, haemathology and animal parasitology*.—E. R. Still, Paul W. Clough and Mildred C. Clough. Ninth Edition 1945. Página 245.

27. *Text Book bacteriology*.—E. O. Jordan and William Burrouws. 14. edition, 1946. Página 273.