

## ANTIGENO COLESTERINADO A BASE DE LIQUIDO CELOMICO, PARA UNA NUEVA PRUEBA DE FLOCULACION EN LAS ASCARIDIOSIS

J. González Castro y

T. Fernández Amela

Investigador del Consejo Superior  
de Investigaciones Científicas

Académico de la Real Academia  
de Medicina de Granada

Hasta el descubrimiento del ciclo evolutivo del *Ascaris lumbricoides* (Stewart 1916-18; Yoshida 1919; Ramson 1919 con Foster 1920 y Cram 1921), la ascaridiosis fué considerada como una helmintiasis exclusivamente intestinal y, por tanto, con manifestaciones patológicas, si no exclusivas, al menos predominantes por parte de este órgano. Con posterioridad a dicho descubrimiento, a pesar de quedar demostrado el largo camino a recorrer por las larvas, desde su llegada en los huevos al intestino hasta su retorno a él, después de su tránsito hepato-pulmonar, y no obstante experiencias humanas como las de los hermanos Koino (1922), tan demostrativas de la nocividad de estas formas inmaduras del parásito en fase de emigración, la presencia de los gusanos adultos en el intestino y sus consecuencias inmediatas han seguido dominando en la concepción patogenética de esta helmintiasis. Este enfoque incompleto del problema clínico de la ascaridiosis explica que, existiendo una técnica diagnóstica tan sencilla como la demostración de huevos del parásito en heces, no se hayan perfeccionado y generalizado algunas pruebas inmunodiagnósticas como la desviación de complemento, la precipitacion-reacción y la intradermoreacción que, a su mayor complejidad técnica, unían un grado relativo de especificidad; o más correc-

tamente hablando, una especificidad de grupo. Tal actitud no está justificada, pues ni la ovoscopia puede resolvernó todos los problemas diagnósticos que plantea la ascaridiosis, ni la complejidad y relativa especificidad de las pruebas inmunodiagnósticas son tan grandes que no pueda intentarse superarlas.

En lo que concierne al examen coprológico, sólo puede resolvernó el diagnóstico de las ascaridiosis con gusanos adultos en intestino, siempre y cuando alguno de ellos sea hembra que ponga huevos; en caso de áscaris machos exclusivamente, la ovoscopia será negativa. Durante el período de 68 a 86 días que es necesario transcurran en todo caso de ascaridiosis humana por *A. lumbricoides* para que las larvas efectúen su total ciclo de emigración y se hagan adultas en el intestino (Epstein 1892; Yoshida 1919; Vogel y Minning 1942; López Neyra 1948), su valor diagnóstico es nulo, así como en las infestaciones humanas con diversas especies de áscaris de animales. Si se exceptúa el *A. suum*, de las restantes especies ascaridianas de animales, sólo algunas en contadísimos casos llegan a cumplir la totalidad de su ciclo hasta formas adultas, siendo lo habitual hagan emigraciones hícticas, cuyas características aún no son bien conocidas en la especie humana, pero sí en algunos animales de experimentación (experiencias en roedores de Tiner 1951-52-53 y Sprent 1951-52-53), enquistándose en órganos y tejidos diversos para después ser destruídas, o bien llegando a intestino y saliendo al exterior con las heces. Ahora bien, la capacidad patogenética de los áscaris no se limita a su habitación intestinal, sino que también se extiende a los órganos y tejidos que habitualmente invaden en la fase somática de la infestación, y con menos frecuencia, aunque no raramente, a todos los órganos de nuestro cuerpo a donde pueden llegar por una emigración anómala, en el caso del áscaris humano, o por particularidades de su emigración en hospedador no óptimo, en el caso de especies ascaridianas de animales. La consecuencia de sus lesiones, aunque muchas veces sea de poca importancia, conduce otras a procesos graves e incluso mortales, según la intensidad de la infestación, órganos afectados y posible facilitación de actividades nocivas a otros agentes patógenos. Hechos demostrativos de lo que decimos podemos encontrar entre otros muchos en los trabajos de Koino (1922), Muller (1938), Vogel y Minning (1942) y Takata (1951), sobre afecciones pulmonares humanas desde muy ligeras hasta graves ob-

servadas en individuos experimentalmente infestados con *A. lumbricoides* y *A. suum* y los de Birk (1933), López-Neyra con González de Vega (1948) y González de Vega (1948) de afecciones del mismo tipo ocurridas de forma espontánea en el hombre; en los de Mercer y col. (1950) y Behrer (1951) de eosinofilia crónica intensa, ligera infiltración pulmonar, catarro, fiebre, hiperglobulinemia y hepatomegalia con lesiones granulomatosas hepáticas en las que se observaron larvas de *A. lumbricoides*, siendo posiblemente del mismo origen las lesiones hepáticas con eosinofilia observadas en los casos descritos por Zuelzer y Apt (1949) y por Perlingiero y Gyorgy (1947); en los de localización de larvas ascaridianas en cerebro como el de Beautyman y Woolf (1951) que encuentran una larva en el tálamo izquierdo de una niña muerta de poliomielitis, los de Lotmar (1951) con síntomas epilépticos y hemiparéticos, posiblemente debidos a focos reaccionales del cerebro, sensibilizados a las toxinas ascaridianas, por localización anterior de larvas, y el de Botman (1951) de aracnoiditis posterior en un niño muerto durante una epidemia de encefalitis con hallazgo de larvas en meninges; en los de localización ocular, como el de Parsons (1952) y probablemente algunos de los 46 casos de endoftalmitis en adolescentes americanos, cuyos ojos fueron estudiados histopatológicamente por Wilder (1950), mostrando abscesos eosinófilos o endoftalmitis granulomatosa y comprobándose en 24 la presencia de larvas nematoidianas, cuyo diagnóstico exacto no se hizo, aunque se pensó pudieran ser de anquilostoma; finalmente, en el caso de Adelson (1952) de un niño con larva ascaridiana en una extensa zona de necrosis con transformación granulomatosa y exudado inflamatorio en la pared del ventrículo izquierdo.

Esta enumeración con la que no hemos pretendido agotar la totalidad de la casuística, pone de manifiesto la necesidad de un método de inmunodiagnóstico, a ser posible de ejecución fácil y al alcance de cualquier laboratorio, que permitiera reconocer esta primera fase de la ascaridiosis, máxime si se tiene en cuenta que es durante ella cuando la estimulación antigénica y consecuente producción de anticuerpos alcanza su máximo y que las probabilidades para un diagnóstico histopatológico son mínimas, no sólo por la imposibilidad de obtener en vida biopsias de algunos órganos, sino también por la dificultad de precisar exactamente las lesiones en órganos asequibles y por lo prolijo de la localización

de las larvas en los cortes. Recordemos que Wilder para encontrar una larva de áscaris en un ojo, tuvo que llevar a cabo la paciente tarea (de heroica la califica Shoho 1953) de examinar 2.300 cortes seriados.

Por lo que respecta a la fase cavitaria o intestinal de la ascariidosis, son bien conocidos los casos de emigración de áscaris adultos con localizaciones muy diversas en pulmón, pleura, peritoneo, hígado, etc. En algunos de estos casos que no llegan a la mesa del cirujano por su evolución subaguda o crónica y en los que por un contacto más íntimo de los gusanos con el medio interno se incrementaría en forma acusada la formación de anticuerpos, una prueba inmunodiagnóstica asequible al laboratorio práctico podría resolver nuestras dudas sobre la etiología del proceso.

Independientemente de su interés práctico, una prueba inmunodiagnóstica fácil y segura constituiría un valioso medio auxiliar en la resolución de diversos problemas hoy día planteados en el campo de la investigación patogenética de las emigraciones larvares ascaridianas, y más concretamente, el de la acción vectorial. González Castro (1950) resumió las diversas aportaciones hechas por diversos autores al capítulo de la acción vectorial vermicular y en particular por larvas de áscaris, aportaciones que si bien son escasos, no siempre concluyentes y a veces contradictorias, abren amplios horizontes a la investigación. Destaca en este trabajo por su interés epidemiológico y sanitario su hipótesis sobre el papel de los nematodos intestinales humanos, y entre ellos el *A. lumbricoides*, como facilitadores de la infección por el virus poliomiélico e incluso como posibles vectores del mismo. Por lo que atañe al áscaris, independientemente de que pudiera intervenir como portador activo o pasivo del virus, es indudable que gusanos adultos, larvas en vías de emigración y virus comparten con relativa frecuencia la misma habitación intestinal y, por consiguiente, los gusanos con sus lesiones pueden facilitar su paso a través de la pared intestinal y lo que es mucho más interesante, arrastrarlo a órganos y tejidos más profundos incluyendo el sistema nervioso central. Esta hipótesis, que en lo concerniente al *E. vermicularis* ha encontrado apoyo en el resultado de las investigaciones epidemiológicas de Thompson (1949), González Castro con Mañas (1952-53) y Jones (1954) y en lo que respecta al *A. lumbricoides* en las de González Castro y Mañas

(1952-53) y en los casos de larvas ascaridianas en sistema nervioso de Beautyman y Wolf (1951) y de Botman (1951), adquiere nuevo interés como consecuencia de recientes trabajos.

La localización de larvas de áscaris en cerebro de animales que no eran sus hospedadores óptimos, fué ya observada por Fulleborn (1921) y por Yokogawa (1923) trabajando con ratones a los que infectaban con *T. canis*. Pero han sido las investigaciones en estos últimos años de Sprent (1951-52-53) y Tiner (1949-51-52-53) las que han puesto de manifiesto ciertas particularidades en cuanto a la emigración y localización de larvas ascaridianas de distintas especies, en diversas especies de roedores que no eran sus hospedadores habituales. Destaca entre ellas la tendencia de las larvas del áscaris del «raccoon» (mapache), del *A. columbaris* del «skunk» (zorrillo), del áscaris del tejón y del *T. canis* a emigrar a encéfalo y médula, ocasionando lesiones que para las tres primeras especies citadas pueden ser graves e incluso mortales, no así para la última, cuya localización nerviosa suele transcurrir sin manifestaciones neurológicas apreciables. Por el momento no contamos con datos seguros acerca de si larvas ascaridianas de animales, especialmente carnívoros domésticos y peridomésticos, presentan un neurotropismo similar en el hombre. Pero tal posibilidad debe tomarse en consideración, como también el papel que estas larvas pudieran desempeñar como factores provocadores o desencadenantes, por el arrastre del virus poliomiélico, de otros virus e incluso bacterias desde el intestino o desde la sangre a la intimidad del tejido nervioso. En este sentido es oportuno recordar, que larvas de *T. canis* han sido encontradas en el hombre (casos de granuloma eosinófilo hepático de Mercer y col. 1950, de Behrer 1951 y de Beaver y col. 1952), siendo muy probable que la larva de áscaris encontrada por Beautyman y Wolf (1951) en el núcleo «ventralis lateralis» del tálamo izquierdo de un niño muerto de poliomiélitis, fuese de *T. canis* y no de *A. lumbricoides* como apuntan los mismos autores.

Los trabajos de Shoho (1951-54) y los de Innes y Shoho (1952-53) sobre la *Cerebro-espinal Nematodiasis* o *Setariosis* y sus posibles relaciones con la Encefalitis Japonesa B, si bien referentes a la localización en sistema nervioso central de estos larvarios de un filárido (*Setaria digitata* de los bóvidos) cuando infesta hospedadores no específicos como cabras, ovejas, caballos y posiblemente hombre, constituyen una valiosa aporta-

ción a la patología de las emigraciones larvianas vermidianas en hospedadores no óptimos y un seguro exponente de su interés médico y veterinario. La coexistencia en sistema nervioso de las lesiones propias del virus encefalítico con las específicas del parásito (focos de encefalomalacia), según comprobaron en caballos Sugawa, Mochizuki y Yamamoto (1949) apoya las sugerencias de Sholo (1951) e Innes y Shoho (1952) de que las larvas filarianas actúan destruyendo la barrera hemato-encefálica, permitiendo la invasión por el virus. Pero la aportación más demostrativa del papel de larvas nematodias neurotrópicas como factor desencadenante en procesos virásicos encefálicos es la de Mochizuki, Tomimura y Oka (1953); trabajando con el áscaris del perro (*T. canis*) y con el virus de la Encefalitis Japonesa B demuestran que la emigración cerebral de las larvas del parásito fué considerablemente efectivo como factor provocador experimental de Encefalitis Japonesa B en los ratones, pareciendo actuar las larvas por destrucción de la barrera hemato-encefálica.

Todas estas consideraciones, unido a los resultados alentadores que en nuestras primeras experiencias obtuvimos (González Castro, Fernández Amela y Guevara Pozo 1955 y González Castro con Fernández Amela 1955) con la prueba de floculación para la triquinosis de Suessenguth y Kline (1944) utilizando el antígeno mejorado de Suessenguth (1947), nos animó a intentar obtener un antígeno y una prueba con igual fundamento para la ascariidiosis. En nuestras primeras tentativas para obtener una emulsión antigénica, utilizamos larvas del parásito humano (*A. lumbricoides*) siguiendo estrictamente la pauta de Suessenguth (1947), consiguiendo muestras que funcionaban correctamente. No obstante, considerando el íntimo parentesco biológico del *A. lumbricoides* y del *A. suum* (como nuevamente confirma Takata I 1951, provocando infestaciones experimentales humanas con el áscaris del cerdo), su estrecha comunidad antigénica cuando se opera con extractos totales del gusano (Campbell 1937), y la identidad de antígenos, si no total, al menos amplia, entre formas adultas y larvianas y entre diversos órganos y tejidos de un mismo gusano (Culbertson 1941, Canning 1929), decidimos emplear el líquido celónico del áscaris suino, lo que representaba una gran simplificación técnica. Con ello resolvíamos el problema del aprovisionamiento de gusanos, no siempre factible cuando se trata de la especie humana, eliminando también el proceso

complejo y poco productivo de la recogida de huevos uterinos, cultivo y liberación de larvas.

Para elaborar su antígeno, Suessenguth y Kline (1944) y Suessenguth (1947) preparan primero una suspensión de microcristales de colesantina virtiendo gota a gota una solución alcohólica de la misma sobre agua destilada, y a ella agregan un extracto alcalino de larvas de triquina liofilizadas, que al precipitar recubre los microcristales dotándolos de propiedades antigénicas específicas; al conjunto añaden suero salino fisiológico, resultando así la emulsión antigénica para la prueba. La sustitución del extracto alcalino de larvas de triquina por una mezcla en las debidas proporciones de líquido celónico y solución de carbonato sódico al 0.1 por 100, nos ha permitido obtener emulsiones antigénicas que funcionan correctamente con inmunisucros anti-áscaris y con sueros negativos y a las que denominamos A. S. K.

En intentos ulteriores para perfeccionar estas emulsiones, comprobamos que, virtiendo gota a gota la solución de colesantina sobre una mezcla de agua y líquido celónico y añadiendo después una pequeña cantidad de solución de carbonato sódico, se obtenían igualmente emulsiones antigénicas, pero algo más sensibles, estables y de microcristales más pequeños y uniformes. En atención a la originalidad de la técnica fueron denominadas A. O. Estas últimas han sido objeto principal de nuestro estudio, así como una modificación de las mismas consistente en el lavado repetido de los microcristales de colesantina con suero salino; a las emulsiones A. O. lavadas las denominamos A. O. L.

En el presente trabajo sólo nos vamos a referir a estos dos últimos tipos de emulsiones antigénicas, describiendo la técnica de obtención y dando una breve impresión general sobre los resultados hasta ahora obtenidos. Un estudio más amplio y detenido de los distintos tipos de emulsiones antigénicas y de su ensayo experimental será dado a conocer por uno de nosotros (F. Amela) en su tesis doctoral.

#### MATERIAL.

Se precisa el siguiente material:

1.º Pipetas de 1 y 2 c. c. divididas en décimas; pipetas Pasteur de punta capilar; probeta de 10 c. c. con tapón esmerilado; cajas de Petri de 30-40 cm. de diámetro; un cristizador de 2

litros de capacidad ; tubos cónicos de centrífuga de 10 c. c. ; tubos de hemolisis ; frasquitos de vidrio con tapón esmerilado de 15 c. c. ; portas excavados, placas de Kline o placas rectangulares de vidrio y útiles necesarios para hacer anillos de parafina ; escalpelo ; pinzas de disección ; centrífuga capaz de alcanzar 4.000-5.000 r. p. m.

2.° *Solución salina.*—Se prepara al 0'85 x 100 y en cantidad de 10-12 litros, debiendo esterilizarse al autoclave. Sirve para el lavado de los áscaris y para preparar la emulsión antigénica.

3.° *Solución de carbonato sódico.*—0'1 gr. de carbonato sódico anhidro Merck p. a., se disuelven en 100 c. c. de agua bidestilada. Sólo debe utilizarse recién preparada.

4.° *Solución de colessterina.*—1 gr. de colessterina Pfanstiehl C. P. (precipitada de alcohol para la prueba de Kline) se vierte en un frasco de vidrio de 125 c. c. con tapón esmerilado, agregando 100 c. c. de alcohol absoluto Merck p. a. Bien tapado el frasco se lleva a la estufa a 37° C, agitándose de vez en cuando hasta la completa disolución de la colessterina. Otras marcas de colessterina como la Merck y Kalbaum, pueden también utilizarse.

5.° *Líquido celómico.*—Se obtiene de áscaris del cerdo recogidos en el matadero en el momento del sacrificio y transportados al laboratorio en bocales anchos con solución salina fisiológica. Una vez en el laboratorio, se lavan 10-12 veces en suero salino estéril, hasta asegurarse no queda la menor traza de materias intestinales del cerdo, sometiendo finalmente cada ejemplar a un lavado a chorro con la misma solución. Dispuestos en un cristizador con suero salino estéril, se llevan a la estufa regulada a 37°C ; pasados 15-20 minutos se sacan de la estufa, seleccionándose aquellos ejemplares que por sus movimientos denotan gran vitalidad, volviendo a lavarse a chorro con suero salino estéril. Cada áscaris se enjuga entre varias hojas de papel de filtro, y por lotes de 5 ó 6, se disponen paralelamente en una caja de Petri. Con un escalpelo bien afilado, o mejor aún, con una cuchilla de afeitar, se hace una incisión de 2-3 cm. en ambos extremos de cada gusano, procurando no profundizar demasiado de forma que no se lesionen esófago ni intestino, reduciendo así en lo posible toda contaminación bacteriana de este origen. Valiéndose de cualquier dispositivo (cuña de madera, varilla gruesa de vidrio) se da cierta inclinación a la caja de Petri con objeto de que el

líquido celómico que fluye de los gusanos se acumule en su parte más declive ; de aquí se recoge con pipeta y se trasvasa a un tubo de centrífuga. El deslizamiento con ligera compresión del dorso del escalpelo sobre la superficie de los áscaris, facilita la salida del líquido celómico. Una vez en el tubo, se centrifuga a 3.000-4.000 r. p. m. durante una hora, para descartar partículas de tejidos y gérmenes que pudieran haber sido arrastrados de la cubierta de los gusanos. El líquido sobrenadante se decanta en un tubo de hemolisis, debiendo utilizarse inmediatamente en la elaboración de las suspensiones antigénicas.

6.° *Agua recientemente bidestilada.*

7.° *Sueros control negativos y positivos.*— Los positivos pueden ser de individuos o de cerdos que padezcan ascaridiosis, si bien son preferibles los obtenidos de conejos a los 15-20 días de su infestación experimental con 100-500 huevos larvados de *A. suum*. Preferible a una simple infestación será hacerla doble con intervalo de 25 días, contando a partir de la última infestación la fecha adecuada para hacer la sangría. En cuanto a los sueros negativos, no es recomendable usar los de individuos o cerdos sin huevos de áscaris en heces, puesto que pueden encontrarse en fase de invasión tisular, o con parásitos exclusivamente machos o incompletamente maduros, o poseer anticuerpos de infestaciones anteriores. Tampoco se deberán emplear indiscriminativamente sueros de conejos normales, pues por su alimentación vegetal pueden haber sido infestados espontáneamente, como los autores han podido comprobar. Lo indicado es utilizar para este fin conejos criados en el laboratorio y alimentados con dieta que excluya este peligro, y comprobar sus sueros con otras pruebas inmunológicas como la precipitorreacción o la desviación de complemento. Los sueros controles se pueden conservar después de inactivados a 56° C agregándoles un 1 x 10.000 de mertiolato y manteniéndolos en el refrigerador a 4.° C. Deben utilizarse para la comprobación de las emulsiones antigénicas en el momento de su elaboración y posteriormente para vigilar su funcionamiento.

#### PREPARACIÓN DE LAS EMULSIONES ANTIGÉNICAS TIPO A. O.

Deberá ajustarse a la siguiente técnica :

1.° En la probeta de 10 c. c. con tapón esmerilado se ponen

0'8 c. c. de abua bidestilada y 0'2 c. c. de líquido celómico, mezclándose por ligera agitación. Resulta un líquido blanquecino opalescente, en el que eventualmente se forma un ligero y fino precipitado.

2.° Teniendo la probeta en la mano derecha, con la izquierda y con una Pipeta Pasteur de punta capilar, se agrega lentamente y gota a gota 1 c. c. de la solución alcohólica de colesteroína. Las gotas deberán caer sobre la mezcla agua-líquido celómico y no sobre las paredes de la probeta, agitándose esta enérgicamente después de cada adición. No es indispensable, pero sí conveniente colocar en un tubo de hemolisis el c. c. de solución alcohólica de colesteroína con el que se va a elaborar la emulsión antigénica y soplar en su seno con una pipeta Pasteur durante medio a un minuto, utilizándose después en la forma descrita. Operando así se suelen obtener emulsiones más sensibles.

3.° Tapada la probeta se agita enérgicamente durante un minuto, de forma que el líquido se proyecte del fondo a la boca del recipiente y viceversa.

4.° Se agregan 0'3 c. c. de solución de carbonato sódico anhidro al 0'1 por 100, agitándose como en el tiempo anterior durante un minuto.

5.° Con pipeta terminal se vierten rápidamente 2 c. c. de suero salino al 0'85 por 100, repitiéndose la agitación durante un minuto.

6.° Se deja reposar la emulsión durante 12 horas a la temperatura del laboratorio.

7.° Se agita enérgicamente un minuto, dejándola después reposar un cuarto de hora.

8.° Decantación a un tubo cónico de centrífuga, procurando no arrastrar la espuma y centrifugación durante 3 minutos a 500 r. p. m. El líquido supernadante blanco-lechoso constituye la emulsión antigénica lista para su uso, que debe trasvasarse a un frasquito con tapón de vidrio o de goma y conservarse en el refrigerador. Pasadas algunas horas, a veces días, las partículas antigenizadas de colesteroína sedimentan con o sin previa formación de flocos gruesos. Ello no influye sobre el buen funcionamiento de las emulsiones, si se agitan enérgicamente cada vez que se empleen, con lo que su uniformidad y perfecta dispersión de sus partículas se recupera de nuevo.

No todos los lotes de líquido celómico a la dosis de 0'2 c. c.

dan antígenos de la misma sensibilidad y por tanto de resultados comparables. La dosis de líquido celómico que permite obtener el óptimo de sensibilidad varía de unos a otros entre 0'1 y 0'35 c. c. Disponiendo de sueros patrones, deben elaborarse varias muestras de emulsiones antigénicas con 0'15, 0'20, 0'25, 0'30 y 0'35 c. c. de líquido celómico, y elegir entre ellas la de máxima sensibilidad. Operando así se obtienen emulsiones más homogéneas en sus resultados, pero no siempre de idéntica sensibilidad. Sospechando que esta desigualdad pudiera obedecer a la persistencia en las emulsiones de fracciones antigénicas solubles (no precipitadas por el alcohol) de concentración variable (de acuerdo con los cambios de composición de unos a otros líquidos celómicos), que absorbiendo anticuerpos proporcionalmente a su concentración y disminuyendo por tanto la cantidad de los actantes sobre los microcristales antigenizados de colesteroína producirían una desigual disminución de sensibilidad de unas a otras muestras, se probó el efecto del lavado con suero salino. Comprobamos que; procediendo así, a partir del 3.° y con más seguridad del 4.° lavado, no sólo se incrementaba notablemente la sensibilidad, sino que se igualaban muestras de sensibilidad original muy dispar.

#### OBTENCIÓN DE LAS EMULSIONES ANTIGÉNICAS A. O. L.

1.° Se elabora una emulsión antigénica A. O. por la técnica descrita.

2.° Se centrifuga en tubo cónico a 5.000 r. p. m. hasta la total sedimentación de los microcristales de colesteroína; se tira el líquido sobrenadante y se resuspende el sedimento en igual volumen de solución salina al 0,85 por 100.

3.° Se tapa el tubo con tapón de goma, agitándose enérgicamente un minuto.

4.° Se centrifuga a 5.000 r. p. m. hasta total sedimentación de la colesteroína, se tira el líquido sobrenadante y se resuspende el sedimento en igual volumen de suero salino. Esta operación se repite 2-3 veces más.

5.° Una vez resuspendido el sedimento después de la última centrifugación, se tapa el tubo y se agita enérgicamente durante 10 minutos.

6.° Se agrega 0'10 c. c. de solución de carbonato sódico al 0'1 por 100 y se agita enérgicamente durante 5 minutos.

7.° Se agrega 0'35 c. c. de alcohol absoluto repitiendo la agitación durante un minuto.

8.° Centrifugación a 500 r. p. m. durante 2 minutos. Se decanta el líquido blanco-lechoso sobrenadante que constituye la emulsión antigénica.

#### TÉCNICA DE LA REACCIÓN

1.° El suero sanguíneo se obtiene en la forma habitual, debiendo estar exento de hematies y hemoglobina. Se inactivará media hora a 56° C, pues en suero activo la sensibilidad de la prueba es mucho menor.

2.° En la oquedad de un porta excavado se pipetea 0'1 c. c. de suero. Cuando se desea probar simultáneamente varios sueros, es más práctico emplear placas de Kline o placas de vidrio con anillos de parafina.

3.° Después de agitar enérgicamente y durante un minuto la emulsión antigénica, se toma con pipeta Pasteur de punta capilar virtiéndose una gota sobre el suero.

4.° Colocado el porta o la placa sobre la superficie plana de la mesa, se rota durante 6 minutos, describiendo círculos de aproximadamente 1'5 cm. y a razón de 130-150 vueltas por minuto.

5.° La lectura de los resultados se hace al microscopio a 100 diámetros de aumento (objetivo 16 mm. y ocular 10 ×) y con poca intensidad lumínica. En caso negativo, se observarán los microcristales de colesteroína aislados y perfectamente dispersos en el seno del suero. En los sueros positivos se forman conglomerados firmes de cristales (flóculos), cuyo tamaño guarda relación con la intensidad de la reacción. Las positividades se expresan con una o varias cruces según el tamaño de los flóculos y el mayor o menor número de microcristales de colesteroína que quedan libres.

Al efectuar cada prueba, se deberán incluir tres controles, uno en suero negativo, otro en suero positivo y otro en solución salina fisiológica.

*Titulción de los sueros positivos.*—De los sueros positivos se hacen diluciones (1/2, 1/4, 1/8, etc.), repitiendo la prueba con

cada una de ellas. El título del suero se expresará por la última dilución que fué positiva, seguida de una o más cruces, según la intensidad a que en ella se da la reacción.

#### COMPROBACIÓN DE LA ESTABILIDAD, ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DE LAS EMULSIONES ANTIGÉNICAS A. O. Y A. O. L.

##### *Estabilidad.*

Ambos tipos de emulsiones dejadas en reposo sedimentan, con o sin formación previa de flóculos macroscópicos, en un tiempo que varía de algunas horas a 2-3 días. Habitualmente este fenómeno no presupone la firme conglomeración de los microcristales de colesteroína. Todas las muestras examinadas de emulsiones A. O., durante un plazo de 50 días, se homoneizaban completamente después de agitación y las pruebas control en suero salino y en sueros negativos mostraron siempre completamente aislados y perfectamente dispersos los microcristales de colesteroína. Durante el mismo espacio de tiempo algunas emulsiones A. O. L. tendían a formar pequeños y firmes conglomerados de microcristales (verdaderos microfloculos) más difíciles de deshacer por agitación, que en las pruebas controles daban la imagen microscópica de una reacción débil positiva. Una agitación muy prolongada y enérgica seguida de ligera centrifugación (500-r. p. m.) y decantado, suele corregir este defecto. Como además de esto las emulsiones lavadas y conservadas largo tiempo pueden sufrir contaminaciones por hongos, es aconsejable conservar las emulsiones A. O. en el refrigerador y preparar a partir de ellas las A. O. L. que hayan de emplearse en un corto período de tiempo.

##### *Especificidad.*

Las pruebas de especificidad se efectuaron: 1.° Con sueros negativos de conejos criados y alimentados con dieta especial en el laboratorio para prevenir contaminaciones ascaridianas espontáneas y con sueros humano pertenecientes a niños de 1 a 3 meses. 2.° Con sueros anti-*áscaris*: a), de cerdos parasitados por *A. suum* y de conejos experimentalmente infestados con este gusano; b), de personas con abundantes huevos de *A. lumbricoides* en heces fecales y de conejos experimentalmente infesta-

dos con este gusano; c), de ovejas, cabras y vacas parasitadas por *N. vitulorum*, *A. ovis* y *A. apris*, respectivamente. 3.º Con suero de un conejo inoculado con extracto salino total de *E. vermicularis* (30 gusanos adultos) recogidos en apéndices humanos, el de un cerdo joven parasitado por *T. trichiura* y no parasitado por áscaris y el de conejos y ratones infestados experimentalmente con *Trichinella spiralis*. 4.º Con sueros de ovejas, cabras y vacas parasitadas por *F. hepática* y por *Quiste hidatídico* y de conejos inoculados con líquido hidatídico.

Todos los sueros fueron sometidos previamente a pruebas de precipitación con extracto salinos totales de *A. lumbricoides* y *A. suum*; además para aquellos correspondientes a helmintos distintos de los áscaris, con extractos salinos de los parásitos homólogos, exceptuándose el suero anti-*T. trichiura* que no fué probado. Los extractos salinos para estas pruebas se prepararon por triturado de gusanos frescos, diluyendo el triturado al 1 x 100, centrifugando esta solución y empleando el líquido supernadante puro y diluído al 1 x 100, 1 x 500 y 1 x 1.000. La prueba de precipitación se efectuó por el método del anillo, superponiendo suero y solución antigénica, dejando a la temperatura de la habitación y haciendo la lectura a los 30, 60 y 120 minutos. En todas las pruebas se colocaron controles de suero salino y suero negativo. Se seleccionaron como sueros tipo para la comprobación de las emulsiones antigénicas, aquellos sueros normales que dieron una prueba de precipitación negativa a *A. lumbricoides* y a *A. suum*, los sueros anti-áscaris con precipitarreacción positiva a los antígenos de dichos áscaris, y los inmunisueros de las especies vermidianas no ascaridianas, que no reaccionaron con los antígenos ascaridiósicos y sí con los antígenos homólogos. De los sueros antivermidianos se prefirieron aquellos que daban una precipitorreacción positiva a más altas diluciones de las soluciones antigénicas correspondientes. En la comprobación de cada lote de emulsiones antigénicas se emplearon 2 a 4 sueros de cada tipo, con excepción de los antisueros *E. vermicularis* y *T. trichiura* de los que sólo se utilizó uno.

Como síntesis de los resultados obtenidos, podemos decir que ambos tipos de emulsiones antigénicas floclaron por lo general intensamente en sueros anti-áscaris homólogos, no haciéndolo en sueros negativos. Con sueros anti-áscaris heterólogos (*N. vitulorum*, *A. lumbricoides*, *A. ovis* y *A. apris*) reaccionaron positi-

vamente, poniendo así de manifiesto la comunidad antigénica existente entre diversas especies de áscaris ya precedentemente comprobada por diversos autores (Schwartz 1920, Hektoen 1926, Campbell 1937), utilizando la prueba de precipitación con extractos salinos totales. Con los antisueros *E. vermicularis*, *T. trichiura*, *T. spiralis*, *Quiste hidatídico* y *F. hepática*, la prueba fué negativa. Así, pues, la prueba de floclación para la ascariidiosis mostró una especificidad de grupo común a distintas especies de la familia *Ascaridae*, no dando reacciones cruzadas con dos especies nematoidianas frecuentes en el hombre, ni con otras dos especies de gusanos representativas de las clases *Ceetoda* y *Trematoda*.

#### Sensibilidad.

Ya dijimos que cuando se preparan las emulsiones antigénicas A. O. con líquido celómico de distintos áscaris y más aún con líquidos de áscaris procedentes de distintos animales, presentan diferencias de sensibilidad frente a un mismo suero positivo. La cuantía de estas diferencias en suero puro puede llegar a ser de dos + y en las titulaciones hasta 3 dobles diluciones. Por el contrario, la sensibilidad de distintas muestras de emulsiones A. O. L. suele ser idéntica o muy parecida; en suero puro raramente se aprecian diferencias de un +, obteniéndose con un mismo suero idéntico título con ligeras variaciones de la intensidad de la reacción en la dilución límite.

Las emulsiones A. O. L. son más sensibles que sus homólogas A. O. Cuando estas últimas se elaboran con la dosis óptima de líquido celómico y al mismo tiempo se opera con solución de coleslerina soplada, la diferencia en la titulación de un mismo suero positivo puede no ser superior a una doble dilución. Trabajando con emulsiones elaboradas con una dosis fija (0'2 c. c.) de líquido celómico obtenido de diferentes lotes de áscaris, las diferencias son de 2 a 5 dobles diluciones, llegando excepcionalmente a 7.

En conejos infestados con una dosis de huevos larvados de *A. suum* que osciló entre 40 y 200 huevos, la prueba de floclación con emulsiones A. O. L. fué por primera vez positiva del 5.º al 10.º día después de la infestación; la máxima concentración de anticuerpos se observó entre el 15.º y 25.º día, el título

máximo fué 1/256 y la prueba se negativizó en los animales que recibieron más bajas dosis el 75.º día, continuando en los demás positiva sin exceder su título de 1/4.

También con emulsiones A. O. L. la prueba fué positiva en un total de 17 sueros humanos investigados, pertenecientes a individuos con huevos de áscaris en heces; el título máximo fué 1/128 y el más bajo 1/4. Por excepción observamos un título de 1/500 en un individuo con infiltrado eosinófilo y otro del 1/1.000 en una enferma diagnosticada de sarcoma hepático, diagnóstico que tras laparatomía pareció confirmar la inspección de hígado, pero no la biopsia en la que se pudieron observar lesiones granulomatosas inespecíficas con cierto predominio de células eosinófilas. Ulteriormente la evolución favorable del proceso con recuperación casi total al año y medio descartó en absoluto la etiología sarcomatosa.

#### RESUMEN

Se describen dos tipos de emulsiones antigénicas colesterinadas a base de líquido celómico de *A. suum* (tipo A. O. y tipo A. O. L.) para una nueva prueba de floculación en la ascariidiosis. Frente a sueros de diversas especies de áscaris mostraron una especificidad de grupo. Frente a inmuniserum correspondientes a *E. vermicularis*, *T. trichiura*, *T. spiralis*, *F. hepática* y *Quiste hidatídico* no hubo reacciones cruzadas. Las emulsiones tipo A. O. se mantienen por más tiempo estables que las A. O. L., pero su sensibilidad es menor y, al contrario que éstas, presenta variaciones en muestras elaboradas con distintos lotes de líquido celómico. Con emulsiones A. O. L., las primeras reacciones positivas se observaron ya al 5.º día en conejos infestados con *A. suum*; el título máximo se alcanzó del 15.º al 25.º días, y en conejos débilmente infestados la prueba fué negativa a los 75 días, no así en los que recibieron dosis más altas de huevos. Con ambos tipos de emulsiones, pero especialmente con las A. O. L., la positividad de un suero puede valorarse determinando su título, esto es, la máxima dilución del mismo que todavía da reacción positiva. En conejos experimentalmente infestados se observó un título máximo de 1/256. En 17 individuos con huevos de áscaris en heces el título máximo fué 1/128 y el mínimo, 1/4. Por excepción se observó un título de 1/500 en un caso de infiltrado eosinófilo y otro de 1/1.000 en una enferma con lesiones granulomatosas difusas de hígado.

#### SUMMARY

Two types of colesterinated antigenic emulsions elaborated with celomic fluid for a new flocculation test for ascariidiosis are described. They are named A. O. and A. O. L. respectively. Tested with immuniserum corresponding to different ascaris species, they revealed a group specificity. Tested with immuniserum belonging to *E. vermicularis*, *T. trichiura*, *T. spiralis*, *F. hepatica* and *Hidatic cyst*, cross reactions were not noted. The A. O. emulsion type remain estable longer than the A. O. L. one, but its sensibility is smaller, and in contrast to that showed variation from one to another samples when they were made with different lots of celomic fluids. Using A. O. L. emulsions the earlier positives reactions were observed in rabbits the 5<sup>th</sup> day after infestation with *A. suum*; the maximum title was reached between 15<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> day; in rabbits weakly infested the test was negative towards 75<sup>th</sup>, but it was not so in that infested with higher doses of eggs. Employing both types of antigen emulsions, but specially with the A. O. L. type, the positivity of a serum could be estimated for determining its title, that is, the highest dilution giving a positive reaction. In experimentally infested rabbits a maximum title of 1/125 was observed. In 17 individuals with ascaris eggs in feces, the maximum title was 1/128 and the minimum 1/4. Excepcionally a title of 1/500 was observed in a case of eosinophilic infiltrate of lung and other of 1/1.000 in a woman with granulomatous diffuse lessions of the liver.

#### BIBLIOGRAFIA

- ADELSON, L. 1952.—Larval myocardial ascariasis: report of a case. *Ohio St. Med. J.*, 48/8 (723-726).
- BEAUTYMAN, W., y WOLFE, A. L. 1951.—An ascaris larva in the brain in association with acute anterior poliomyelitis. *J. Path. Bact.*, 60/4 (635-647).
- BRAVER, P. C.; SNYDER, C. H.; CARRERA, G. M.; DENT, J. H.; LAFPERTY, J. W. 1952.—Chronic eosinophilia due to visceral migrants. Report of Three Cases. *Pediatrics*, 9/1 (7-19).
- BEHRER, M. R. 1951.—Hypereosinophilia with eosinophilic granuloma of the liver with ascaris infestation. *J. Ped. St. Louis*, 38/5 (635-640).
- BIRE, 1933.—*Dtschr. Med. Woch.*, 59 (841). (Citado por Rodríguez López-Neyra y González de Vega 1948.)
- BOTMAN, T. P. J. 1951.—Arachnoiditis posterior nematoides. *Muandsch. v. Kindergerneeskunde*, 29/4 (141-144).
- CAMPBELL, D. H. 1937.—The immunological specificity of a polysaccharide fraction from some common parasitic helminthes. *J. Parasitol.*, 23/4 (348-353).

- CANNING, 1929.—*Am. J. Hyg.*, 9 (207). (Citado por Culberston.)
- CULBERSTON, J. T. 1941.—Immunity against animal parasites. Columbia University Press, 1941. Infections with *Ascaris* and related forms págs. 194-200.
- EPSTEIN, A. 1892.—*Jarhbuch. Kinderheil.*, 31 (287). (Citado por Rodríguez López-Neyra y González de Vega 1948.)
- GONZÁLEZ CASTRO, J. 1950.—Relaciones mutuas entre helmintos y microbios. Papel vectorial de los helmintos. *Rev. Ib. Parasitol.*, 10/4 (401-426).
- 1950.—Comentarios acerca de nuestra hipótesis sobre vehiculación helmintiaua del virus de la poliomiélitis, con motivo de un trabajo de A. W. S. Thompson. *Rev. Ib. Parasitol.*, 10/4 (401-426).
- GONZÁLEZ CASTRO, J.; MAÑAS MONTALVO, J. 1952.—Posible infección accidental y simultánea con virus poliomiélfico y hùecos de *Enterobius vermicularis*. *Rev. Ib. Parasitol.*, 12/3 (227-287).
- 1953.—Helmintiasis intestinales en poliomiélficos. Estudio de 24 casos. *Rev. Ib. Parasitol.*, 13/1 (3-77).
- GONZÁLEZ CASTRO, J.; FERNÁNDEZ AMELA, T.; GUEVARA POZO, D. 1955.—Primeros ensayos en España de la prueba de Suessenguth y Kline para el diagnóstico de la triquinosis. *Rev. Ib. Parasitol.*, 15/1 (3-31).
- GONZÁLEZ CASTRO, J.; FERNÁNDEZ AMELA, T.; GUEVARA POZO, D. 1955.—Comportamiento de la prueba de Suessenguth y Kline en sueros humanos y de animales afectos de diversas parasitosis. Tomo Jubilar Homenaje al Prof. López-Neyra, págs. 193-220.
- GONZÁLEZ CASTRO, J., y FERNÁNDEZ AMELA, T. 1955.—Nuevas aportaciones al estudio de la prueba de Suessenguth y Kline. *Rev. Ib. Parasitol.*, 15/3 (243-257).
- GONZÁLEZ DE VEGA, N. 1948.—Estudio clínico del paso pulmonar de larvas de áscaris en el hombre. *Rev. Ib. Parasitol.*, 8/1 (94-112).
- HEKTOEN, L. 1926.—*J. Infect. Dis.*, 39 (342). (Citado por Campbell.)
- INNES, J. R. M., y SHOHO, CH. 1952.—An epidemic cerebrospinal disease in animals, with focal encephalomyelomalacia produced by immature forms of nematode (*Setaria digitata*). Pathological study in animals and possible significance in human neurology. *Acta Neurol. Psych. Belg.*, 52/7 (417-421).
- 1953.—Cerebrospinal Nematodiasis. Focal encephalomyelomalacia of animals caused by nematodes (*Setaria digitata*). A disease which may occur in man. *Arch. Neurol. Psych.*, 70 (325-349).
- JONES, M. F. 1954.—*Enterobius vermicularis* infection in patients with Poliomyelitis. *Proc. Helm. Soc. Washington*, 21/1 (15-17).
- KOINO, S. 1922.—Experimental infection of the human body with ascaris. *Jap. Med. World*, 2 (317-326).
- LOTMAR, F. 1951.—Zur frage der verursachung von herdsymptomen des grosshirns durch ascaridians. *Schwizer Arch. Neurol. Psych.*, 67/2 (306-322).

- MERCER, R. D.; LUNG, H. Z.; BLOOMFIELD, R. A., y CALDWELL, F. E. 1950.—Larval ascariasis as a cause of chronic eosinophilia with visceral manifestation. *Am. J. Dis. Child.*, 80/1 (46-58).
- MOCHIZUKI, H.; TOMIMURA, T., y OKA, T. 1953.—Cerebrospinal Nematodiasis as a provoking factor in Japanese Encephalitis: experimental aproch (I). *Bull. of the Naniwa University. Series B Agricultural and Natural Science*, 3 (29-36).
- MULLER, R. W. 1938.—*Beitrag. Klinik. Tuberk.*, 92 (254). (Citado por Rodríguez López-Neyra y González de Vega 1948.)
- PARSONS, H. E. 1952.—Nematode chorioretinitis. Report of case, with photographs of a viable worm. *Arch. Ophth.*, 47/6 (770-800).
- PERLINGIERO, Y., y GYORGY, P. 1947.—Chronic eosinophilia: report of a case with necrosis of liver, pulmonary infiltrations, anemia and ascaris infestation. *Am. J. Dis. Child.*, 73 (34).
- RANSOM, B. H. 1919.—A newly recognized cause of pulmonary disease *Ascaris lumbricoides*. *J. Am. Med. Ass.*, 73/16 (1210-1212).
- RANSOM, B. H., y CRAM, E. B. 1921.—The course of migration of ascaris larvae. *Am. J. Trop. Med.* 1/3 (129-159).
- RANSOM Y FOSTER, W. D. 1920.—Observations on the life history of *Ascaris lumbricoides*. *Dep. Agricul. Bull. n.º 817*, 47 págs. Unit. St.
- RODRÍGUEZ LÓPEZ-NEYRA, C. 1948.—Los Ascaridos. *REV. IB. PARASITOL.* 8/1 (33-44).
- RODRÍGUEZ LÓPEZ-NEYRA, C., y GONZÁLEZ DE VEGA, N. 1948.—Las neumobronquitis ascaridianas larvarias. *Rev. Ib. Parasitol.*, 8/1 (87-93).
- SHOHO, CH. 1951.—The pathology of seriosis in Japan and it's significance in veterinary and medical science. *Jap. Exp. Med.* 21 (449-462).
- 1954.—Epizootische cerebrospinale Nematodiasis (Setariosis) and ihre verzweigten probleme. *Deuts. Tier. Woch.* 3/4 (25-32).
- SPRENT, J. F. A. 1951.—On the migratory behavior of the larvae of various ascaris species in mice. *J. Parasitol.* 37 (5, Sec. 2) Sup. pág. 21.
- 1952.—(1). Migratory behavior of ascaris larvae in mice. (2). The dentigerous ridges of the human and pig *Ascaris*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46/4 (278).
- 1952.—On the mygratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. I. Distribution of larvae in tissues. *J. Infect. Dis.* 90/2 (165-176).
- 1953.—On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. II. Longevity of encapsulated larvae and their resistance to freezing and putrefaction. *J. Infect. Dis.*, 82/2 (114-117).
- KHWARDZ, B. 1920.—*J. Parasitol.* 6 (115). (Citado por Campbell 1937.)
- STEWARTZ, F. H. 1916.—On the life history of *Ascaris lumbricoides*. Preliminary note. *Brit. Med. J.* (2.596) 2 (5-7).
- 1916.—Further experiments on *Ascaris* infection. *Ib.* (2.910) 2 (486-488).

- 1916.—On the life-history of *Ascaris lumbricoides*. *Ib.* (2.918) 2 (753-754).
- 1917.—On the development of *Ascaris lumbricoides* Lin. and *Ascaris suilla* Duj. in the rat and mouse. *Parasitology Cambridge* 9/2 (213-227).
- 1917.—Note on *Ascaris* infection in man, the pig, rat and mouse. *Indian M. Gaz.* Calcuta, 52/8 (272-273).
- The life history of *Ascaris lumbricoides* (Letter to editor. *Ib.* 10 52/10 (379-380)).
- 1918.—On the development of *Ascaris lumbricoides* and *A. mystax* in the mouse. Part. 2. *Parasitology Cambridge* 10/2 (189-196).
- 1918.—On the life history of *Ascaris lumbricoides* L. *Ib.* 10/2 (197-205).
- SUESSENGUTH, H., y KLINE, B. S. 1944.—A simple rapid flocculation slide test for trichinosis in man and swine. *Amer. Clin. Path.* 14/9 (471-484).
- SUESSENGUTH, H. 1947.—Improved antigen for the slide test for trichinosis. *Amer. J. Med. Techn.* 13/5 (213-224).
- SUGAWA, Y.; MOCHIZUKI, H.; TAMAMOTO, S. 1949.—First report on Japanese Equine Encephalitis Bull. 8 Government Station for Animal Hygiene, Tokyo.
- TARATA, I. 1951.—Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. *Kitasato Arch. Exp. Med* 23/4 (49-59).
- THOMPSON, A. W. G. 1949.—A contribution to the epidemiology of Poliomyelitis in New Zealand. *J. Hyg.* 47 (79-101).
- TINER, J. D. 1949.—Preliminary observations on the life history of *Ascaris columbiana*. *J. Parasitol.* 35/6 (Sec. 2) pág. 13.
- 1951.—A redescription of *Ascaris lacvii* Leidy 1856 and notes on ascaris in rodents. *Proc. Helm. Soc.* Washington, 18 (126-131).
- 1951.—Observations on larval carnivore ascarids in rodents *J. Parasitol.* 37/7 Sec. 2, pág. 21.
- 1952.—Speciation in the genus *Ascaris*: Additional experimental and morphological data. *J. Parasit.* 38/4, Sec. 2, pág. 27.
- 1953.—The migration, distribution in the brain, and growth of ascarid larvae in rodents. *J. Infect. Dis.* 92/2 (105-113).
- Fatalities in rodents caused by larval *Ascaris* in the central nervous system. *J. Mamm.* 34/2 (153-167).
- VOGEL, H., y MINNING, W. 1942.—Beitraege zur Klinik der Lungen-Ascariasis und zur Frage der flüchtigen eosinophilen Lungeninfiltrate. *Beitr. Klin. Tuberk.* 92 (620-654).
- WILDER, HELENOR, C. 1950.—Nematode Endophthalmitis. *Trans. Amer. Acad. Ophthal. Otolaryng.* 54 (99).
- YOSIDA, S. 1919.—On the development of *Ascaris lumbricoides* L. *J. Parasitol.* 5/3 (105-115).
- 1919.—On the migrating course of ascarid larvae in the body of the host. *Ib.* 6/1 (19-27).
- with extreme eosinophilia. *Am. J. Dis. Child.* 78 (153).
- ZURLZER, W., y APT, L. 1949.—Disseminated visceral lesions associated