Revista Ibérica de Parasitología

TOMO XXXII | ENERO-JUNIO 1972 | NUM. 1y2

Instituto "López-Neyra" de Parasitología
Sección de Inmunología
Granada. España

PURIFICACION DE LARVAS DE *TRICHINELLA SPIRALIS*

por

J. GONZALEZ CASTRO * y M. RODRIGUEZ OSORIO **
M. C. PEREZ GARRO ** y V. GOMEZ GARCIA ***

SUMMARY

A rapid approach is described for obtaining Trichinella larvae free of digestive residue and antigen matter of the host. In synthesis, it is a modification of Bearman's device and refers to the collection of larvae sedimented over a 4% carboxi-methyl-celullose solution. This CMC solution does not prevent the moving larvae device from dropping to the bottom, while it stops or softens the sedimentation of digestive residue thus permitting the collection of larvae in a pure state.

This simple approach allows, for the obtention of larvae free of contamination due to the antigen of the host, therefore it is highly recommendable for the securing of the purest inmune-reactives earmarked for antigenic analyses.

Desde el momento que una carne triquinósica alcanza el aparato digestivo humano, o de otro animal receptivo, se suceden una serie de fenómenos biológicos con una doble repercusión en la vida del parásito y en la del hospedador. El parásito cumplirá, o al menos intentará cumplir, su ciclo vital, indispensable para su pervivencia. El organismo humano o animal sufrirá las consecuencias del des-

* Profesor de Investigación y Jefe de la Sección.
** Becarios.
*** Investigador Científico.

arrollo de este ciclo en su intimidad tisular. Las alteraciones que el parásito directamente provoque, unido a las modificaciones derivadas de su reactividad defensiva, se traducirán en un cuadro patológico, generalmente típico y con frecuencia grave.

El ciclo humano de la *T. spiralis* puede resumirse así:

1) Desenquistamiento de larvas en el estómago y paso al intestino.

2) Maduración de las larvas a formas sexualmente maduras, y copulación.

3) Penetración en la mucosa intestinal, de las hembras fecundadas, desarrollo hasta hembras grávidas y parturición.

4) Penetración de los embriones a través de la pared intestinal, paso a la circulación sanguínea y arribada a la musculatura.

5) Crecimiento de los embriones y enquistamiento. En el hombre, salvo casos excepcionales de canibalismo, el ciclo vital de la triquina, ha tomado una vía muerta. Con el tiempo los quistes se calcifican y los embriones mueren.

Interesa destacar, que, aproximadamente, de los cinco a los doce días, a veces más, tiene lugar el desarrollo intestinal del parásito. Asimismo, que la primera arribada de larvas a los músculos sucede del quinto al sexo día, alcanza su máximo del séptimo al onceavo día, disminuyendo después, pero prolongándose en ocasiones hasta más del vigésimo día; alrededor de los treinta días pueden observarse quistes con embriones ya maduros, con capacidad infectiva. Para esta misma fecha suele llegar a término la vida de las hembras adultas en pared intestinal.

El cuadro clínico de la Triquinosis calca en cierto modo las fases principales del ciclo del parásito. En las fases 1, 2 y 3, —primera semana de la enfermedad o algo más— los síntomas gastrointestinales son dominantes, pudiendo confundirse con un proceso gastroentérico de etiología bacteriana.

Durante la fase 4.ª, destaca la sintomatología general con fiebre elevada y todo su cortejo sintomático, que haría pensar asimismo en una infección microbiana. Ya en este período se observa un edema especialmente facial y se inicia la eosinofilia. Finalmente en el período 5.º, los dolores musculares expresan bien la localización de las larvas y daño muscular y hay una eosinofilia muy marcada,

que contrasta con el cuadro febril agudo, siendo por ello síntoma claro, orientador del diagnóstico.

Aún en los casos más típicos, incluso cuando su presentación epidémica añade un dato presuntivo más de gran valor, resulta difícil afirmar la existencia de una triquinosis, sin una comprobación serológica de inmunicuerpos. Pero es el caso que muchas formas de triquinosis se presentan aisladas, con sintomatología menos típica, o aún con manifestaciones restringidas a determinados órganos, que aunque graves por afectar a funciones importantes (corazón, sistema nervioso, ojos), no resulta fácil orientar su diagnóstico clínico. Entonces es imprescindible para aclararlo el uso de pruebas inmunológicas.

En los últimos años las técnicas de inmunodiagnóstico para la triquinosis han progresado notablemente. Las pruebas del colesterol, de la bentonita, del látex, de la hemaglutinación indirecta y la inmunofluorescencia con cutículas larvarias, han representado un notable progreso diagnóstico. La inmunodifusión y la inmunoelectroforesis, van contribuyendo al conocimiento del espectro antigénico de la Triquina, y es de esperar consígase el aislamiento de fracciones de alta especificidad y sensibilidad. En otro sentido, el conocimiento de los antígenos triquinósicos, podrá ayudar al descubrimiento de vacunas eficaces. La posibilidad de descubrir en los primeros días y aún horas después de la infección, antígenos (no anticuerpos) triquinósicos en sangre, heces y orina (problema sobre el que actualmente trabajamos) permite abrigar esperanzas sobre un diagnóstico muy precoz de esta parasitosis.

Ahora bien, un problema básico, aparentemente sencillo de resolver, pero hasta ahora no totalmente resuelto, es la obtención de la materia prima, larvas de Triquina, totalmente libres de restos musculares y tejido conjuntivo. Es decir, la obtención de embriones de Triquina, exentos de cualquier material proteico del hospedador, que por su carácter antigénico propio, interfiera en las reacciones inmunológicas, siendo un motivo de inespecificidades, tanto al tratar de demostrar anticuerpos específicos en el suero de presuntos enfermos (hombre o animales), como, y principalmente, cuando se intentan obtener experimentalmente inmunisueros muy potentes, para hacer con ellos análisis antigénicos. La importancia de la pureza de las larvas en este último caso, así como en la preparación

de inmunisueros para revelar precozmente antígenos de Triquina, en sangre, heces, y orina, es extraordinaria. De otra forma, obtendríamos, al hacer análisis antigénicos, espectros antigénicos mixtos, formados por antígenos del parásito y del hospedador, por consiguiente, falsos espectros y para el uso de investigación precoz de antígenos en enfermos, las interreacciones entre antígenos del hospedador y los anticuerpos por ellos estimulados en el animal donde se prepara el inmunisuero patrón, falsearían los resultados.

El presente trabajo se refiere a una técnica ideada por nosotros, que a pesar de su sencillez, permite obtener larvas de Triquina prácticamente puras. El método clásico, con modificaciones diversas, para la obtención de larvas aisladas de Triquina a partir de los músculos de animales de laboratorio infectados (ratas, ratones, conejos, etc.) es el de Bearman. La carne, finamente picada, se dispone en un embudo que lleva una placa de porcelana con múltiples orificios, sobre la que descansan varias capas de gasa o muselina. El embudo comunica por medio de un tubo de goma con un tubo de centrífuga cónico, comunicación que puede interrumpirse constriñendo el tubo mediante unas pinzas de tornillo. El dispositivo, en posición vertical, se llena con un jugo gástrico artificial y se incuba a 37°C hasta digestión de la carne. Las larvas libres se mueven a través del líquido hasta el fondo del tubo, donde se acumulan junto con detritus de la digestión. Al final del proceso, se separa el tubo de centrífuga y por sucesivos lavados y sedimentaciones, van liberándose las larvas de restos digestivos hasta que están limpias. Puesto que hay detritus de peso específico similar a las larvas, a pesar de que estas van al fondo, no sólo por su peso, sino por sus movimientos activos, es difícil conseguir larvas totalmente puras.

Nosotros pensamos si sería posible disponer en el tubo de centrífuga una solución más viscosa que el jugo gástrico, que frenase la sedimentación de detritus inertes y no entorpeciera la sedimentación de las larvas, proceso, en el que como hemos dicho, no sólo intervienen el peso específico de las larvas, sino sus activos movimientos hacia el fondo. Tras numerosos ensayos encontramos, que una solución de carboxi-metil-celulosa (CMC) al 4 % y de D 1'023 g/ml (t.ª = 20° C), prácticamente permitiría sedimentar todas las larvas y retenía todos los detritus digestivos. Repitiendo

en este medio el proceso de sedimentación y decantación, hemos logrado preparados completamente puros de larvas.

Describimos a continuación la técnica completa del método puesto a punto por nosotros, en el que se ha seguido el procedimiento de SULZER (1965), para la digestión de la carne triquinosa, una modificación del aparato de Bearman para la sedimentación y finalmente nuestro método de la CMC para la obtención de larvas puras.

DESCRIPCION DE NUESTRA TECNICA

1) *Infestación de ratas.*

La infestación se consigue a partir de ratas de raza Nestle mantenidas en nuestro laboratorio. Adultos jóvenes de 150 g. de peso, se les da a comer carne triquinósica conteniendo de 1.500 a 2.000 larvas por animal, y sacrificando estos animales un mes o mes y medio después de la infestación. Las ratas después de sacrificadas, se desuellan y desviceran, dejando limpio el esqueleto con sus masas musculares, que se trituran en una batidora. La carne triquinósica triturada está en condiciones para ser digerida.

2) *Extracción de las larvas.*

Para extraer las larvas hacemos una digestión de la papilla obtenida anteriormente siguiendo la técnica de SULZER (1965) que consiste en lo siguiente: Por cada 25 g de carne se pone 1 litro de líquido de digestión. Este líquido se prepara añadiendo a 1 litro de agua del grifo 1 g. % de pepsina y 0'5 g. % de ClH. Para hacer el digerido usamos un depósito de polietileno de 10 litros de capacidad. En cada operación se utilizan 200 g. de carne triquinosa triturada y 8 l. de líquido digestivo.

La mezcla se lleva a la estufa a 37°C durante 15-18 horas. El dispositivo va provisto de un tubo de goma conectado a una bomba de aire, con objeto de airear la mezcla y evitar malos olores.

Cuando termina el tiempo de digestión, se saca el depósito de la estufa y se deja 1 hora a temperatura ambiente, a fin de que las larvas sedimenten en el fondo. A continuación se sifona todo el contenido, a excepción de 1.250 ml.

3) *concentración y purificación.*

Para la concentración y purificación de las larvas seguimos la técnica de BOZICEVICH et col. (1951), modificada por nosotros. El dispositivo consta de un soporte con aro en el que se coloca un embudo de adecuada capacidad. En el pico del embudo se adapta un trozo de tubo de goma corto, que por el extremo inferior va también adaptado a un tubo de centrífuga graduado. En el tubo de goma, se adapta una pinza para obturarlo cuando termine la digestión. Dentro del embudo ponemos un doble aro que soporta una malla de tul con espacios circulares de 0'5 mm. de diámetro y sobre esta se dispone 5-6 capas de gasa de 21 hilos × cm^2.

En el tubo de la centrífuga se pone 10 ml. de una solución de CMC al 4 %. Esta se prepara disolviendo 4 g. de CMC en 100 ml. de suero salino y centrifugado después a 3.000 r.p.m. durante 2 horas, con el fin de eliminar restos celulósicos no solubles del CMC. Se decanta el supernadante, con cuidado para no arrastrar impurezas del sedimento, siendo este supernadante el que utilizamos en nuestro dispositivo.

Una vez adaptado el tubo de centrífuga que lleva la solución de CMC al tubo de goma del dispositivo, se vierte lentamente por el embudo, y a través de las capas de gasa y del tul, una pequeña porción del digerido, de forma que este líquido quede superpuesto (sin mezclarse) a la solución de CMC. Después se sigue vertiendo líquido hasta llenar por completo el sistema; esto es, hasta que el líquido queda a unos 4 cm. del borde superior de la gasa. Cuando tratamos de obtener de una vez gran cantidad de larvas, operamos con un dispositivo que admita los 1.250 ml. de digerido enriquecido en larvas, resultante de los 8 litros de digerido total. En caso contrario podemos operar con sistemas de volumen más reducido, por ejemplo 250 ml, como veremos, utilizados en nuestras experiencias.

Pasado este tiempo, el sedimento obtenido se resuspende en 5-10 ml. de suero salino. Se superpone sobre 10 ml. de CMC al 4% contenido en otro tubo de centrífuga y se deja sedimentar hasta que todas las larvas estén en el fondo del tubo; se decanta el sobrenadante, y con el sedimento de larvas, se repite la misma manipulación. Después, se lavan las larvas, tres o cuatro veces en suero salino para eliminar el CMC, usando el mismo proceder de suspen-

sión, sedimentación y decantación cada vez que se cambie el suero salino.

RESULTADOS

Describimos a continuación los protocolos de las experiencias que nos permitieron comprobar el valor de las soluciones de CMC para purificar larvas, y su concentración óptima.

Se hicieron cuatro soluciones de CMC al 1, 2, 4 y 6 g × 100, colocándose una cantidad de 10 ml. en sus correspondientes tubos de centrífuga. Cada tubo se adaptó a un dispositivo tipo Bearman para sedimentación de larvas, y después cada dispositivo se cargó con 250 ml. de un mismo digerido de carne triquinosa de rata, previa homogenización. El digerido se había hecho por la técnica de SULZER (1965), anteriormente descrita, dejándolo reposar una hora, sifonando el líquido de las capas superiores y recogiendo los 1.250 ml. del fondo, donde se acumulan las larvas.

Después de 2 horas de sedimentación en estufa a 37°C, se desconectaron de los dispositivos los tubos de centrífuga.

En cada tubo se sifonó con cuidado el líquido supernadante menos 1 ml. del fondo. De esta forma el sedimento larvario quedaba a suficiente distancia de la superficie del líquido remanente (1 ml) evitando su remoción y el arrastre de larvas por el sifonado.

El líquido sifonado se recoge en un tubo de centrífuga y se centrifuga 15 minutos para sedimentación de las larvas que pudiera contener. El sedimento de este tubo se resuspendía en 1 ml. de suero salino, se homogeneizaba y se hacía recuento de larvas, determinándose el número total de larvas del líquido remanente (1 ml). Un volumen de este líquido (0'1 ml.) se diluía en 5 ó 10 ml. de suero salino, (según que la concentración de larvas exigiera una menor o mayor dilución para ser contadas con facilidad) y se hacía recuento larvario, determinándose el número total de larvas del sedimento. La suma total de larvas del sobrenadante y del sedimento se tomaba como el 100 %, para establecer el porcentaje relativo de larvas en el sedimento y en el supernadante. Por otra parte se observaba al microscopio entre cubre y porta, una pequeña gota del sedimento homogeneizado y se contaban en 100 campos el número de partículas residuales, o impurezas. Menos de 5 partícu-

las por 20 campos se consideraba como sedimento larvario muy puro (++++), entre 5 y 10 puro (+++), entre 10 y 15 relativamente puro (++), entre 15 y 20 poco puro (+) y más de 20 impuro (—).

En el cuadro I puede apreciarse que las soluciones de CMC que permitieron obtener larvas más puras fueron las de 4 y 6 g. × 100. Si bien, usando esta última, se pierden muchas larvas en el supernadante, razón por la que elegimos como más conveniente la primera. Observamos que no se obtuvo un sedimento de larvas muy puro, sino simplemente puro (+++). Pero téngase en cuenta que el control, usando el procedimiento habitual, da de entrada un sedimento muy sucio, de forma que a veces son tantas las impurezas, que no se pueden recontar. Si el sedimento de larvas en solución de CMC al 4 % se resuspende en suero salino y el líquido se superpone de nuevo sobre una nueva solución de CMC al 4 % en otro tubo, las larvas quedan prácticamente muy puras, y aún más si la maniobra se repite una vez más. En contraste, la técnica clásica de ir lavando las larvas con suero salino, dejándolas sedimentar, decantando el supernadante, volviendo a lavar el sedimento, dejando de nuevo sedimentar, y así sucesivamente, requiere 10 ó 12 lavados y aún a veces quedan impurezas que no se eliminan.

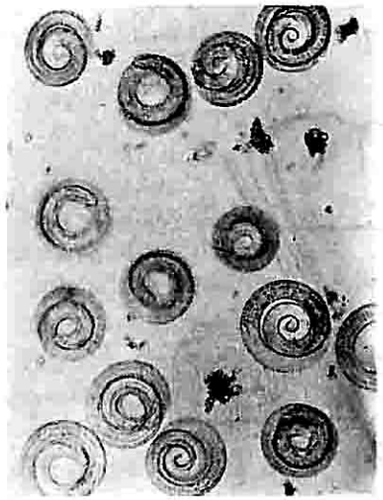
Hemos puesto a punto una técnica de purificación de larvas a partir del líquido de digestión, con lo cual hemos obtenido larvas libres de restos digestivos que para obtención de un antígeno de *T. spiralis* es absolutamente necesario, para eliminar interferencias en las pruebas de diagnóstico y en la obtención de inmunisueros en conejos.

CUADRO I

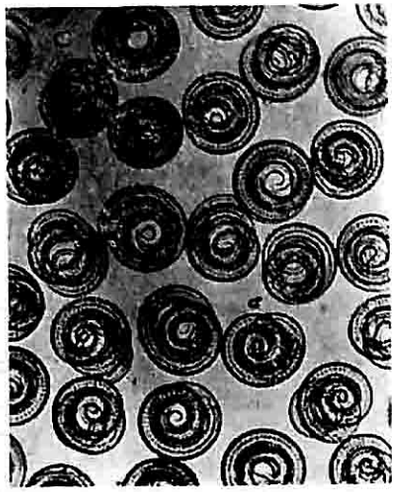
Concentración de CMC g %	1	2	4	6	C
Larvas en el sedimento %	98	96	93	60	98
Larvas en el supernadante %	2	4	7	40	2
Grado de pureza	±	+	+++	+++	—

En la lámina I puede observarse el sedimento correspondiente a un digerido de carne sin purificación previa y con purificación a través de la solución de CMC.

Lámina I



1



2

3

Microfotografías de larvas de *Trichinella spiralis*, obtenidas por el procedimiento clásico —modificación de Bearman— y por la técnica propuesta.

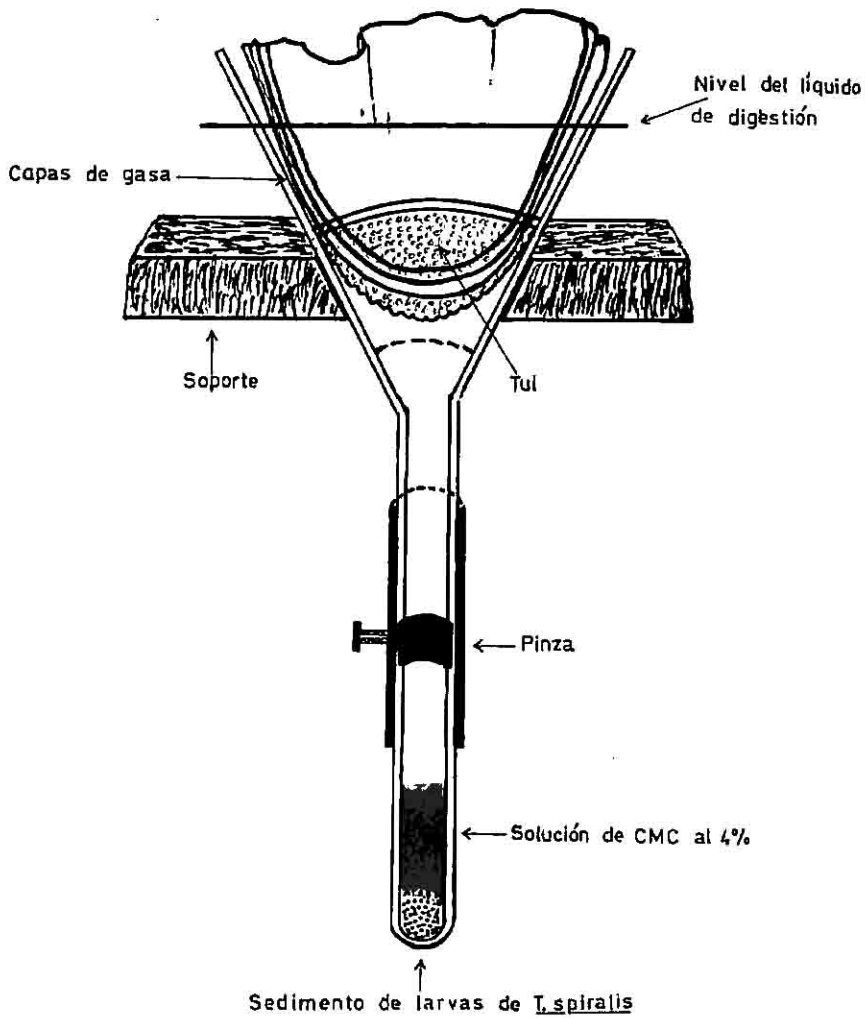
1 — Sedimento de larvas sin lavar, directamente tomado del fondo del tubo de centrífuga, después de la digestión y sedimentación por el método clásico. Obsérvese la abundancia de restos digestivos.

2.— Sedimento de larvas sin lavar, directamente tomado del fondo del tubo de centrífuga, por la técnica que proponemos. Apenas se aprecia algún pequeño resto digestivo.

3.— El mismo sedimento de la microfotografía 2, se sometió de nuevo al proceso de sedimentación en CMC al 4%. Se ve que las larvas quedan prácticamente libres de restos digestivos. Repitiendo una ó dos veces más la sedimentación en CMC y lavando después las larvas con suero salino para eliminar esta sustancia, se obtienen embriones totalmente libres de impurezas antigénicas procedentes del hospedador.

En la lámina II mostramos un esquema del dispositivo modificado por nosotros.

Lamina II



CONCLUSIONES

El uso de soluciones de CMC al 4 % desprovistas de residuos celulósicos insolubles por centrifugación, permite, cuando se usa en la técnica de Bearman modificada, obtener un concentrado casi puro de larvas de Triquina. Este concentrado puede ser de nuevo limpiado de residuos digestivos, obteniéndose larvas exentas de residuos antigénicos del hospedador.

RESUMEN

Se describe una técnica rápida para la obtención de larvas de triquina, exentas de residuos digestivos y materiales antigénicos del hospedador. En síntesis consiste en una modificación del dispositivo de Bearman, y la recogida de las larvas que sedimentan sobre una solución de carboxi-metilcelulosa al 4 %. La CMC no impide el descenso hasta el fondo del dispositivo de las larvas móviles, mientras que detiene o relentiza la sedimentación de residuos digestivos, con lo que aquellas se recogen en estado puro.

La técnica, muy sencilla, permite obtener larvas exentas de contaminación por antígenos del hospedador, por lo que es especialmente recomendable para la obtención de inmunoreactivos muy puros destinados a análisis antigénico.

REFERENCIAS

1.—Sulzer, A. J. 1965.—Indirect Fluorescent antibody test for parasitic diseases. Preparation of a stable antigen from larvae of Trichinella spiralis. *J. Parasitol.* vol. 51: 717-721.

2.—Bozicevich, J. and col. 1965.—A rapid fluocculation test for the diagnosis of trichinosis. *Pub. Hlth. Rept.* 66: 806-814.