

LA REACCIÓN DE FLEISCHAUER O PRUEBA DEL ANILLO O RING TEST

N. PRADINES BRAZIL

Vamos a discutir, detenidamente, uno de los métodos diagnósticos de la brucelosis animal que, por sus ventajas y por su escasa difusión, merece un estudio exhaustivo en beneficio de la profilaxis de esa zoonosis tan extendida en nuestro país.

Volvemos hoy al estudio de la prueba del anillo, o ring test o A. B. R. o, como debería llamarse: reacción de Fleischauer.

Dicha técnica fué dada a conocer por este investigador en 1937.

En América no se le había considerado antes de la última guerra mundial.

En el Uruguay la estudiamos en 1947, presentando algunos trabajos al Congreso N. de Brucelosis realizado en Montevideo ese año.^{1. 2. 3} En uno de ellos decíamos: "Esta podría ser una prueba eficaz en el estudio de la epizootiología de la cuenca lechera y en particular de los tambos de la capital".

En 1948 se publican diversos trabajos en los EE. UU., y en el Congreso de Brucelosis desarrollado en noviembre de 1950 en Washington, se aconsejó el estudio del mismo en América.

Igual cosa habíamos aconsejado cuatro años atrás; pero nuestra voz no tuvo resonancia.

Vamos a repetir ahora algunos de aquellos conceptos, ampliándolos con lo que nuevas experiencias nos han enseñado y con los aportes de investigadores extranjeros que han hecho estudios de gran valor.

¿QUÉ ES LA REACCIÓN DE FLEISCHAUER?

La leche de los animales brucelosos presenta la particularidad de que su materia grasa, sus glóbulos grasos, se adhieren a las brucelas en suspensión, arrastrándolas a la superficie de la leche en el movimiento de ascenso que caracteriza al fenómeno de cremificación. Si esas

1. N. PRADINES BRAZIL.—Prueba del anillo en brucelosis. "I. Congreso Nacional de Brucelosis", 1947, Montevideo.

2. N. PRADINES BRAZIL y L. TÓRTORA.—Valor relativo de algunos métodos de diagnóstico biológico en la brucelosis animal. Idem.

3. N. PRADINES BRAZIL, DE MARÍA DE FOLLE, E. GRASSO, P. DE BAYCÉ CARBONELL y S. DE CARRO.—Diagnóstico y características de la brucelosis en el contralor de la leche. Idem.

brucelas están teñidas y forman una suspensión de densidad adecuada, se formará un anillo en la parte superior, teñido del mismo color de las brucelas, lo que permitirá reconocer las reacciones positivas.

Fleischauer, pues, aplicando los conocimientos de la época sobre las características físicas e inmunitarias de la leche, y en particular de los glóbulos grasos, comprobó que ellas permitían reconocer la presencia de leches de animales brucelosos, diferenciándolas de la de los animales sanos.

Quienes siguieron sus trabajos, la estudiaron particularmente, relacionándola con la hemosueroaglutinación. Algunas de las conclusiones extraídas, señalan ciertas lagunas, en parte, por considerar a la hemosueroaglutinación como expresión total de los fenómenos inmunitarios de la brucelosis, lo que no es así.

Para señalar exactamente el valor de la prueba del anillo, ring test o reacción de Fleischauer, es menester estudiar la fisiopatología de la secreción láctica, los fenómenos fisicoquímicos de la leche y los fenómenos inmunitarios característicos de la brucelosis en relación con dicha prueba.

Si la secreción láctea es fruto de las sustancias de pasaje de la sangre y, por otra parte, es el producto de elaboración de las glándulas mamarias, su conocimiento podrá explicar algunas de las incógnitas de los métodos diagnósticos. Así podremos explicar las diferencias entre título aglutinante sanguíneo y lácticos, diferencias de A. B. R. y lactoaglutinaciones, diferencias entre las reacciones de la leche excretada por distintos cuarterones, etc.

Experiencias así orientadas será menester realizar, para interpretar científicamente el resultado, a veces discordante, de algunas reacciones biológicas del diagnóstico de la brucelosis.

CREMIFICACIÓN

En la investigación de las características físicas de la leche siempre despertó interés de los estudiosos el fenómeno de la ascensión de la materia grasa.

Hecho conocido y de gran utilidad en los procesos industriales a los cuales se somete la leche, su estudio adquirió especial importancia por exigencias de orden industrial. Los nombres de Porcher, Acheson, Storch, Voltz, Aberhalden, Van der Bung, Hekma, Siks, Palmer, Van Dam, Rahn, Schwarz, etc., marcan valiosos trabajos de significación en el camino del conocimiento del fenómeno de la ascensión de la materia grasa o cremificación.

Por ellos sabemos que la leche es una dispersión de materia grasa estabilizada por una dispersión coloidal de proteínas y fosfatos, en la cual la sustancia grasa se encuentra formando glóbulos de tamaño variable, que van de 1 a 10 micras de diámetro, constituyendo así una emulsión.



Diversas teorías se han emitido para explicar la conservación de la forma y la aglutinabilidad de los glóbulos grasos. Unas, los suponían rodeados de membranas de caseína o sustancias sólidas; otras, los presentaban envueltos en una capa de suero condensado a manera de membrana; otras, explicaban al forma y la aglutinación de los mismos por la diferencia de tensión, viscosidad y carga eléctrica; otras, los presentaban como partículas envueltas por una película o semimembrana o membrana mucosa; y, últimamente, Schwarz, con la valiosa colaboración del microscopio electrónico ha encontrado que ellos están formados por tres capas:

- 1º) una capa continua con aspecto de verdadera membrana;
- 2º) una corona formada por una sola capa de globulitos constituidos sin duda por fosfátidos (lecitinas); y
- 3º) una capa mucho más espesa, pero muy transparente y por consiguiente poco visible que debe corresponder al resto del protoplasma de la célula madre del acino, rodeando a los glóbulos, es decir, la membrana mucosa citada por Storch.

Cabe suponer entonces, que si los glóbulos grasos están exteriormente envueltos por una membrana mucosa o semimembrana, cuyo origen puede señalarse en el protoplasma de la célula madre de los acinos, dichos glóbulos pueden estar envueltos por sustancias con las características inmunitarias propias de la entidad mórbida que estudiamos; particularmente por aglutininas específicas, por aglutininas bruceológicas.

Y bien; como la materia grasa tiene peso específico menor que el del lactosuero, éste tiende a descender y la grasa, a la inversa, a ascender a la superficie.

La velocidad de esta ascensión de materia grasa está regulada por diversos factores:

- por la diferencia de densidad entre grasa y suero;
- por diferencia de diámetro entre corpúsculos grasos; y
- por la viscosidad del medio.

Es lógico que la diferencia de densidad provoque la separación de los elementos de la emulsión que cuentan con glóbulos relativamente grandes. Y es admisible también, que en leches patológicas, donde el tenor de cloruros puede ser mayor que el normal, la ascensión de glóbulos grasos sea más rápida que en leches normales.

El diámetro de éstos es factor importante, por cuanto mayor sea el mismo mayor será la diferencia de densidad y el ascenso será más rápido; por eso en las leches con predominio de glóbulos grandes, como la normanda y jersey, el ascenso sería más rápido que en las que superan los glóbulos chicos, como la holandesa. Por otra parte, en el estu-

dio de la velocidad de ascenso de la materia grasa debe señalarse que los glóbulos no se desplazan aisladamente, sino que se reúnen en grupos, formando, a veces, verdaderos racimos.

En tales condiciones el proceso de la cremificación es también acelerado.

Varios factores han sido responsabilizados de ese fenómeno de aglutinación, el cual interesa fundamentalmente. La viscosidad de la leche, las características eléctricas de los glóbulos grasos; pero, más recientemente, esa aglutinación de glóbulos grasos, ha sido explicada por una globulina que envolvería a dichos glóbulos, y hasta se ha señalado cierta similitud entre dichos fenómenos y la aglutinación bacteriana haciéndolos resultado de la acción de las citadas globulinas (Demkley y Somer). Nuestra experiencia ha confirmado en parte esta teoría. Hemos observado un fenómeno de aglutinación bacteriana en primer término y luego una aglutinación de grumos de bacterias y grumos de glóbulos grasos entre sí.

En numerosas pruebas realizadas paralelamente entre reacciones de Fleischauer y un tubo testigo con igual cantidad de leche, pero sin ningún antígeno, hemos comprobado que numerosas muestras de leches, preferentemente las que presentan aglutinación positiva, también ofrecen un anillo de crema a los 15 minutos; además, ese fenómeno lo hemos observado en algunas muestras negativas.

Por otra parte, no obstante de realizarse ese fenómeno con leches crudas no se encuentra en todas las leches de A. B. R. negativos. Lo que quiere decir que hay leches negativas con ascenso rápido de su crema y leches negativas que reaccionan de manera inversa; y que, si en general las muestras positivas presentan un ascenso rápido, hay algunas, muy pocas, donde el fenómeno no se presenta.

¿Por qué asciende más rápidamente en las leches positivas que en las negativas.

¿Por qué se observa también ese fenómeno en muestras negativas?

¿La aglutinación de los glóbulos grasos es más acusada en leches donde las aglutininas específicas se han agregado a los factores aglutinógenos naturales?

¿Las aglutininas específicas se adosan también a la capa externa de los glóbulos grasos, facilitando la adherencia de los grupos de bacterias glutinadas?

Cualquiera que sea el factor determinante de la aglutinación de glóbulos grasos, el hecho importante es que ella contribuye a la mayor rapidez de la cremificación natural. (Stiren.)

Otra sustancia que acelera el proceso de cremificación es el suero sanguíneo, aun el calentado a 60° durante 10 a 30 minutos. No sucede así cuando se lleva a más de 65°. En este caso el factor de aceleración de la cremificación sería una globulina del suero sanguíneo. (Hekma.)

Palmer y colaboradores sostienen, en cambio, que en la cremificación los factores más importantes son los coloides del suero y la diferencia de densidad entre la grasa y el suero no influirían mayormente.

Rahn, Van Dam y Sirks demostraron que con el agregado de coloides a la leche, aumenta la velocidad de cremificación debido a la fijación, sobre la superficie de dichos glóbulos, de los coloides agregados quienes constituyen así una verdadera membrana aglutinante. Habría, pues, sustancias coloidales adheridas a la superficie de los glóbulos, que provocarían los fenómenos de la aglutinación globular y por ende la ascensión de los mismos.

En resumen: es aceptado que la cremificación depende de la diferencia de densidad entre el lactosuero y la materia grasa de la leche; que influye el tamaño de los glóbulos grasos; pero influiría mucho más la aglutinación de dichos glóbulos grasos, determinados por los factores señalados.

REACCIÓN DE SCHERN-GORLI

El conocimiento del proceso de cremificación ha resultado sumamente beneficioso para el aprovechamiento industrial de los subproductos de la leche; pero lo ha sido también para el conocimiento de las características físicoquímicas de la misma; características que servirán para distinguir las variaciones que sufre la leche por la acción de diversos agentes alterantes.

Así fué que Schern y Gorli pensaron que si el aumento de la temperatura alteraba el proceso de la cremificación, *acentuando* las características de la capa de crema que se forma en las leches crudas, se destacaría de tal manera, que podría servir para distinguir las leches crudas de las calentadas a diversas temperaturas. Sabemos que llegaron a comprobar que si se agregaba una suspensión de glóbulos rojos de cobayos a la leche, en determinadas condiciones, y se llevaba a 37° durante dos horas, se formaba un anillo rojo sin sedimento en las leches crudas, ligero sedimento en las leches pasteurizadas a 63° y gran sedimento sin anillo en las leches hervidas, como todos sabemos.

Se han sustituido los hematíes de cobayo por substancias inertes, colorantes, compuestos minerales, etc., con relativo éxito.

Por arrastre, o por aglutinación y arrastre de los mismos por la substancia grasa hacia la superficie, lo evidente es que junto al proceso de cremificación se opera otro fenómeno que es el de la ascensión de las partículas ajenas a la leche; fenómeno que también se altera por calentamiento.

Variante del mismo fenómeno sería la aglutinación específica de las células bacterianas y su ascenso con los glóbulos grasos a la superficie de la misma.

El fenómeno de Schern-Gorli no interesa en sí como interpretación de la prueba del anillo o ring test o A. B. R., ya que en ésta intervienen otros factores ajenos a los citados por aquéllos; lo referimos para ver los antecedentes sobre reacciones que se presentan en las leches, en relación con los fenómenos de cremificación, para tratar de explicar los fundamentos de un método que todavía vive en su etapa empírica y los cuales permitirán mejorarlo, sin ninguna duda, en el porvenir.

LA PRUEBA DEL ANILLO, RING TEST O A. B. R.
O. R. DE FLEISCHAUER

Es una reacción sencilla por su técnica, por su interpretación y por los útiles requeridos, y es de gran valor práctico en la lucha contra la brucelosis, porque asegura resultados positivos en una proporción cercana a los obtenidos por la hemosueroaglutinación, tanto en el diagnóstico individual de los animales de un establecimiento, como en la búsqueda de establecimientos infectados.

Se trata de una reacción que se produce en la leche de animales brucelosos, la que consiste en la aglutinación de una suspensión de brucelas teñidas, aglutinación de grumos de brucelas teñidas con grumos de glóbulos grasos y ascenso de los mismos a la superficie del líquido, en un plazo de tiempo determinado, cuando ese sistema se mantiene a una temperatura apropiada y que para nosotros es de 37°.

ANTIGENOS

Fleischauer preparó una suspensión microbiana de *Brucella abortus*, la que tiñó con hematoxilina, usándola como antígeno. Con ella tuvo los resultados conocidos que le permitieron señalar su valor en el diagnóstico de la brucelosis animal.

Nosotros, en 1947, no poseyendo una descripción detallada de la técnica del autor de esta prueba, pero informados por extractos publicados, de que se trataba de suspensiones bacterianas teñidas con hematoxilina, preparamos distintos antígenos de acuerdo a dichos informes abocándonos al estudio detenido del mismo. Comprobamos entonces que el antígeno preparado con cepa S a una concentración adecuada de 10 %, teñida por el citado colorante, presentaba una sensibilidad evidente; pero, en algunos casos, aparentemente, era de una sensibilidad exagerada; y en otros casos mostraba una aparente también inespecificidad. Procuramos intensificar su estudio orientándonos en el sentido de obtener un antígeno que nos proporcionara resultados más satisfactorios. Debemos señalar que los resultados fueron más de una vez contradictorios; contradicciones que en algún caso llegaron a orientarnos en la técnica de preparación del antígeno que deseábamos obtener. Eso ocurrió cuando después de preparar una determinada cantidad de antígeno realizada con la misma técnica utilizada para otros lotes, no obteníamos los mismos resultados que los logrados con las partidas de antígenos anteriores, lo que nos provocó frecuentes dudas. Esos mismos antígenos, usados después de un tiempo de preparados, daban resultados normales, lo que nos llamó nuevamente la atención y contribuyó para explicarnos lo que al principio no habíamos encontrado. Centrifugando un lote de antígeno recién preparado y otro de una preparación anterior se observaba diferencias de absorción de colorante lo que influía fundamentalmente en las características del antígeno preparado.

La absorción del colorante era una condición básica en la preparación del antígeno. No todos se absorben en igual tiempo y no todos lo retienen de la misma manera; esa era la conclusión de esa experiencia.

Ensayamos diversos colorantes, y de las investigaciones realizadas en aquel momento los mejores resultados nos los había proporcionado el antígeno preparado con la siguiente técnica: Se sembraba en agar-hígado una cepa de *Brucella abortus* de forma S; se incubaba durante 48 a 72 horas a 37°; se levantaba en suero fisiológico formolado o se formolaba después; se centrifugaba —previa filtración para eliminar los restos de gelosa que pudieran levantarse— hasta la total sedimentación de las células bacterianas; se volvía a suspender en suero fisiológico hasta que una centrifugación nos mostrara el líquido de suspensión limpio; después se calentaba la suspensión bacteriana y finalmente se teñía con una solución de tionina al 0,25 %. La suspensión bacteriana se dejaba a una concentración del 10 % de brucelas en el líquido de suspensión.

Con ese antígeno y absteniéndonos de juzgar reacciones de dudosas características obtuvimos A. B. R. positivos en un 65 % de las hemosueroaglutinaciones positivas. Debo destacar que en dichas pruebas tomaba como tiempo de reacción 15 minutos a fin de evitar lo que temíamos como reacciones inespecíficas, porque entonces no tenía suficiente seguridad para eliminarlas, y los porcentajes más altos señalados por algunos investigadores resultan de incubaciones de más de 30 minutos las que permiten la aparición de reacciones positivas que no lo hacen a los 15 minutos.

Practicadas las pruebas de A. B. R. paralelamente con las reacciones de hemosueroaglutinación y lactosueroaglutinación, comprobamos que la reacción de A. B. R. o de Fleischauer era algo menos sensible que la hemosueroaglutinación y bastante más sensibles que la lactosueroaglutinación.

Posteriormente continuamos estudiando las características del antígeno convenciéndonos más aún de sus bondades y concluyendo que algunos de sus fracasos se debían a defectos de preparación, y otros, suponemos —porque nuestra investigación no está aún terminada—, se deben a deficiente interpretación del diagnóstico de la brucelosis.

Así pudimos comprobar que si se teñía con un colorante no filtrado y que presentara precipitado no visible macroscópicamente, las partículas no disueltas quedaban en suspensión y las reacciones que se llevaban a cabo con él, frecuentemente ofrecían ejemplos de inespecificidad sobre todo con incubaciones mayores de 15 minutos, particularmente, con las de 30 minutos y más, lo que se explicaba como una verdadera reacción de Schern-Gorli modificada, donde las partículas inertes estaban representadas por las partículas precipitadas del colorante o del medio de cultivo. Estas reacciones, claro está, no tenían la nitidez de las reacciones positivas típicas, pero de leerse, debían considerarse como débilmente positivas.

Demás está decir que las cepas de brucelas de tipo R presentaban este fenómeno más acusado porque todas las células, en este caso, hacían de partículas inertes de las variantes de la prueba del anillo de Schern-Gorli.

La investigación de colorantes ocupó nuestra atención durante bastante tiempo. En primer lugar tratamos de corregir los defectos debidos a una deficiente absorción de los mismos. Más arriba habíamos señalado las contradicciones que aparentemente nos presentaban algunos de ellos. Ese hecho que debíamos corregir, era de fácil solución. Si las células no se teñían bien debíamos usar agentes físicos o químicos para aumentar esa capacidad de absorción y habríamos resuelto el problema. Para eso calentábamos la suspensión microbiana con el colorante durante 15 minutos a 70 grados; luego lo enfriábamos rápidamente y a las 24 horas lo centrifugábamos para eliminar el excedente de colorante y levantábamos el sedimento bacteriano con solución fisiológica fenicada al 0,5 % —hoy lo hacemos con solución fisiológica al 1 %— con buen éxito. Si al comienzo de estos trabajos habíamos elegido el formol en vez del ácido fénico, hoy —como lo explicamos anteriormente— no encontramos inconveniente con este último que, por otra parte, actúa también como mordiente.

Una vez teñida la suspensión microbiana, centrifugamos nuevamente para la eliminación total del colorante excedente y levantamos definitivamente la suspensión bacteriana en solución fenicada al 1 % en la proporción de 1 c.c. de sedimento por 10 c.c. de suspensión dispersada o de antígeno preparado.

Entonces obteníamos correctos resultados. Al aumentar la absorción de colorante por la célula bacteriana se contribuía a señalar más intensamente las características del anillo. Con células bien teñidas, la prueba resulta de una claridad evidente.

Probamos nuevos colorantes debiendo señalar buenos resultados con nigrosina, etc. La suspensión bacteriana la preparábamos de la misma manera que indicamos anteriormente para la preparación del antígeno, y la tratábamos con nigrosina, con Giemsa y May-Griwald, toluidina en cada caso, obteniendo buenos resultados, pero no tan señalados como por la tionina fenicada. Estos colorantes ofrecen reacciones muy similares a los preparados con tionina y algo distintos a los preparados con hematoxilina.

La reacción de Fleischauer realizada con antígeno teñido con hematoxilina, se manifiesta por reacciones nítidas, donde la columna de leche que se ve debajo del anillo se decolora en los casos positivos, de tal manera que, prácticamente, no deben quedar bacterias en la masa de líquido. Predomina la ascensión total de las células bacterianas en la mayoría de los casos; en cambio, con antígenos teñidos con tionina y los otros colorantes citados, se forma el anillo típico también con toda nitidez; pero no ocurre esa decoloración total de la leche descremada en los primeros minutos, sino que ella se opera en pocos casos y en un tiempo mayor.

En resumen: la ascensión de las células bacterianas es muy rápida por la hematoxilina; lo es menos con la tionina, y nos parece que cualquier factor que acelere el ascenso de la crema provocará más fácilmente la formación del anillo, lo que ocurrirá con antígenos que asciendan más rápidamente, que en los que no lo hacen así.

En los trabajos últimamente realizados —en los cuales intervinieron los colegas Dres. L. Tórtora, R. Lombardo y el Br. R. Fontán— se confirman con este antígeno los resultados obtenidos en 1947.

La prueba del anillo o ring test o reacción de Fleischauer, puede practicarse con antígenos distintos a la hematoxilina; pero debe asegurarse una intensa absorción de colorante; una ausencia de formas R; ausencia de partículas extrañas, como precipitación de colorantes, precipitados teñidos de los medios de cultivo, y no debe exceder la duración de la reacción de 30 minutos.

La preparación del antígeno para la reacción de Fleischauer es más delicada que la preparación del antígeno para la reacción de Wright o de Huddleson; por eso, no debe usarse si no se ajusta a tales exigencias.

TITULACIÓN

La titulación se hizo usando el procedimiento corriente para la titulación de antígenos concentrados. Los elementos básicos para la misma fueron muestras de leche positivas a la lactosueroaglutinación con la técnica de Huddleson y formación de anillos nítidos con el antígeno estudiado; las suspensiones microbianas teñidas destinadas a la preparación del antígeno eran diluídas en proporciones conocidas, cada una de las cuales era probada con leche positiva a la prueba anteriormente indicada. Las reacciones negativas deben practicarse con leches negativas a diversas reacciones diagnósticas de la brucelosis, destacando que deben practicarse la hemosueroaglutinación y el índice opsonocitofágico, los cuales deben dar resultados francamente negativos. Digo el índice opsonocitofágico porque la simple comprobación de una aglutinación negativa no indica que las reacciones lácteas deban ser también negativas, aunque generalmente ocurra así.

La cantidad de unidades bacterianas no es elemento fundamental para la titulación aun cuando los antígenos deben tener una concentración dentro de límites adecuados; en cambio es fundamental titularlo en presencia de leches seguramente positivas, dudosas y negativas, para cuyo efecto debe conocerse el diagnóstico del dador correspondiente.

TÉCNICA DE LA REACCIÓN

Se toman tubos de hemólisis de 10 mm. de diámetro en los cuales se vierte 1 c.c. de cada una de las muestras de leche a estudio; se agrega a cada uno de los tubos con leche, una gota de antígeno para dicha prueba; se agitan bien todos los tubos y se llevan a la estufa de cultivo

a 37° durante 15 ó 20 minutos. Nosotros hacemos dos lecturas, una a 15 minutos y otra a los 30 minutos. La primera puede ser escasa en algunas muestras de leche; en cambio no debe prolongarse por más de 30 minutos; no porque las negativas puedan hacerse positivas, sino porque pueden aparecer reacciones dudosas en leches alteradas en su viscosidad.

LECTURA

Nosotros distinguimos los siguientes grados para la lectura:

- Negativa.
- Dudosa.
- Positiva (+, ++, +++, +++++).

En la *reacción negativa* encontramos la muestra a estudio después del tiempo de incubación, en la misma situación en que la habíamos dejado, notándose apenas un *halo blanco* en el borde superior que, excepcionalmente, llega a ser un anillo blanco.

Las *reacciones dudosas* son aquellas que presentan un anillo de crema del mismo color que la leche descremada.

Las *positivas* las clasificamos en cuatro grados establecidos por la *intensidad del color del anillo*, por la *diferencia de color* entre el anillo de crema y el de la leche descremada y por la *medida del espesor* del anillo teñido.

La *intensidad del color* es índice de la cantidad de bacterias aglutinadas y absorbidas por la crema. Cuanto más intenso el color del anillo es evidente que el factor determinante del fenómeno se halla en mayor cantidad.

La *mayor diferencia de color* entre la leche descremada y su correspondiente anillo de crema, o cuanto más incolora se encuentre la leche descremada, denuncian una mayor ausencia de bacterias en la misma y por lo tanto debe interpretarse como un mayor ascenso de las mismas con la crema. Entonces debe interpretarse conjuntamente con la condición anterior, salvo de que se trate de un proceso de reducción.

Y finalmente consideramos el *espesor del anillo*. De una manera general y aisladamente no podemos usarlo, porque pueden presentarse anillos de gran tamaño con una coloración débil que no traduce un ascenso de crema que corresponda a especificidad brucelosa, y en cambio pueden haber anillos de menos espesor pero de intensidad mayor, que la tienen.

Bruhn señala:

0	reacción negativa.
+	" dudosa.
++	" positiva débil.
+++	" "
++++	" " intensa.

Vemos, pues, que la reacción es sencilla por su técnica, por su interpretación y por los útiles requeridos.

Aquí cabe señalar que el equipo propuesto por Huddleson y Carrillo sólo puede aceptarse como solución para el campo, y aun así subsiste la dificultad de obtener los blocks de material plástico sugeridos. En cuanto a los demás útiles no aventajan en nada a los de uso corriente.

El A. B. R. es de gran valor práctico, decíamos, en la lucha contra la brucelosis. Experiencias realizadas con la colaboración de los colegas citados, y que se continúan, confirman lo que dijéramos sobre sus resultados. Supera su eficacia a la lactosuero y a la alergia, y se acerca mucho a los resultados de la hemosueroaglutinación.

Basados en la concordancia de los resultados de hemosueroaglutinaciones y los A. B. R., el suscrito realizó numerosas reacciones con mezclas de leche que se remiten al Contralor de Leche para su inspección municipal, comprobándolas con lactosueros positivos o dudosos, a fin de investigar el estado sanitario de los rodeos lecheros de los establecimientos que remiten leche para el consumo de la capital. Con tal motivo se dirigió a las usinas pasteurizadoras desde donde realizó el estudio de las muestras de cada uno de los establecimientos remitentes.

Primero utilizó las muestras de tarro por tarro y de su correspondiente muestra total, y luego, debido a dificultades de orden práctico, continuó los exámenes en muestras correspondientes a la suma total del envío de cada uno de los remitentes. Así logró investigar los dos tercios de la totalidad de las leches enviadas a Montevideo, las cuales superaban, entonces, los 1.800 establecimientos.

Las pruebas realizadas permitieron localizar el 42 % de establecimientos cuyas leches pertenecerían a rodeos contaminados de brucelosis, a los cuales habría que agregar un 14 % de establecimientos con reacciones dudosas.

Ese hecho es una de las más valiosas conquistas de orden práctico del citado método de investigación. Desde una planchada de recibo de leche se podía realizar una investigación epizootiológica que con los métodos de investigación hasta ahora conocidos demandaría un esfuerzo costoso, prolongado, y en el que debían participar un elevado número de técnicos y colaboradores. Habría que extraer sangre de los animales de 1.200 establecimientos, enviarlas a Montevideo para investigar brucelosis. No es necesario que me detenga a señalar lo que ello significa. Sólo debo de agregar que esa investigación, practicada en la leche de los 1.200 establecimientos, fué realizada por una sola persona, sin más colaboración que la de aquellos que lavaban los tubos y las pipetas. Con esos datos es posible en cualquier momento levantar un mapa epidemiológico de la infección brucelósica en la cuenca lechera que abastece a Montevideo.

Es de señalar que las objeciones presentadas a este método de investigación, desaparecen en este caso. Si las leches de animales con mamitis o que estén finalizando su período de lactación, o las calostrales, dieran falsas reacciones positivas, las investigaciones en mues-

tras de envíos totales harían diluir tanto las características señaladas que no influirían en los resultados de las investigaciones practicadas.

En cuanto a que las leches con un bajo contenido de grasa dan falsas reacciones negativas, podemos afirmar, con el cuadro que tenemos a la vista, que leches de bajo contenido de grasa y hasta *aguadas*, nos han dado intensas reacciones positivas; y a la inversa, leches de alto contenido de grasa nos han dado resultados negativos. El contenido de grasa no influye en el resultado de la reacción, salvo, claro está, de que se trate de leches descremadas. (Cuadro N° 1.)

Cuadro N° 1.

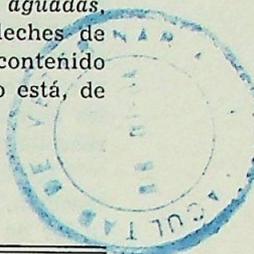
Est.	Gr.	A. B. R.	Est.	Gr.	A. B. R.	Est.	Gr.	A. B. R.
101	3,6	++++	163	4,3	+	213	3,5	D
104	3,6	—	168	3,8	—	215	3	++++
105	3,7	++	170	3	++++	239	4,4	D
112	2,6	+	171	2,8	—	248	2,7	+
115	3,5	—	173	3	++	285	4,2	—
116	5,5	D	175	2,9	++++	286	3,2	—
118	3,7	—	177	2,9	++	290	3,2	+++
126	4	+++	182	3,4	—	293	3	+++
152	4	+	189	3,6	—	294	3,5	—
158	4,3	D	200	2,9	++++	297	2,9	++++

Algunos ejemplos que nos muestran la falta de relación entre materia grasa y A. B. R. Est.: N° de establecimiento; Gr.: materia grasa. Los números de los establecimientos corresponden al protocolo del trabajo.

Las leches calostrales y de mamitis, se dice, pueden ofrecer resultados de falsos positivos cuando se estudian aisladamente. Y bien, si en algunos casos de mamitis, y en las calostrales, algunas características de viscosidad, etc., junto con una exagerada sensibilidad antigénica pueden presentar falsas reacciones, no autoriza para restar jerarquía al método, sino que se debe buscar la manera de neutralizar tales fenómenos, y si ello no fuera posible, señalar dichas leches por métodos adecuados y no tomar en cuenta sus resultados. A nadie se le ha ocurrido negar el valor de la hemosueroaglutinación porque practicada en sueros alterados por hemólisis o contaminación, dificulten e imposibiliten, a veces, la marcha de la aglutinación; o porque en animales recién infectados o que hubieran abortado recientemente, reacciones negativamente durante algún tiempo.

Otra objeción que se le ha opuesto es la de que sus resultados, en leches individuales, pueden no ser exactos debido a las diferencias individuales en el tamaño de los glóbulos grasos.

Nosotros no tenemos experiencia de sus resultados en cada una de las razas lecheras más comunes, pero nuestra experiencia se ha reali-



zado casi exclusivamente en rodeos de raza holandesa y sus resultados positivos superan allí al 70 % de los positivos de hemosueroaglutinación practicados paralelamente y al mismo tiempo en los mismos animales. Quiere decir que si esos son los resultados obtenidos en leches de animales cuyos glóbulos grasos se caracterizan por tener menor volumen que los de las leches de ganados Jersey y Normandos, y por lo tanto serían los más lentos en presentar la ascensión de la crema y por consiguiente la prueba de Fleischauer, no puede temerse que en los animales en cuyas leches no predominen los glóbulos grandes, las reacciones sean negativas.

En cuanto a la influencia del tenor graso en los resultados de la reacción, debemos recordar que en experiencias realizadas en el Contralor de Leche, y citada anteriormente, no habíamos encontrado relación alguna; y en ocasión de las investigaciones practicadas en las usinas pasteurizadoras de Montevideo se hicieron más de 300 determinaciones de materia grasa, no encontrando, tampoco, ninguna relación entre ellos, baste decir que hemos tenido reacciones intensamente positivas con tenores grasos de 4,2, 4, 3,6, 3, 2,9 y reacciones negativas con tenores grasos de 4,2, 3,8, 3,6, 3,4 y 2,8. (Cuadro N° 2.)

Cuadro N° 2.

Est.	Tarros	A. B. R. positivas					D	N	G
		++++	+++	++	+				
10	12	8	—	—	—	—	4	+++	
11	6	3	2	—	—	—	1	+++	
13	7	—	—	—	—	—	7	—	
32	14	1	—	2	1	—	10	+++	
41	23	6	5	6	2	1	3	+++	
42	8	2	2	—	1	—	3	++	
44	4	1	—	1	1	—	1	++	
47	3	—	1	—	—	—	2	D	
48	3	—	—	2	1	—	1	N	
50	3	—	—	—	—	1	2	N	
52	4	—	—	2	1	—	1	N	
55	12	—	—	3	4	1	4	N	
56	6	1	1	1	—	—	3	+++	
61	3	1	—	—	—	—	2	+++	
68	4	—	—	—	1	2	1	D	

Cuadro demostrativo de los resultados obtenidos en una parte de la investigación realizada en una usina pasteurizadora. En la primera columna el número que asignamos a cada tambo, en la segunda el número de tarros que envía cada remitente; siguen las cuatro columnas correspondientes a las distintas reacciones positivas y luego de las dudosas y negativas. Finalmente, la G es la muestra total de la reunión de todos los tarros.

En cuanto a la especificidad de la reacción, debemos señalar que no sólo la hemos enfrentado a la hemosueroaglutinación, por entender que ella sola no es suficiente para la total definición de la entidad mórbida estudiada, sino que hemos recurrido paralelamente a la alergia brucelosa, a la lactosueroaglutinación y a la determinación del índice opsonocitofágico. Este trabajo está en marcha y próximamente podremos dar números que completarán lo que estoy expresando. Al mismo tiempo hemos preparado antígenos similares al utilizado para la investigación brucelosa, pero usando cepas de *Staphilococcus aureus* y de *Pseudomonas pyocianea*. Con ellos, particularmente con el primero, tuvimos algunos resultados positivos, pero no coincidentes con los obtenidos con el antígeno de A. B. R. Lo que nos ilustra más sobre el valor de la prueba. Esto será objeto de nuevas investigaciones.

En resumen: La reacción del anillo o ring test o A. B. R. o de Fleischauer, es un valioso método para la investigación epidemiológica de la brucelosis animal en la cuenca lechera, fundamento imprescindible de todo propósito de profilaxis de la brucelosis. Dada la sencillez de su técnica, de la posibilidad de investigar en muestras de leches mezcladas y de la claridad de su lectura, es un método que puede usarlo el veterinario en su trabajo diario, y si pudiera divulgarse tanto que todos los productores lo conocieran —cosa que me parece imposible— sería un medio del cual podría valerse cada productor para no admitir el ingreso a sus rodeos de los animales reaccionantes. Como esto en nuestro medio no es posible, podría circunscribirse a aumentar los elementos diagnósticos de uso práctico del veterinario.

Pero entiendo que su valor es mayor aún.

Ajustada su técnica a condiciones de seguridad, que en ningún caso deben faltar, es un método que deben practicar las autoridades de sanidad animal en todo plan de lucha contra la brucelosis animal.

Esto es lo que sugeríamos en 1947.

No podrá sustituir a la hemosueroaglutinación; pero asociándola, pueden simplificarse y mejorarse los trabajos de profilaxis de esta zoonosis.

Esta opinión ya fué expresada por investigadores daneses como Norell y Olson, Seit y Jorgensen, y Bruhn. Y lo particularmente significativo es que Dinamarca, país donde se realizaron las experiencias más interesante, prolongadas y extensas, la reacción de Fleischauer se utiliza como test oficial en la profilaxis de la brucelosis asociado a la prueba de hemosueroaglutinación.

Allí un rodeo puede declararse libre de brucelosis por la prueba negativa repetida de ring test, por tres pruebas de Fleischauer negativas consecutivas, practicadas a intervalos de cuatro meses y una prueba de hemosueroaglutinación practicada tres a seis meses después del último A. B. R. negativo.

Las reservas que puede presentar esta prueba deben ser superadas por una eficiente preparación del antígeno, una acertada interpretación de la prueba y eliminación de las muestras cuyos resultados puedan ofrecer dudas (mamitis y calostro).

Con la colaboración de los colegas Dres. Lombardo y Tórtora y el Sr. Fontán, continuaremos estudiando algunos de los problemas que presenta esta técnica de diagnóstico de la brucelosis animal, a fin de colaborar en la lucha contra la brucelosis en nuestro país.

Dado el carácter de esta conversación, y a fin de permitir las observaciones y preguntas que los colegas quieran hacer, suspendo aquí esta exposición.

Si es de interés de los colegas dispongo de datos concretos de las experiencias realizadas.

Debo señalar que estos trabajos se han realizado en el Centro de Investigación de la Brucelosis que dirigía el Prof. Dr. Pablo Purriel, y que después se llamó Departamento de Enfermedades Profesionales del Banco de Seguros; en el Laboratorio Central del Contralor de Leche y en el Instituto de Bacteriología de la Facultad de Veterinaria.

Han colaborado también, además de los colegas citados más arriba, y a quienes agradezco, los Dres. Boris Szyfres, Benigno Varela Rodríguez, Q. F. Sra. Olga P. de Tórtora y Br. F. Laborde.