

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE QUIMICA**



---

---

**COMPARACION DE DOS METODOS DE EXTRACCION  
ANTIGENICA DE Ascaris lumbricoides suum MEDIANTE  
PRUEBAS SEROLOGICAS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A:  
**ROBERTO RAZO VASQUEZ**

**MEXICO, D. F.**

**1982**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## I N D I C E

	PAGINA
INTRODUCCION	1
Antecedentes Historicos	2
Caracteristicas Generales de los Hemátodos	6
<u>Acaris lumbricoides</u>	9
Morfología	10
Ciclo Biológico	11
Epidemiología	11
Control Epidemiológico	12
Patogenia	12
OBJETIVOS	13
PARTE EXPERIMENTAL	14
RESULTADOS	23
DISCUSION DE LOS RESULTADOS	44
CONCLUSIONES	46
APENDICE I	47
APENDICE II	53
BIBLIOGRAFIA	73

## I N T R O D U C C I O N

Ascaris lumbricoides es un parásito de gran importancia en la República Mexicana, tanto desde el punto de vista médico como económico. De acuerdo a los últimos datos reportados ( 1 ) se desprende que aproximadamente el 26 % de los mexicanos padecen ascariasis; de este porcentaje los casos más importantes son aquellos con parasitosis masiva y en consecuencia con sintomatología característica, ya que en ocasiones representan problemas de diagnóstico en las diferentes etapas de migración y localización del parásito, por lo que es necesario contar con métodos de diagnóstico adecuados para poder de manifiesto la presencia de este nemátodo en los tejidos del huésped (1,2,3) .

En la actualidad y gracias al empleo de métodos inmunológicos y diferenciación taxonómica sabemos que Ascaris lumbricoides spp., considerado hasta hace poco como parásito exclusivo del cerdo, también se encuentra en el hombre, produciendo las mismas alteraciones que Ascaris lumbricoides lumbricoides, por lo cual el estudio inmunológico y en especial de diagnóstico, representa un campo interesante (2,7) .

Se ha inferido que esta parasitosis es más frecuente en los niños que en los adultos, esto es ocasionado fundamentalmente por los hábitos de juego a nivel del suelo, así como por los hábitos higiénicos deficientes, se ha desglosado el porcentaje por edades pediátricas, predominando esta parasitosis en los preescolares con un porcentaje de 42.7, reduciéndose en los escolares al 41 por ciento y disminuye en los lactantes al 19 por ciento ( 4 ) .

Así pues sabemos que la ascariasis ocupa un lugar importante como problema de salud pública, ya que concomitantemente al malestar físico, determina erogación económica en el renglón médico asistencial, incapacidad física, con repercusión en los aspectos —

educacional y laboral, acentuación de la desnutrición y causa eventual de cuadros suboclusivos u oclusivos intestinales o de perforación de estos órganos (3,4,5,10) .

#### ANTECEDENTES HISTORICOS .

En 1960 Taffe L.P. ( 7 ) desarrolló una técnica para comprobar la actividad de los antígenos de larvas de tercer estadio de Ascaris lumbricoides sum "in vitro" .En sus investigaciones logró obtener - primeramente las larvas por infestación con huevos y posteriormente por el método de Baerman las aisló obteniendo precipitados ,tanto - cuticular ,como de excreciones anales, posteriormente inoculó los - extractos en cobayos y encontró que se producía un cierto grado de inmunidad a la enfermedad .

Guerrero y Silverman en 1969 investigaron la actividad inmunológica en el ratón de los antígenos somáticos y metabólicos derivados del segundo y tercer estadio de larvas de Ascaris lumbricoides sum . Los resultados demostraron que esos antígenos metabólicos recolectados de las larvas del tercer estadio de Ascaris lumbricoides sum " in vitro " eran capaces de inducir resistencia a la infección ( 8 ) .

En 1969 Jung,H.J. y colaboradores ( 9 ) realizaron pruebas de hemaglutinación para detectar la antigenicidad de algunas fracciones de Ascaris lumbricoides .En estas pruebas determinaron la capacidad que tenían ciertas fracciones antigénicas para inhibir la actividad de un suero hiperinmune en la prueba de hemaglutinación .Obtuvieron los antígenos por tres métodos diferentes ,partiendo de larvas de tercer estadio ; uno extraído con etanol, otro por digestión con - papaína y el otro por precipitación con sulfato de amonio .

En 1971 Adrienne,R.Thompson (11) aisló un antígeno (hemoproteína) del fluido del cuerpo de Ascaris lumbricoides sum ,purificándolo por filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico .Este antígeno combinado con suero inmune causó degranulación de eosinófilos "in vitro"

Un hecho notable en las infecciones por helmintos es la frecuencia con que se presenten anticuerpos anafilácticos (IgE) contra los parásitos

Las infestaciones con Ascaris lumbricoides en los niños se asocia con ataques de urticaria, erupción maculopapular y otras manifestaciones alérgicas ; y se ha encontrado que los niños infestados con estos gusanos tienen un nivel de inmunoglobulinas IgE más alto en su suero que los niños que no estén infestados con ellos .Es común en todas las infestaciones por helmintos ,encontrar eosinofilia en la sangre periférica.En algunas ocasiones ,la migración de las larvas de los helmintos a través de los pulmones se asocia con neumonía que puede ser fatal .En vista de la asociación de los leucocitos eosinófilos con la liberación de histamina y el conocimiento de que los anticuerpos IgE son causas potente de liberación de histamina,es posible que este padecimiento sea el resultado de una reacción anafiláctica crónica en los pulmones ( 35 ) .

Las propiedades biológicas del extracto crudo del Ascaris son derivadas del fluido celómico o de todo el cuerpo del parásito . Es obvio que el extracto crudo sea una mezcla muy heterogenea y compleja de componentes con un espectro muy amplio de propiedades fisicoquímicas .Esto es demostrado en conejos inmunizados con extracto crudo en adyuvante completo de Freund,y sangrando a los conejos posteriormente para obtener suero hiperinmune ,el cual al ponerse en contacto con el antígeno en una inmunoelectroferesis se notó que ocupaba todo el espectro de movilidad electroforética .Con esto se demuestra la presencia de una gran cantidad de componentes antigénicos .

Los componentes proteínicos del extracto crudo de Ascaris fué

precipitado con sulfato de amonio al 50 % de saturación .Dichos componentes fueron globulinas y albuminas ,asi como una tercera porción constituida por un filtrado libre de proteínas .

Al llevarse a cabo pruebas de sensibilidad con dichas sustancias ,se notó que la globulina no presentó reacción ,pero en cambio la albúmina y el filtrado libre de proteínas conjuntamente sí producen reacción .

Sprent (1950) durante sus pruebas para obtener alérgenos , utilizando una gran cantidad de preparados de Ascaris lumbricoides en forma de extracto crudo logró inducir shock anafiláctico .

Abler et al (1972) obtuvo un alérgeno con un peso molecular de 20,000 al preparar una mezcla de 38-52 fracciones (del extracto) que fueron concentradas y aplicadas en una columna de sefadex G-75 .

Después de aislar y purificar el extracto de ascaris con gel poliacrilamida,electroforesis, inmunoelectroforesis ,asi como en ultracentrifuga, se demostró que dicho extracto contenía 8.5 % de azúcares reductores, los cuales fueron determinados por el método de orcinol y catalogados como glucoproteínas cargadas negativamente . El peso molecular del componente antigénico fue calculado en una columna de sefadex G-100

Hussain et al (1972) al reafirmar la purificación de un alérgeno de un extracto crudo de Ascaris lumbricoides suum encontró un grupo alérgico formado por proteínas y carbohidratos con un peso molecular entre 10,000 y 50,000 y con la característica de presentar carga negativa en un campo electroforético ,asimismo se comprobó que dicha fracción era la mejor para inducir la formación de anticuerpos .

De acuerdo al peso molecular que se determino se concluye que el alergeno de *Ascaris* está formado por dos subunidades de pesos moleculares similares ,unidos por enlaces no covalentes . Otra - situación alternativa puede ser aquella en que el alergeno puede estar formado por una simple subunidad cuyo peso molecular es de 8,400 y de una serie de cadenas cortas de peptidos ,los cuales bajo la influencia del sistema de electroforesis se disocia y migra en el gel .

Sprague-Dawley inmunizaron ratas con el alergeno de *Ascaris* y *B pertussis* y detectaron posteriormente en el suero anticuerpos con un título de 1:5 a 1:240 ,lo cual dependia de la cantidad del alergeno inyectado ,pero una pequeña cantidad de 10<sup>-7</sup>g del alergeno fué suficiente para provocar una buena respuesta .

El alergeno aislado por Ambler et al del extracto crudo de *Ascaris* fué purificado en una combinación de filtración en sephadax y cromatografía de intercambio iónico .

Al comparar las propiedades fisicoquímicas de dos alergenos extraídos del extracto crudo de *Ascaris* y purificados por diferentes técnicas ,se puede comprobar que tenían una gran similitud ya que se les encontro un punto isoelectrico de 5.0 - 5.2 y un coeficiente de sedimentación de 1.855 .

Bradbury et al (1974 ) determinaron que la administración oral de 25,000 huevos embrionados de *Ascaris lumbricoides suum* dan - como resultado la aparición de anticuerpos en el suero de ratas - despues de haber 16-20 días de la administración ,con un título de anticuerpos de 1:4000 .(35) .

Yoshiya Sato en 1975 desarrolló una técnica de anticuerpos in munoadsorbentes ,principalmente con la idea de poder aislar y purificar algunos antígenos específicos con alto poder de antigenicidad al mismo tiempo ,una vez ya obtenidos dichos antígenos fueron inocu lados a conejos y cuyos, lo cual les permitió detectar posteriormente la infección por hemaglutinación indirecta (12,29,30) .

Ziprin y col. en 1975 (13) realizaron pruebas para demostrar la presencia de ciertas sustancias antigénicas en el exudado de larvas juveniles de Ascaris lumbricoides suum ,el cual fué aplicado a ratones por via intraperitoneal,notandose en algunos casos la presencia de reacciones leves .

#### CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS NEMATODOS .

Los nemátodos son gusanos cilíndricos ,de cuerpo no segmentado con extremidades afiladas ,de color que va del blanco amarillento al rojizo,sexos separados (dioicos ),la hembra es más grande que el macho el cual tiene la extremidad posterior enrollada hacia la porción ventral .Sus dimensiones varían de unos cuantos milímetros hasta sobrepasar el metro , pueden ser muy finos ( como las filarias ) o tan gruesos como Ascaris lumbricoides.

Están cubiertos de una capa quitinosa,estriada en sentido circular . En algunos casos la capa cuticular presente prolongaciones laterales de corte triangular,que recorren parcialmente o totalmente el cuerpo del nemátodo,como se observa en Enterobius vermicularis (6) .

La organización del cuerpo de los nemátodos,tienen bien definidas las siguientes estructuras .

La cutícula,que juega un papel importante en su fisiología,es una estructura compleja que varía de un género a otro ,asi como del estadio larval al adulto.La mayoría de los trabajos acerca de la -

cutícula de los nemátodos se ha realizado en Ascaris lumbricoides, en el que se han descrito tres regiones principales que son : la superficial, la de la corteza y la media , la primera está cubierta por una capa delgada menor a 1000 Å de espesor y compuesta de lípidos .

De estas tres regiones la más importante es la corteza la cual se divide en capas , su composición de aminoácidos indica que está formada por queratina , aun cuando los estudios por difracción de rayos X indican la presencia de colágeno .

La región media de la cutícula de Ascaris lumbricoides , llamada capa matriz , se divide en otra capa que contiene distintos poros - acanalados que se extienden en la capa cortical externa, esos poros acanalados son huecos y están normalmente llenos por una sustancia rica en aminoácidos .

Varias investigaciones indican que la cutícula es metabólicamente activa y no una cubierta inerte ( 16,17 ) . Debido a la gran cantidad de enzimas que contiene, las que probablemente se originan en la hipodermis y toman parte en el crecimiento de la cutícula de Ascaris lumbricoides .

En los nemátodos adultos se encuentran las tres regiones , mientras que en los nemátodos jóvenes la capa fibrosa está reducida o ausente .

Una característica que se ha notado con respecto a la integridad de la cutícula de Ascaris lumbricoides en estado larval es que es atacada por la papaína ( 18 ) .

La hipodermis descansa debajo de la cutícula sobresaliendo dentro de la cavidad del cuerpo , a lo largo de la media dorsal, media ventral y las líneas laterales , para formar cuatro cordones . Los cordones laterales hipodérmicos son los más grandes y contienen los canales excretorios ( cuando éstos se presentan ) .

La hipodermis contiene gran cantidad de material de reserva (grasa, glucógeno) y en algunos nemátodos hemoglobina.

El sistema nervioso consta de un anillo circunferencial, que une ganglios, nervios ventrales y dorsales, los cuales corren posteriormente del anillo nervioso a lo largo de los cordones; también consta de varios nervios que se extienden hasta la porción anterior donde las estructuras de la cápsula bucal son inervadas. El sistema nervioso simpático faríngeo consta de tres nervios, los cuales corren a lo largo de la faringe y están unidos uno al otro por unas cuantas comisuras.

Los músculos de las paredes del cuerpo de los nemátodos son únicos y están divididos en contráctiles y no contráctiles. La porción contráctil de la célula es de soportes o sostén entre los que se encuentran las microfibrillas. La parte no contráctil de la célula contiene núcleo, mitocondrias, glucógeno y grasa. La inervación de la parte no contráctil de la célula pasa del músculo al nervio longitudinal e al anillo nervioso. Los músculos están sujetos a la cutícula por fibras, las cuales corren de la parte contráctil de la célula a la membrana basal.

El pseudoceloma es una estructura importante, ya que forma el esqueleto hidrostático del nemátodo. Los elementos provenientes del intestino como iones y oxígeno del medio ambiente deben cruzar el pseudoceloma para alcanzar las glándulas y la pared del cuerpo. El fluido pseudocelómico actúa como transporte de bacterias a la cavidad del cuerpo, estas bacterias no son fagocitadas.

El sistema alimentario consta de cápsula bucal que está rodeada por los labios, y es una cavidad de forma variable; consta de faringe muscular y glandular, intestino, recto y ano.

El sistema excretor de los nemátodos es muy variable y es -

algunos grupos parece estar completamente ausente ,este sistema es de dos tipos;glandular y tubular.

El sistema glandular se encuentra en varios nemátodos y consiste de una célula ventral glandular situada en la región de la base de la faringe ,usualmente tiene una ápula terminal, que se abre al exterior de la superficie ventral por medio de un poro .

El sistema tubular puede ser simple en forma de "H" como en - Enterobius vermicularis ,en el cual un canal lateral corre a lo largo del nemátodo,como en el Ascaris lumbricoides y otros nemátodos en los cuales en los cuales la forma de "H" se ha modificado en un sistema de U invertida.Algunos nemátodos poseen los dos canales laterales y una glandula ventral .

En cuanto a sistema reproductor ,los sexos están separados , la hembra es siempre más grande que el macho, los machos tienen uno o dos testículos,los cuales se abren a una vejiga seminal ,estas estructuras pueden ser divididas en una parte glandular y otra eyaculadora .

Muchos nemátodos machos poseen espículas copulatorias que se localizan bolsas formadas en la cloaca ,estas bolsas se forman al dilatarse la porción localizada al rededor de la cloaca.Las espículas constan de cutícula esclerotizada y en algunos casos (Ascaris lumbricoides) tiene un nervio que corre hacia un órgano sensible al tacto .

El esperma del nemátodo es de tipo amebocida,la hembra tiene uno o dos ovarios,que se abren en los oviductos y el útero ,al final del cual se almacena el esperma (17,19) .

#### Ascaris lumbricoides .

A este nemátodo se le conoce vulgarmente como "lombriz intestinal " , era ya conocido desde hace muchos siglos puesto que se le menciona en el Papiro de Ebers 1550 A.C. A mediados del siglo XIX fué estudiado con precisión por Mosler ,Leuckart,Lutz y los hermanos Koinos .

## MORFOLOGIA .

Es un nemátodo alargado, cilíndrico y termina en punta roma en la porción anterior y más delgado en la porción posterior. Se le observan dos líneas laterales blanquecinas que recorren longitudinalmente todo el cuerpo que va del color blanco amarillento al rojizo. La porción bucal está provista de tres labios diferenciados , uno de los cuales es amplio y se localiza en la porción ventral media , los dos restantes se encuentran en posición ventrolateral , todos ellos están finamente denticulados .

Cada labio tiene en sus márgenes laterales papilas gumeas pequeñas que forman una pequeña cavidad bucal de forma triangular.

De los nemátodos parásitos intestinales del hombre, Ascaris lumbricoides es el de mayor tamaño . Los machos miden de 15 a 31 cm de longitud por 2 a 4 mm de diámetro y la hembra de 20 a 35 cm de longitud por 3 a 6 mm de diámetro.

Los órganos genitales del macho consisten en un tubo largamente enrollado por los testículos , el vaso deferente y el conducto eyaculador , este tubo está enrollado irregularmente en la mitad posterior del gusano y se abre en la cloaca , que es subterminal . El aparato genital femenino en general corresponde a la descripción de los nemátodos . La vulva de la hembra tiene localización medioventral, cerca de la unión de los tercios anterior y medio del cuerpo. Existe una vagina cónica que se bifurca para formar un par de tubos genitales, cada uno de los cuales consta de útero , receptáculo seminal, oviductos y ovario. Estos tubos están enrollados en los tercios medio y posterior del gusano, en longitud es varias veces la longitud total del gusano , pueden contener en un momento dado hasta 27 millones de huevos , y se ha estimado que la producción diaria por hembra es de 200,000 huevos aproximadamente . Los huevos fertilizados son anchos y

ovoides, con una cápsula gruesa y transparente, constituida por una membrana vitelina interna relativamente impermeable y de naturaleza lipídica. Los huevos fecundados miden de 45 a 75 micras de longitud por 30 a 50 micras de ancho y presentan un espacio en forma de media luna situado en cada polo, entre el contenido y la cubierta.

#### CICLO BIOLÓGICO.

Los huevos fecundados salen del intestino junto con la materia fecal y necesitan pasar de 3 a 4 semanas en el suelo, para larvarse y volverse infectantes, pudiendo conservar su viabilidad por varios meses en suelos sombreados y húmedos. Estos huevos cuya larva ha alcanzado su segundo estadio, al ser ingeridos por el hombre eclosionan en la parte proximal del intestino delgado, las larvas atraviesan la pared intestinal y caen a vasos mesentéricos y por vía porta pasan al hígado donde permanecen aproximadamente tres días, aumenta de tamaño (tercer estadio), y alcanzan los vasos pulmonares, donde nuevamente crecen, mudan a larvas de cuarto estadio, atraviesan la membrana alveolar y llegan a bronquios, tráqueas y laringe, pasan a faringe, esófago, estómago y llegan al intestino donde se convierten en larvas de quinto estadio y se desarrollan hasta alcanzar la madurez sexual, lo cual ocurre unos 52 días después de la infección, apareciendo huevos en las materias fecales unos días más tarde (20).

#### EPIDEMIOLOGÍA .

Es un parásito cosmopolita, más frecuente en las regiones tropicales. Stoll en 1947, calculó que existían 644 millones de individuos parasitados por este nemátodo (19) .

En México es muy frecuente. Se calcula que la tercera parte de la población general padece esta parasitosis, aún cuando se estima que sólo el 6 % de la misma sufre escheriasis masiva, su incidencia es mayor en las regiones cálidas y húmedas del país y virtualmente no existen en las

zonas áridas .De las autopsias realizadas en la Ciudad de México ,del 47 % de los casos de ascariasis sólo poseían un parásito (4,5) .

#### RESERVORIO.

Hasta hace poco tiempo se consideraba que el hombre era el único reservorio de esta parasitosis .En la actualidad se cree que el cerdo puede desempeñar esta función ,ya que quizá sea tan importante o más que la infestación humana por Ascaris lumbricoides suum que por Ascaris lumbricoides lumbricoides .

#### CONTROL EPIDEMIOLOGICO .

Debe insistirse en la educación higienica,tanto individual como en comunidad ,asi como procurar la eliminación adecuada de excretas , con objeto de evitar el fecalismo al aire libre .

#### PATOGENIA .

En el periodo larvario,cuando se presente una infección masiva,el paso de las larvas,durante su migración por pulmones origina infiltrados que se manifiestan por tos,estertores e insuficiencia respiratoria que se acompaña de febrícula y leucocitosis ,con eosinofilia elevada: dicho cuadro clínico se le conoce como síndrome de Loeffler y es de corta evolución ( 28 ) . En el periodo Intestinal la infestación pasa inadvertida cuando es poco intensa,pero cuando es masiva puede causar dolor abdominal,meteorismo y vómitos ,en ocasiones los pacientes especialmente niños pueden padecer obstrucción o subobstrucción intestinal, invaginación,perforación ,apendicitis ,diverticulosis ,absceso hepático, pancreatitis ,ictericia obstructiva y otras menos frecuentes como son resapertura del conducto enteroesentérico con salida del parásito por el cabligo ,migración a oído medio ,absceso pulmonar ,obstrucción laríngea y pericarditis por migración errática .

## O B J E T I V O S

Pensando en la forma de detectar más fácilmente la ascariasis extraintestinal y debido a que otras técnicas ya existentes no proporcionan resultados que nos ayuden a dar un diagnóstico más acertado, se juzgó conveniente realizar un estudio con el fin de buscar una metodología que permita detectar fácilmente en el hombre la ascariasis en su fase de migración extraintestinal, empleando para ello antígenos que proporcionen una reacción más específica y de fácil interpretación en las diferentes pruebas serológicas, que normalmente se utilizan .

Determinar que método de extracción es el más adecuado para la obtención de un antígeno, específico, fácil de manejar en el diagnóstico de la ascariasis, así como su estabilidad .

Detectar la existencia de una respuesta celular mediante la intradermoreacción .

## PARTE EXPERIMENTAL

### OBTENCION DE ANTIGENO (SACAROSA -ACETONA)

Este método consiste en preparar un homogenizado del parásito , con lo cual se separan más fácilmente las proteínas de otras sustancias que puedan interferir con ellas .

Los gusanos colectados ,se mantienen en solución salina 0.85 % durante 24 horas .Se lavan con solución salina esteril y solución de hidróxido de sodio 1 mol/litro repitiendo el lavado tres veces más con la misma solución .

- Fijar los adultos de Ascaris lumbricoides sumu con alfileres en una tabla de fibracel forrada con aluminio para facilitar la disección .
- Con un bisturí hacer un corte longitudinal y extraer tanto el aparato digestivo como el aparato reproductor .Separar cuidadosamente el sistema muscular ,el cual deberá salir íntegro,quedando únicamente la cutícula .
- Secar por liofilización los adultos completos, así como la cutícula y músculo que se extrajeron, y se muelen hasta obtener un polvo fino .
- Pesar 1 g de polvo y colocarlo en un homogenizador y agregar 4 ml de solución de sacarosa 0.24 mol/litro .
- Homogenizar durante dos o tres minutos en baño helado .
- Aspirar el homogenizado con jeringa de 50 ml y aguja de 10 ó 15 cm de largo del # 18 ó 16 .
- Depositar lentamente el homogenizado en el fondo de un frasco con tapón esmerilado conteniendo 800 ml de acetona a  $-20^{\circ}$  C .
- Tapar y agitar vigorosamente .
- Dejar reposar durante 15 minutos en baño helado .
- Aspirar el sobrenadante de acetona y agregar nuevamente acetona limpia y fría en igual cantidad al volumen inicial .
- Dejar reposar en baño helado durante una hora .

- Decantar la acetona y resuspender el sedimento en 200 ml de acetona fría y limpia .
- Decantar la acetona , los residuos de la misma se eliminan de la misma forma mediante vacío,debiendo quedar en el fondo un polvo fino .
- Resuspender el polvo en solución amortiguada de fosfatos a pH 7.2 0.2 ml/litros estéril en una proporción de 40 ml de la solución por cada gramo de material del parásito .
- Colocar la suspensión en baño helado con agitación constante .
- Dejar en el cuarto frío durante 18 horas .
- Centrifugar a 1800 rpm en centrifuga refrigerada a 0° C durante una hora .
- Distribuir el sobrenadante en alícuotas de 1 ml en frascos de 2 ml y liofilizar .

El antígeno así obtenido se etiqueta de la siguiente manera:

Als-cut-3a .(Antígeno de Ascaris lumbricoides suum ,cuticular , - sacarosa -acetona ) .

Als-mus-3a .(Antígeno de Ascaris lumbricoides suum ,muscular , - sacarosa -acetona ) .

Als-tot-3a .(Antígeno de Ascaris lumbricoides suum , total , - sacarosa - acetona ) .

PREPARACION DE ANTIGENO de Ascaris lumbricoides suum EXTRAIDO CON ACETONA . (Malcher 1943 ) (31) .

Este método se basa fundamentalmente en la obtención de un triturado de las partes del parásito (cutícula,musculo y parásito completo) con el cual ,se obtiene un homogenizado rico en proteínas,carbohidratos y lípidos con interferencia entre ellos mismos al interactuar con el huésped .

- Pesar un gramo de cada una de las partes que se obtuvieron del parásito (cutícula,musculo ,parásito completo).

- Adicionar 50 ml de acetona .
- Homogenizar por agitación rápida durante 5 minutos .
- Decantar .
- Repetir la agitación y decantación durante tres veces más .
- Secar al vacío hasta eliminación completa de la acetona .
- Suspender el polvo en una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 mol/litre a pH 7.2 estéril y fría , en una proporción de 4 ml por cada 0.1 g del parásito .
- Centrifugar el homogenizado a 1500 rpm durante 10 minutos .
- Aspirar el sobrenadante con una aguja de 10 ó 15 cm de largo del No 18 ó 16 .
- Envasar en frascos de 4 ml con un volumen de 2 ml del antígeno .
- Rotular de la siguiente manera .

Ala-out-a. (Antígeno de Apoaris lumbricoides sum, cuticular, acetona).

Ala-Tot-a. (Antígeno de Apoaris lumbricoides sum, total , acetona ) .

Ala-Mus-a. (Antígeno de Apoaris lumbricoides sum, muscular, acetona ) .

- Conservar en congelación .

#### PREPARACION DE ANTIGENO DE LARVAS DE TERCER ESTADIO .

Una vez obtenidas las larvas , se prepara el antígeno por el método de Sacareso-Acetona (Clark and Casals 1958 ), así como el antígeno extraído con acetona (Melcher 1943 ) .

- Colectar y disecar 20 hembras en la forma ya descrita anteriormente .
- Extraer el tercio final del útero que contiene los huevos fecundados .
- Colocar los úteros en un mortero estéril .
- Macerar , agregando solución salina 0.85 % estéril y formalina al 1 % para lavar .
- Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 24 horas .
- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos .
- Repetir la centrifugación dos o tres veces , utilizando agua destilada

- para el lavado .
- Extraer los huevos del fondo del tubo y colocarlos en cajas de petri grandes, las cuales contienen una solución de 0.1 mol/litro de ácido sulfúrico .
  - Incubar a 37° C durante 26 ó 29 días, destapando las cajas de petri diariamente con objeto de aerear los huevos .
  - Revisar las cajas al microscopio con objeto de observar el desarrollo larval .
  - Una vez que estén en etapa de larvación y decorticación, lavar cuatro veces con agua destilada para quitar los residuos de ácido que puedan quedar .
  - Hacer conteo de los huevos larvados viables, que son los que se utilizarán para la infestación de conejos. (el conteo de los huevos se hace utilizando una cámara de Neubauer ) .
  - Inocular 180,000 huevos larvados por vía oral a conejos de 450 g .
  - Sacrificar 8 días después y extraer hígado y pulmones .
  - Buscar las larvas de tercer estadio .
  - Extraerlas del tejido , por el método de Baerman ( 7 ) .

OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE Ascaris lumbricoides suum .

- Lavar los adultos de Ascaris lumbricoides suum, con solución salina isotónica 0.85 % estéril .
- Liofilizar .
- Triturar en un mortero hasta dejar un polvo fino .
- Agregar solución amortiguadora de fosfatos 0.2 mol/litro a pH 7.2 en proporción de 4 ml por 0.1 gramo del extracto .
- Determinar contenido de proteínas por el método de Lowry (23,24 )
- Determinar contenido de carbohidratos por el método de la antrona (24 ) .

- Estandarizar el antígeno a una concentración de 3 mg de proteína/ml .
- Envasar y rotular .
- Conservar en refrigeración .

#### CARACTERIZACION QUIMICA DE LOS ANTIGENOS .

La caracterización química de los antígenos preparados ,consistió en realizar las siguientes determinaciones :

- 1 ) Cuantificación de proteínas con el método de Folin-Ciocalteu .  
modificado por Lowry y cols .(Apéndice I.1 ) .
- 2 ) Cuantificación de azúcares por el método de la antrona (Apéndice - I.2 ) .

La determinación de proteínas se efectuó con la finalidad de estandarizar la concentración de cada uno de los antígenos utilizados en la inoculación de conejos .

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOGENICA .

##### Inmunidad humoral :

Para demostrar la propiedad de inducir inmunidad humoral por los antígenos preparados ,se inocularon 2 conejos por cada uno de los antígenos de isocaria lumbricoides sumu. Antes de efectuar la inoculación , se ajustaron los antígenos a una concentración aproximada de proteínas de 3 mg/ml y se les agregó adyuvante incompleto de Freund en una proporción de 1:1 ,siguiendo el esquema de la tabla No I

Se usaron 9 conejos de la cepa " Nueva Zelanda " con un peso de 300 g ,y se dividieron en 5 lotes con el fin de sensibilizarlos con los diferentes antígenos que se obtuvieron y estandarizaron :

Lote 1. Constituido de tres conejos .

conejo 1 . Sensibilizado con antígeno cuticular,extraído por el método de sacarosa -acetona .

conejo 2 . Sensibilizado con antígeno muscular,extraído por el método de sacarosa-acetona .

conejo 3 . Sensibilizado con antígeno total, extraído por el método de sacarosa-acetona .

Lote II . Constituido de tres conejos :

conejo 1 . Inoculado con antígeno cuticular, extraído por el método de acetona .

conejo 2 . Inoculado con antígeno muscular , extraído por el método de acetona .

conejo 3 . Inoculado con antígeno total, extraído por el método de acetona .

Lote III . Constituido por un conejo inoculado con antígeno de larvas de tercer estadio del parásito y extraído por el método de sacarosa-acetona .

Lote IV . Constituido por un conejo inoculado con antígeno de larvas de tercer estadio del parásito, extraído por el método de acetona .

Lote V . Constituido por un conejo (testigo) inoculado con extracto de Ascaris lumbricoides sum completo (triturado y homogenizado ) .

CUADRO No I

ESQUEMA DE INMUNIZACION			
VIA	CANTIDAD	INOCULADOS	TIEMPO
Cojinete plenter	0.5 ml	Ag-adyuv. incompleto de Freund	cada 8 días durante un mes .
Intraperitoneal	0.5 ml	Ag-adyuv . incompleto de Freund	cada 8 días durante un mes .
Intramuscular	0.5 ml	Ag-adyuv . incompleto de Freund	cada 8 días durante un mes .
Subcutáneo	0.5 ml	Ag-adyuv . incompleto de Freund	cada 8 días durante un mes .

Para la inmunización de los animales se empleó 1 ml, de antígeno , y 1 ml, de adyuvante incompleto de Freund, la inyección se realizó cada 8 días durante un mes siguiendo el mismo esquema para cada uno de los diferentes antígenos obtenidos .En cada inyección se utilizaron las vías y cantidades del esquema de inyección .

Antes de cada inyección los animales se sangraron por punción - cardíaca para obtener aproximadamente 5 ml de sangre ,se separó el suero y se realizaron las siguientes pruebas inmunológicas:Centrainmunoelectroferesis, inmunodifusión , inmunolectroferesis y titulación de anticuerpos por hemaglutinación indirecta .

Terminada la inmunización, los animales se sangraron a blanco, separándose el suero y se guardó en congelación en alícuotas de 1 y 2 ml, - para ser usado posteriormente .

La centrainmunolectroferesis (apéndice 11.2 ), inmunodifusión - (apéndice 11.1 ) y la inmunolectroferesis (apéndice 11.3 ) así como la hemaglutinación indirecta (apéndice 11.5 ), se realizaron de acuerdo a los esquemas : 2,3,4,5,6,7,8,9 y 10 .

#### **DETERMINACION DE LA COMPOSICION ANTIGENICA,**

Para determinar la composición antigénica , se realizó el estudio inmunolectroforético de los antígenos obtenidos , primeramente , se hizo la separación de los diferentes componentes de los antígenos por electroferesis , para posteriormente efectuar la inmunoprecipitación usando suero de conejo inmunizado individualmente con cada uno de los antígenos de Aecaris lubricoides suum.

Conocido el comportamiento de los diferentes antígenos , en las diversas pruebas , hemaglutinación indirecta, IEF , ID, CIEF (Esquemas 2,3 - 4,5,6,7,8,9,10 ), su reactividad y especificidad de la respuesta inmune de tipo humoral; se procedió posteriormente a detectar la respuesta -

celular, en este caso se sabe que para detectar esta respuesta se usan las pruebas de transformación blastoide, factor de inhibición de la migración de macrófagos y la intradermorreacción.

En la segunda fase de este trabajo se usó únicamente la intradermorreacción, ya que esta prueba nos ofrecía una mayor facilidad en su manejo así como la disponibilidad de contar con los animales de experimentación.

Se probaron todos los antígenos que se obtuvieron, haciéndose la sensibilización en conejos, sometiéndolos al siguiente esquema de sensibilización.

T A B L A No 1

Esquema de sensibilización para prueba de intradermorreacción de cada uno de los antígenos.

Conejos	Inoculado con	Vía	Tiempo
I	Extracto antigénico de	Cejineta	Cada ocho
II			
III	<u>Ascaris lumbricoides</u>	plantar .	días
IV	-		
V	<u>gum</u> más adyuvante	Subcutánea	durante 4
VI			
VII	incompleto de Freund.	Intramuscular	semanas
VIII		Intraperitoneal	
IX	Solución salina isotónica ( testigo )		

Tres semanas después de haber sensibilizado a los conejos se procedió a practicarles intradermorreacción usando para tal efecto la misma concentración aproximada de proteínas del antígeno correspondiente e incluyendo como control solución salina isotónica, de acuerdo al esquema No 2

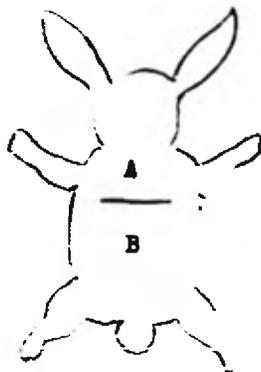
**ESQUEMA No 1 INTRADERMORREACCION**

Conejo	Antígeno	Cantidad	Concentración de proteína g/ 0.1 ml
A	Solución salina isotónica	0.1	Control
B	Antígeno corres pondiente	0.1	3.0

Para poder efectuar lo anterior se procedió a rasurar el dorso de los conejos y se les aplicó 0.1 ml de cada una de las diluciones de antígeno y de control .

La distribución de las intradermorreacciones se presenta en el esquema siguiente .

**DISTRIBUCION DE  
INTRADERMORREACCIONES  
EN CADA CONEJO**



## R E S U L T A D O S

Por lo que se refiere a la concentración de proteínas de los diferentes antígenos que se obtuvieron por los distintos métodos de extracción, se usó la técnica de Lowry (26) , - observándose diferencias más o menos mercedas en cada uno de ellos .

T A B L A    N o    2

Concentración de proteína de los antígenos obtenidos por diferentes métodos .

Antígenos	Método de extracción	Concentración mg/ml de proteína
Larval puro	Sacarosa-Acetona	2.5
Larval crudo	Acetona	2.0
Muscular puro	Sacarosa -Acetona	3.75
Muscular crudo	Acetona	3.70
Cuticular puro	Sacarosa -Acetona	4.36
Cuticular crudo	Acetona	3.35
Total puro	Sacarosa -Acetona	3.88
Total crudo	Acetona	3.75
Extracto	Trituración ,homogenización	4.26

Encontrándose que la mayor concentración le corresponde a los antígenos cuticular puro con 4.36 mg/ml , extraído por el método de Sacarosa-acetona ( Tabla No 2 ) .

Hecho lo anterior , se procedió a probar los diferentes antígenos con la prueba de hemaglutinación indirecta , con el fin de titular cada uno de ellos .

Obteniéndose un mayor título para el antígeno cuticular

puro, al que le correspondió 1:640 utilizándose en esta reacción un suero hiperimmune de conejo que se inmunizó con un extracto antigénico del parásito completo ( tabla No 3 ).

T A B L A No 3

Registro de hemaglutinación de los antígenos con suero de conejo inmunizado con extracto antigénico del parásito completo .

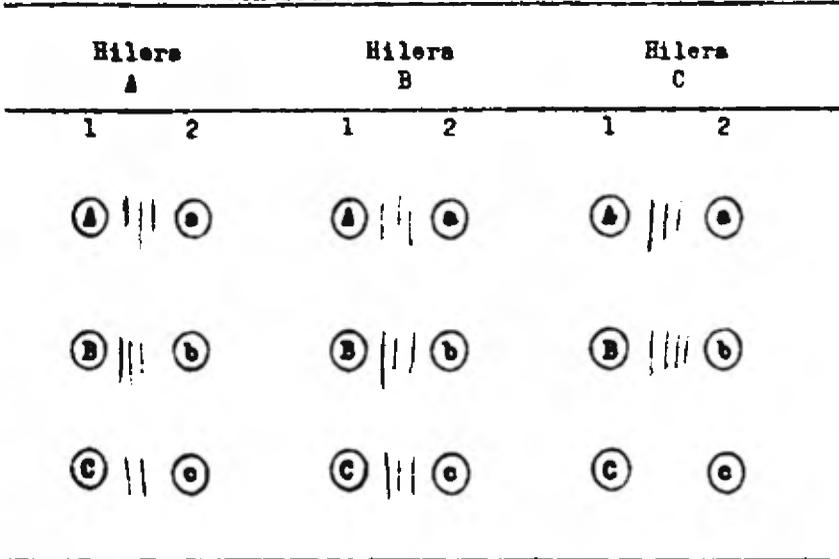
Antígeno	D I L U C I O N E S						
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Larval puro	+	+	+	+	+	-	-
Larval crudo	+	+	+	+	-	-	-
Muscular puro	+	+	+	+	+	-	-
Muscular crudo	+	+	+	+	+	-	-
Cuticular puro	+	+	+	+	+	+	-
Cuticular crudo	+	+	+	+	-	-	-
Total puro	+	+	+	+	+	-	-
Total crudo	+	+	+	+	-	-	-
Extracto	+	+	+	+	-	-	-

(+ ) reacción positiva , ( - ) reacción negativa .

A continuación se efectuó de igual manera la prueba de contraelectroforesis , con la misma finalidad, preparándose para tal efecto dos placas en las cuales se colocaron los antígenos motivo del experimento frente al suero hiperimmune de conejo inoculado con el extracto completo de Ascaris lumbricoides sua (Apéndice 11.2) .

ESQUEMA N° 3

Contraelectroforesis



**HILERA A :**

- Lados 1:A,B,C Suero hiperimmune de conejo inmunizado con extracto de Ascaris lumbricoides suum completo .
- Lado 2:a Antígeno total de Ascaris lumbricoides suum extraído por el método de sacarosa - acetona .
- Lado 2:b ~~Antígeno~~ Antígeno muscular de Ascaris lumbricoides suum extraído por el método de sacarosa- acetona .
- Lado 2:c Antígeno cuticular de Ascaris lumbricoides suum - extraído por el método de sacarosa- acetona .

**HILERA B :**

- Lados 1:A,B,C Suero hiperimmune de conejo inmunizado con extracto de Ascaris lumbricoides suum completo .
- Lado 2:a Antígeno total de Ascaris lumbricoides suum - extraído por el método de acetona .
- Lado 2:b Antígeno muscular de Ascaris lumbricoides suum - extraído por el método de acetona .

Lado 2<sup>o</sup> Antígeno outicular de Ascaris lumbricoides suum -  
extraído por el método de acetona .

HILERA C:

Lados 1<sup>a</sup>, B, C Suero hiperinmune de conejo inmunizado con extracto  
de Ascaris lumbricoides suum completo .

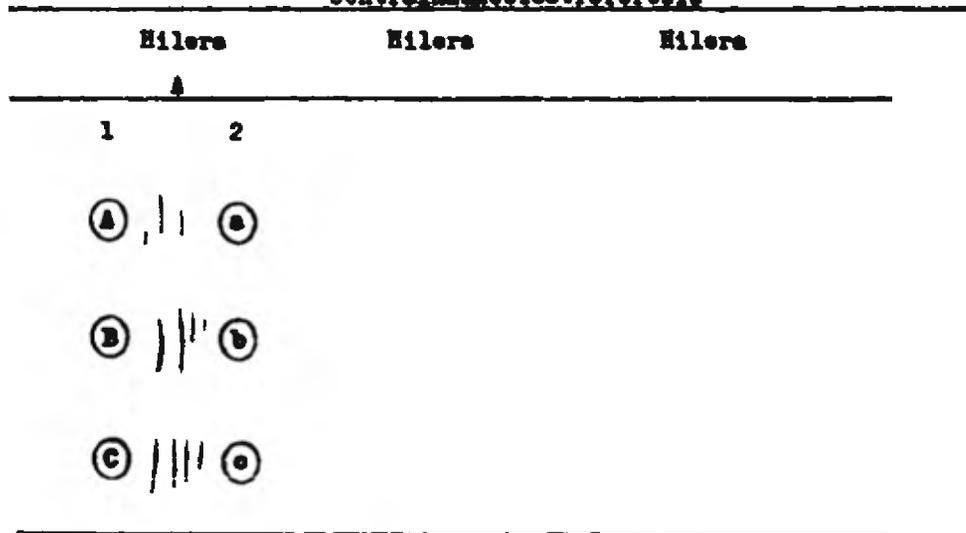
Lado 2<sup>a</sup> Antígeno de larvas de tercer estadio de Ascaris lumbricoides suum , extraído por el método de sacarosa-  
acetona .

Lado 2<sup>b</sup> Control positivo de Ascaris lumbricoides suum .

Lado 2<sup>c</sup> Control negativo (solución salina isotónica) .

ESQUEMA No 4

contraelectroforesis



HILERA A :

Lados 1<sup>a</sup>, B, C Suero hiperinmune de conejo inmunizado con extracto  
de Ascaris lumbricoides suum completo .

Lado 2<sup>a</sup> Antígeno de larvas de tercer estadio de Ascaris lumbricoides suum , extraído por el método de acetona .

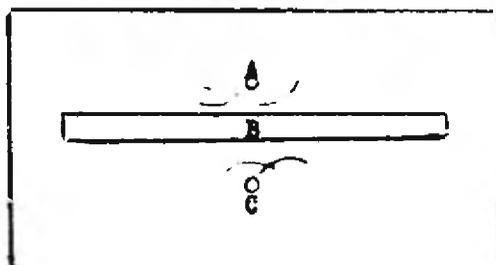
Lado 21b Extracto de Ascaris lumbricoides suum completo  
(triturado y homogenizado) .

Lado 21c Control positivo de Ascaris lumbricoides suum .

A continuación se procedió a efectuar la técnica de inmuno-electroforesis ,con el fin de conocer el número de bandas que se separaron de cada uno de los diferentes antígenos - (Esquemas 5,6,7,8,9) .

#### ESQUEMA No 5

Inmuno-electroforesis de suero hiperinmune contra los diferentes antígenos de Ascaris lumbricoides suum .

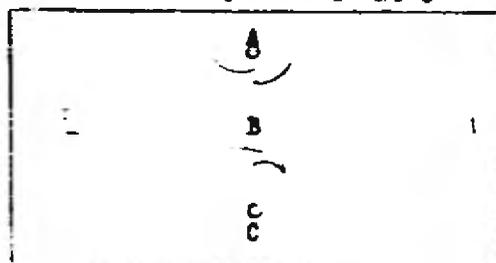


A: Antígeno total de Ascaris lumbricoides suum extraído con sacarosa - acetona .

B: Suero hiperinmune .

C: Antígeno muscular de Ascaris lumbricoides suum extraído con sacarosa - acetona .

#### ESQUEMA No 6

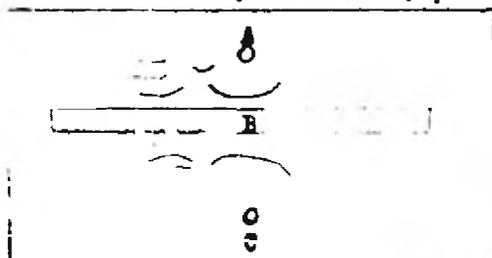


A: Antígeno cuticular de Ascaris lumbricoides suum extraído con sacarosa - acetona .

B: Suero hiperinmune .

C: Antígeno de larvas de tercer estadio de Ascaris lumbricoides ~~suero~~ extraído con sacarosa - acetona .

ESQUEMA No 7

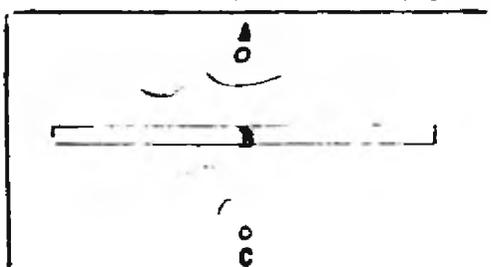


A: Antígeno total de Ascaris lumbricoides ~~suero~~ extraído con acetona .

B: Suero hiperinmune .

C: Antígeno muscular de Ascaris lumbricoides ~~suero~~ extraído con acetona .

ESQUEMA No 8

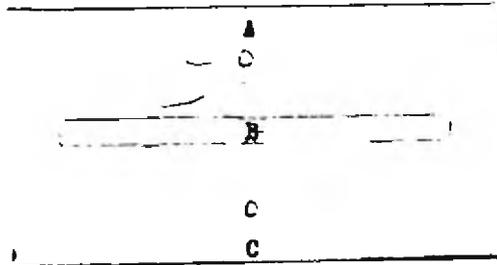


A: Antígeno cuticular de Ascaris lumbricoides ~~suero~~ extraído con acetona .

B: Suero hiperinmune .

C: Antígeno de larvas de tercer estadio de Ascaris lumbricoides ~~suero~~ extraído con acetona .

ESQUEMA No 9



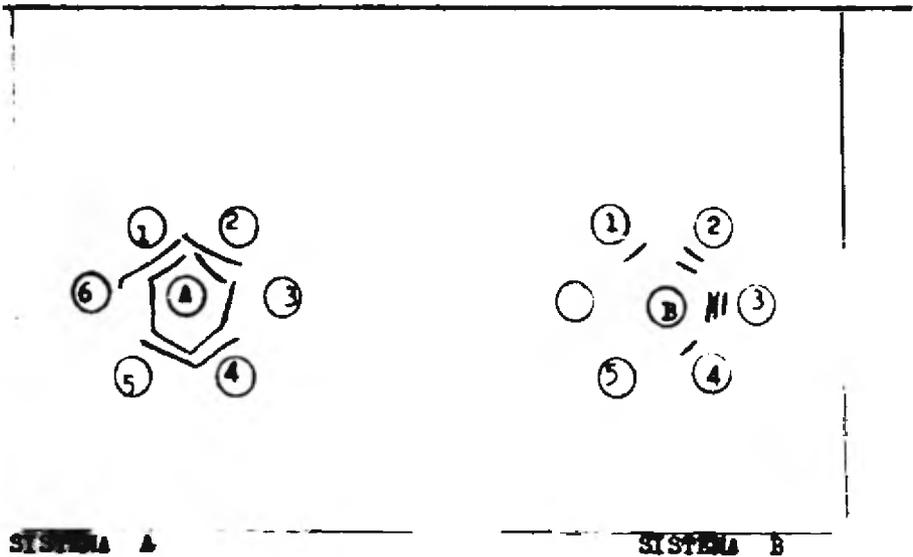
A: Extracto de Ascaris lumbricoides suum completo (triturado y homogenizado) .

B: Suero hiperinmune

C: Control negativo (solución salina isotónica) .

ESQUEMA No 10

Inmunodifusión usando suero hiperinmune contra los diferentes antígenos de Ascaris lumbricoides suum .



SISTEMA A

SISTEMA B

A: Suero hiperinmune de conejo inmunizado con extracto de Ascaris lumbricoides suum completo .

1. Antígeno total de Ascaris lumbricoides suum extraído por el método de sacarosa- acetona .

2. Antígeno muscular de Ascaris lumbricoides suum ,  
extraído por el método de sacarosa -acetona .
3. Antígeno cuticular de Ascaris lumbricoides suum.  
extraído por el método de sacarosa-acetona .
4. Antígeno total de Ascaris lumbricoides suum ,  
extraído por el método de acetona .
5. Antígeno muscular de Ascaris lumbricoides suum  
extraído por el método de acetona .
6. Antígeno cuticular de Ascaris lumbricoides suum  
extraído por el método de acetona .

**SISTEMA B :**

- B1 Suero hiperinmune de conejo inmunizado con extracto de Ascaris lumbricoides suum completo.
1. Antígeno de larvas de tercer estadio de Ascaris lumbricoides suum ,extraído por el método de -  
sacarosa -acetona .
  2. Antígeno de larvas de tercer estadio de Ascaris lumbricoides suum ,extraído por el método de acetona .
  3. Extracto antigénico de Ascaris lumbricoides suum  
completo (triturado y homogenizado ) .
  4. Control positivo de Ascaris lumbricoides suum .
  5. Control negativo ( solución salina isotónica ) .

Al efectuar las lecturas de la I.D.R. con los diferentes antígenos de Ascaris lumbricoides suum ,se observó la reacción característica en cada uno de los conejos en los que se practicó la prueba .

A la primera hora se detectó una zona de induración la cual se desarrolló a las 2 horas una zona de tipo eritematosa y a las 4 horas se formó un edema el cual al ser medido resultó ser variable en cada uno de los conejos .Graficas 1,2,3,4,5,6,7,8,9

El edema permaneció constante en cada uno de ellos hasta las 2 horas , tendiendo a desaparecer posteriormente .Graficas 1,2,3,4,5,6,7,8,9 .

En el conejo No 3 la intradermorreacción fué mayor (diámetro - 2.2 cm ) y que correspondió al antígeno cuticular .Grafico No 3 .

Al efectuar las lecturas de I.D.R. con los diferentes antígenos de Ascaris lumbricoides suum , se observó un efecto semejante en cada uno de ellos , el cual consistió en la aparición de una zona indurada con edema y eritema a la primera hora , aumentando poco a poco el diámetro de esta reacción llegando al máximo a las 4 horas , con un aumento de 2.2 cm .Después de este tiempo , empezó a disminuir la reacción , pero permaneciendo la zona de induración hasta las 48 y 72 horas , manteniéndose un diámetro de 0.6 cm , tendiendo posteriormente a su desaparición .Graficas 1,2,3,4,5,6,7,8,9 .

Es necesario señalar que la mayor respuesta que se presentó fué con el antígeno cuticular tal y como se observa en las graficas 3 y 6 .

El conejo No 9 que fué usado como testigo y el cual se inculó con solución salina a las 4 horas disminuyó la reacción provocada por el traumatismo, desapareciendo al mismo tiempo el edema .

De acuerdo a los estudios hechos por varios investigadores , se sabe que un simple extracto del parásito inculado a una persona ésta desarrolle un proceso de hipersensibilidad. En función de esta situación consideramos que la mayor actividad sensibilizante del

organismo y de acuerdo a nuestros resultados ,esta actividad se localiza a nivel de cutícula ,cuyas características químicas - (concentración de proteínas y carbohidratos ) le confieren la propiedad de antigenicidad así como la de inducir la formación y producción de inmunoglobulinas E ,consideradas como responsables de todo tipo de alergias y detectables en la mayoría de los casos por medio de la intradermorreacción (Johansson et al 1968 ) .

Cada uno de los antígenos se estandarizó a una concentración de proteínas de 2.0 mg/ml .

A las 4 semanas posteriores a la sensibilización ,se procedió a practicarles la intradermorreacción ,usando para tal efecto la misma concentración de proteínas en cada uno de los conejos,incluyéndose control de solución salina al 0.85 % rasurando el dorso de los conejos (Esquema No 2 de intradermorreacción ) .

Los resultados de la intradermorreacción se registraron a las 2,4,8,12,18,24,48,72 horas .(Tabla No 3 ) .

La evolución de las cutirreacciones,se muestra en las gráficas 1,2,3,4,5,6,7,8, y 9 comparativamente con el testigo inoculado con solución salina 0.85 % .

En cada uno de los conejos la reacción se presentó más o menos uniforme con las variaciones correspondientes a cada uno de los antígenos .

Al hacer la comparación de las gráficas ,observamos que la mayor reacción se presenta con el antígeno cuticular puro obteniéndose la máxima a las 2 horas siendo una induración sostenida casi hasta las 48 horas .

Como podemos observar ,los antígenos cuticulares son los -

mejores inductores de este tipo de respuesta, comparativamente con los demás que se estudiaron (total puro, total crudo, muscular puro, muscular crudo, larval puro, larval crudo, extracto).

Ahora bien de acuerdo a estos resultados y los reportes de otros autores (Chase 1957) consideramos que la intradermorreacción presenta seria limitación, como son su baja especificidad dada en este caso particular de Ascaris lumbricoides suum por la gran variedad antigénica que presenta, así como por la existencia de varios alérgenos presentes en el parásito por lo que su valor diagnóstico está en entredicho. Consideramos que se pueden aumentar la especificidad de la reacción en tanto se desarrollen mejores métodos para la purificación y aislamiento de antígenos específicos y además exista una buena estandarización, así como uniformidad en su aplicación o recurrir a otras técnicas más específicas.

La segunda parte de este trabajo consistió en detectar la respuesta celular por medio de la intradermorreacción.

Primeramente se seleccionaron 9 conejos en los que se practicó dicha prueba. Cada uno de los conejos fue sensibilizado con extracto antigénico del parásito y de acuerdo al siguiente procedimiento (Tabla No 1). Encontrándose los resultados en la tabla No 3.

T A B L A No 3

Registro de las intradermorreacciones en ca a diferentes tiempos

Antígeno	Inicial	H O R A S								
		2	4	8	12	18	24	48	72	
Patrón	1.3	1.2	1.1							C
Total puro	1.9	2.0	1.9	1.7	1.5	1.4	1.3	1.0	0.8	E
Muscular puro	1.8	2.1	1.6	1.3	1.2	1.2	1.2	0.5	0.2	E
Cuticular puro	2.0	2.4	1.9	1.7	1.5	1.3	1.2	0.4		T
Total crudo	1.5	2.0	1.9	1.5	1.3	1.1	0.9	0.3		I
Muscular crudo	1.6	1.9	1.7	1.3	1.1	1.1	1.1	0.1		H
Cuticular crudo	1.9	2.3	2.0	1.8	1.5	1.3	1.2	0.8	0.8	E
Larval puro	1.8	1.7	1.6	0.8	0.6	0.5	0.2	0.1		T
Larval crudo	1.7	1.7	1.2	0.7	0.4	0.3	0.2	0.1		E
Extracto en S.S	0.8	1.5	1.3	1.1	1.0	0.9	0.8	0.4	0.050	

S.S.- Solución Salina .

DIAMETRO EN CM

GRAFICA DE INTRADERMORREACCION  
CONEJO No.1

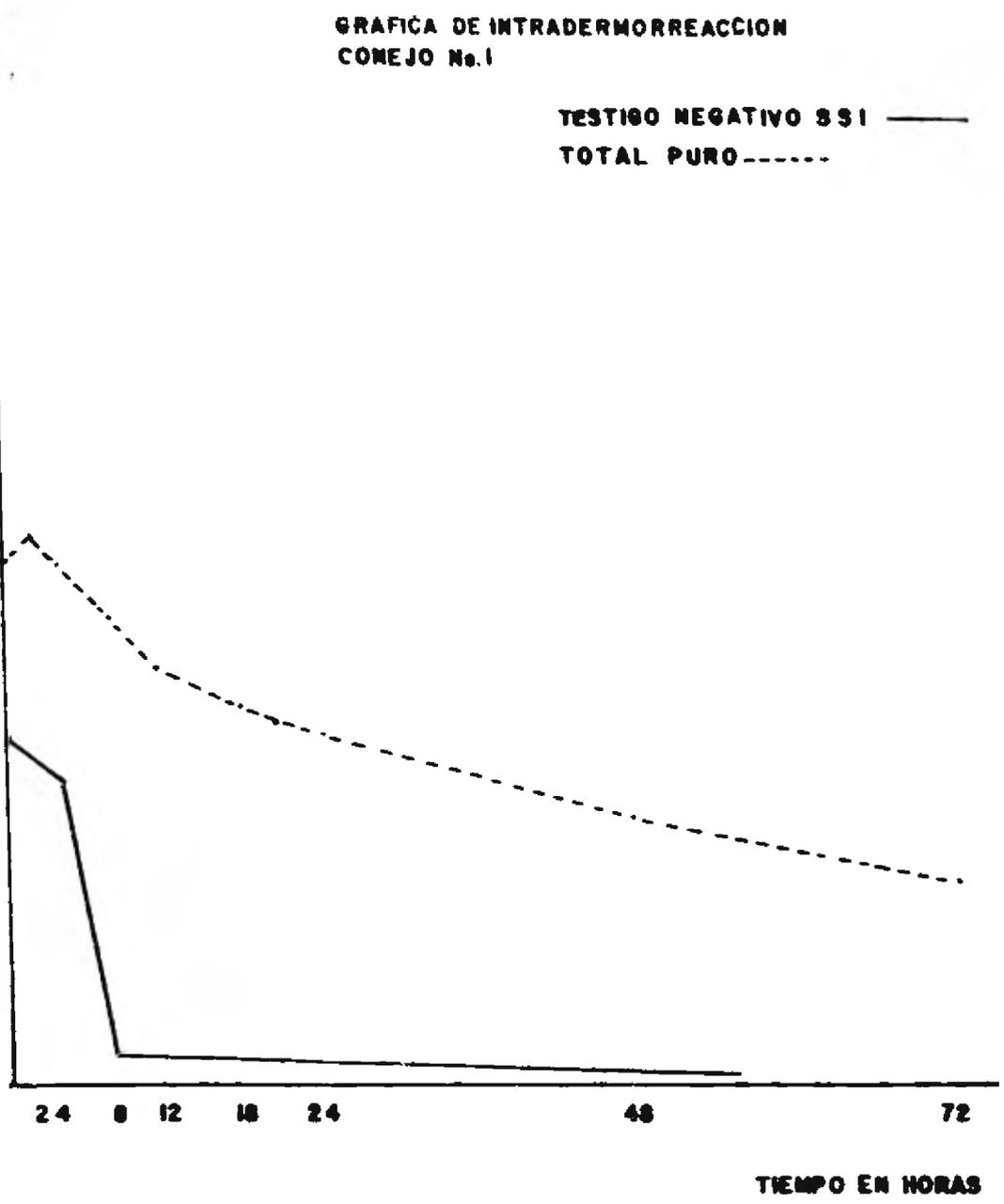
TESTIGO NEGATIVO SSI ———  
TOTAL PURO-----

2

1

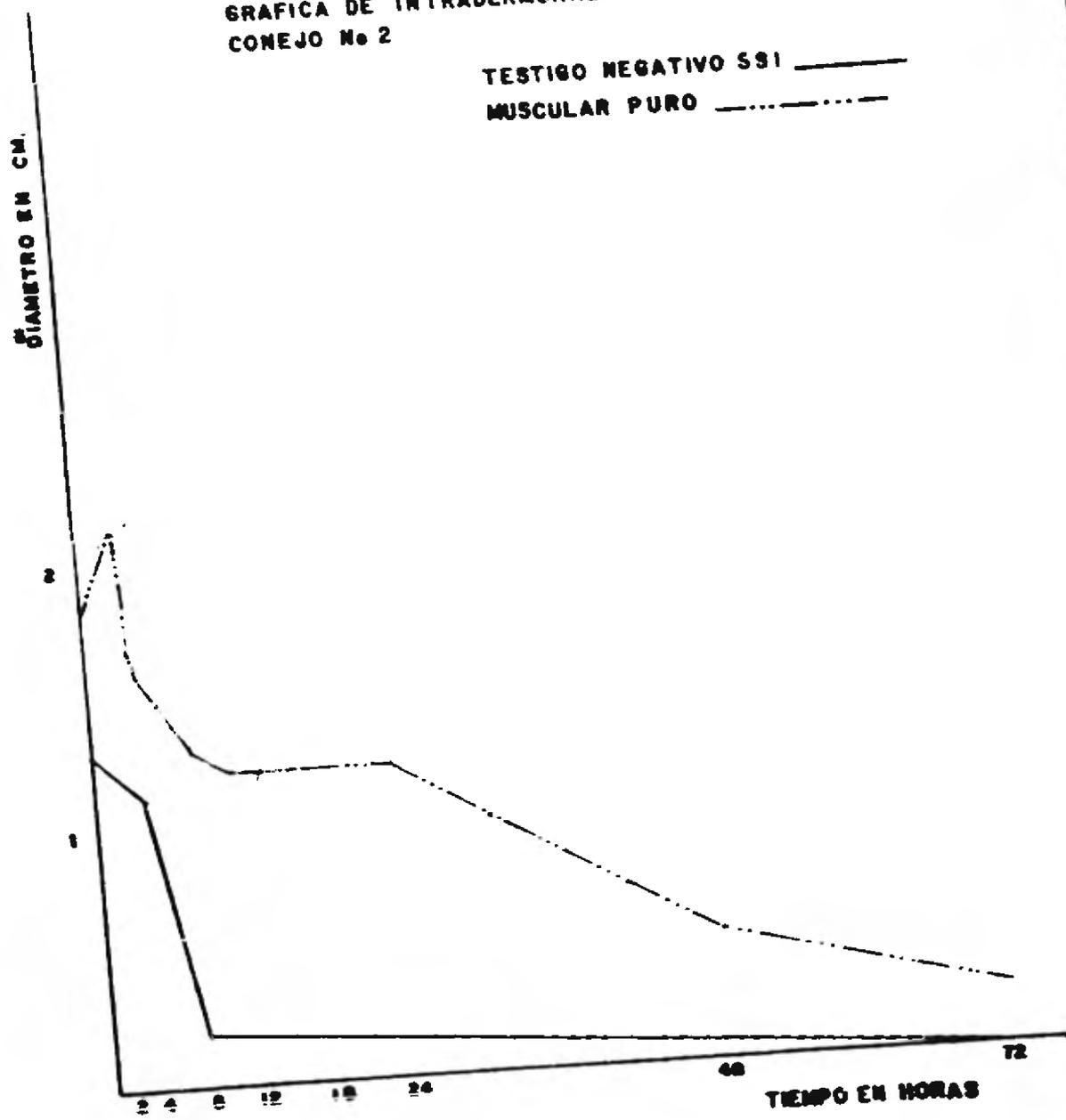
24 0 12 18 24 48 72

TIEMPO EN HORAS



GRAFICA DE INTRADERMORREACCION  
CONEJO No 2

TESTIGO NEGATIVO SSI \_\_\_\_\_  
MUSCULAR PURO .....-.....

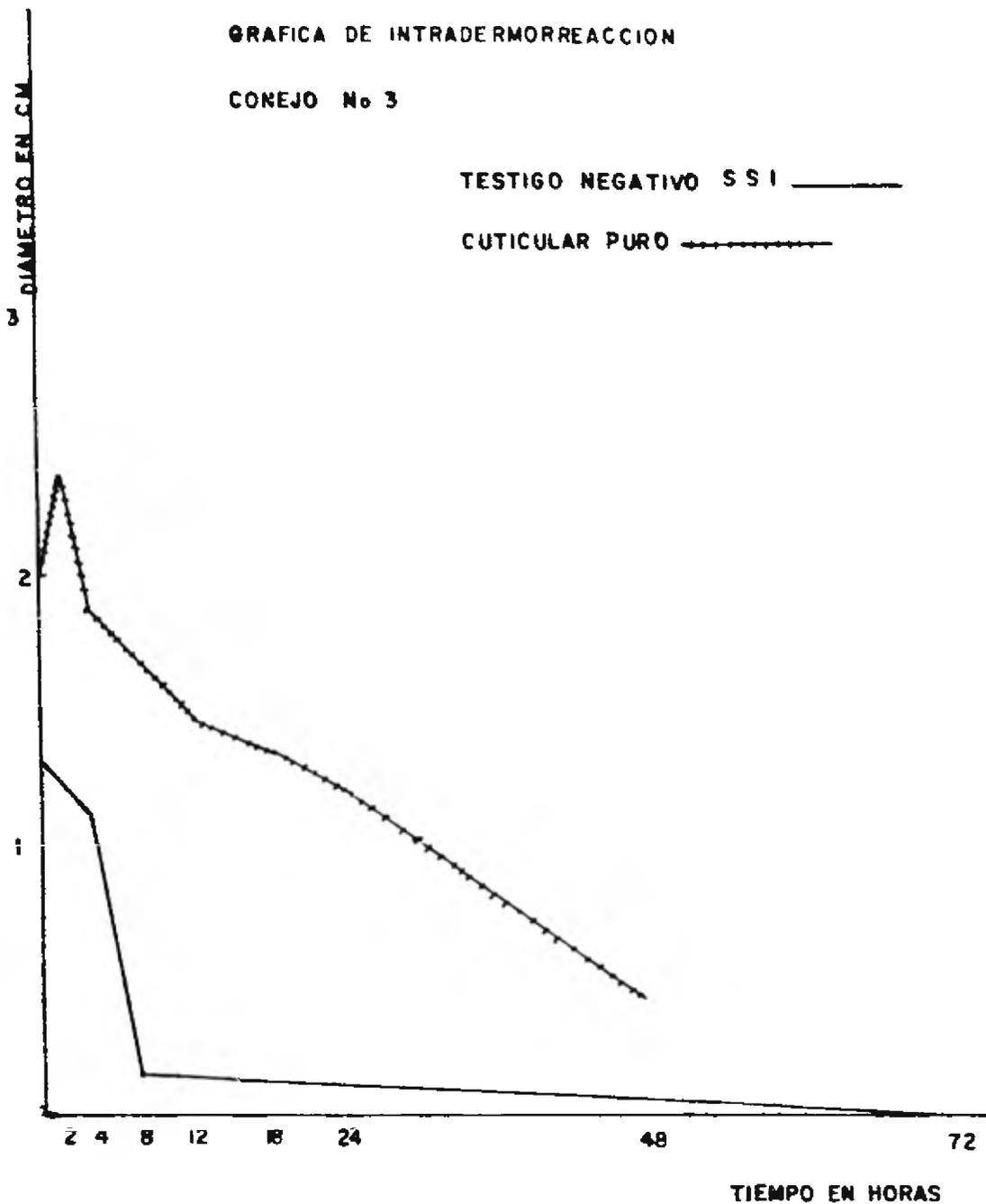


GRAFICA DE INTRADERMORREACCION

CONEJO No 3

TESTIGO NEGATIVO S S I \_\_\_\_\_

CUTICULAR PURO ←-----→

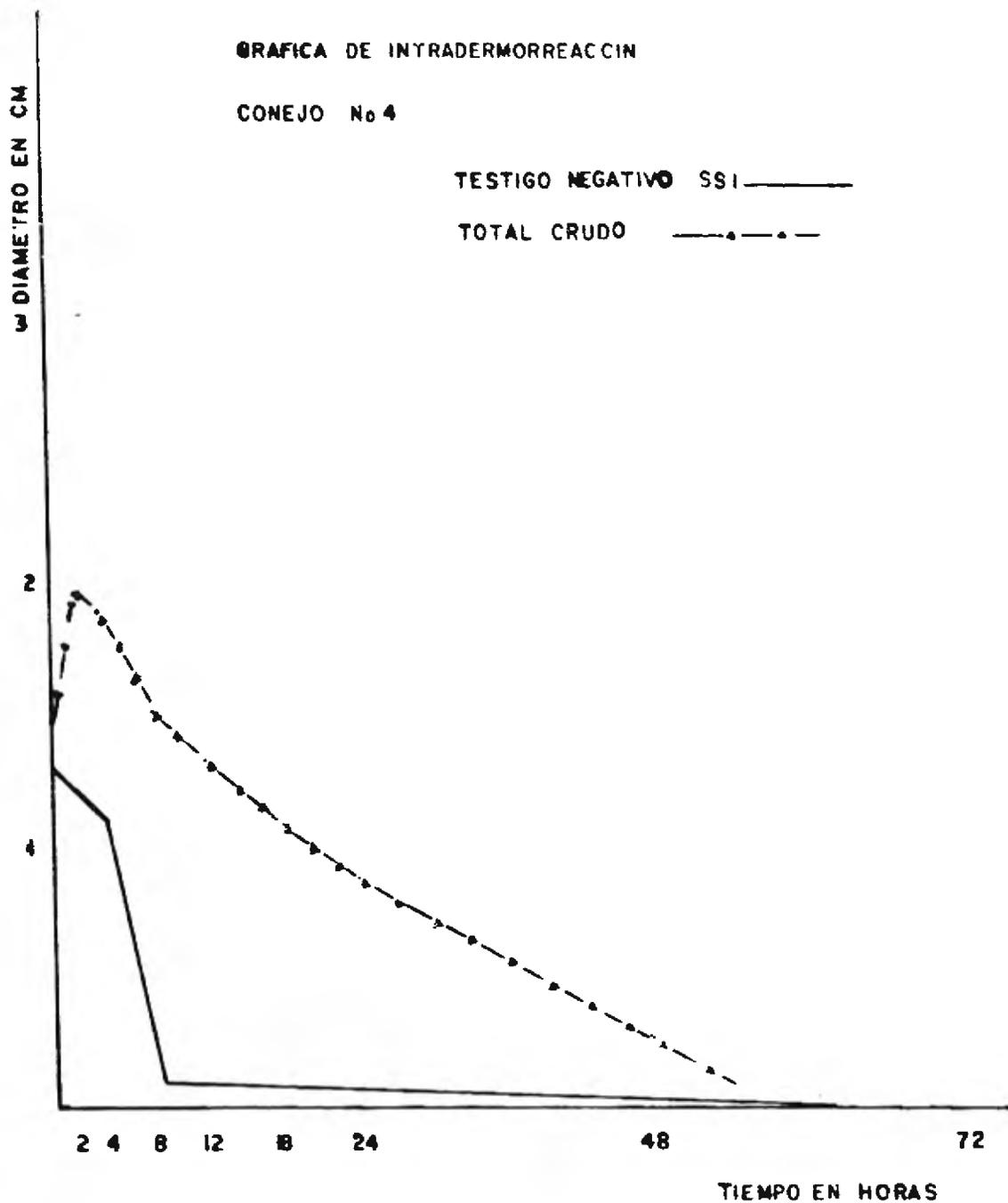


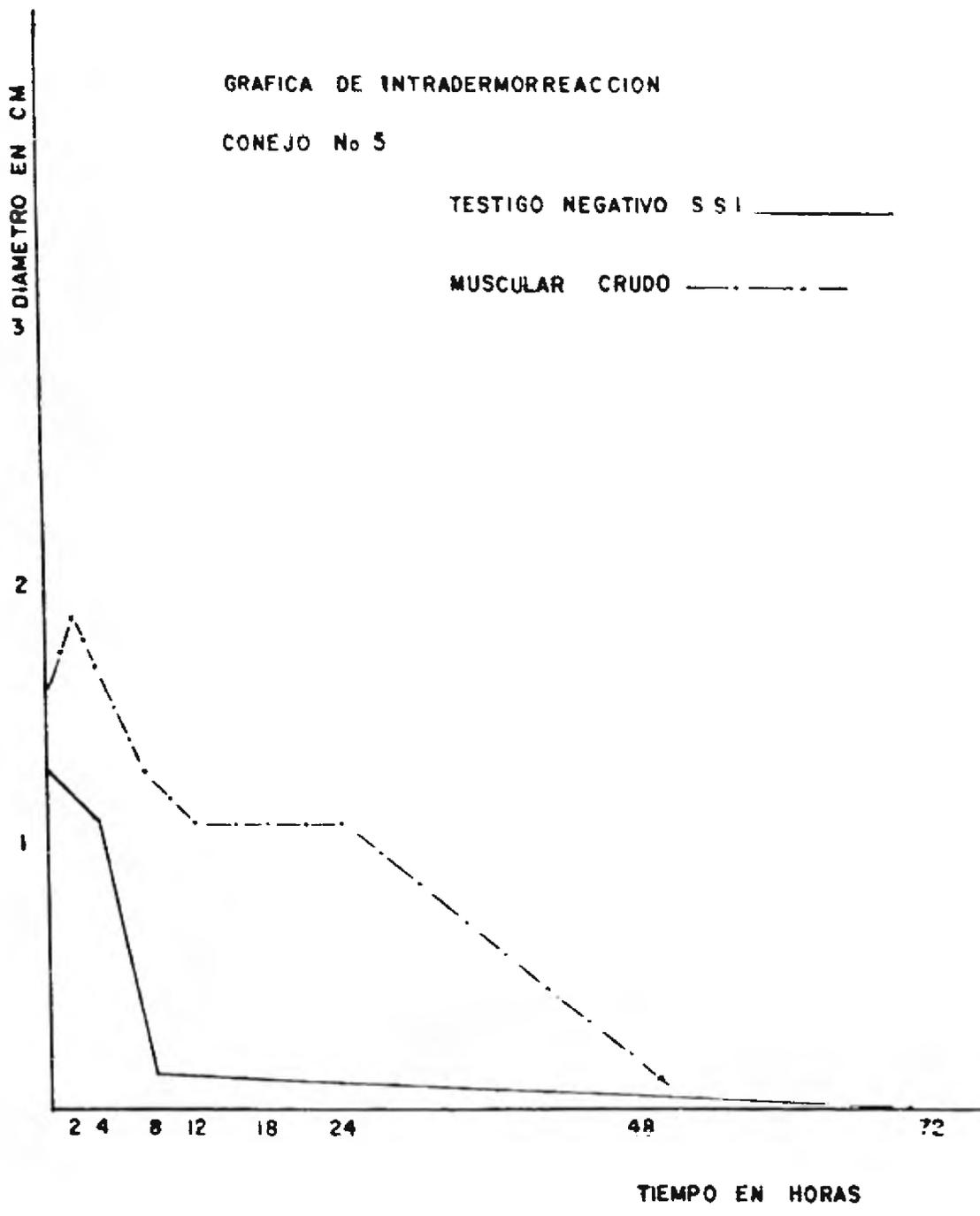
GRAFICA DE INYRADERMORREACCIN

CONEJO No 4

TESTIGO NEGATIVO SSI \_\_\_\_\_

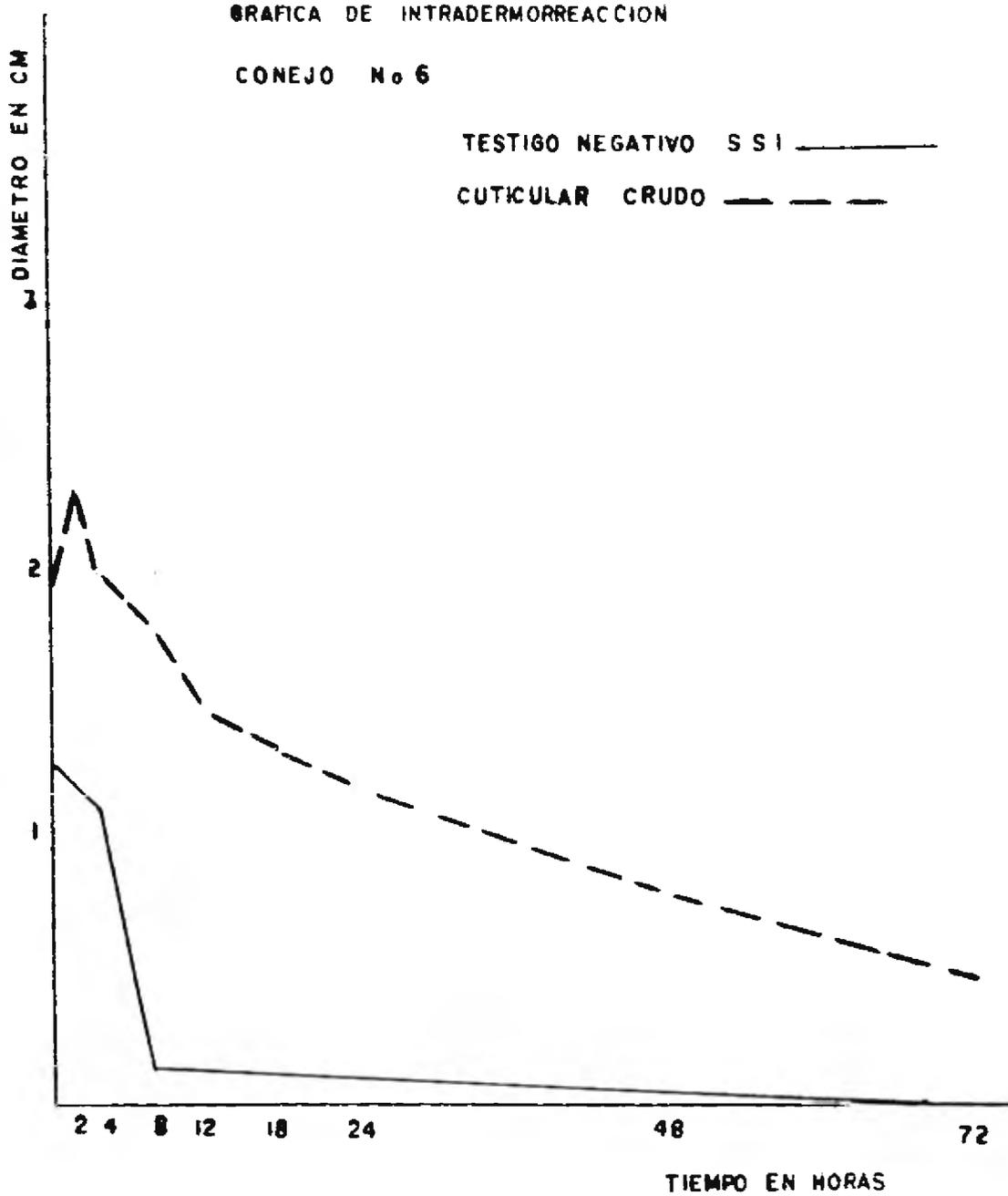
TOTAL CRUDO - - - - -





GRAFICA DE INTRADERMORREACCION

CONEJO No 6

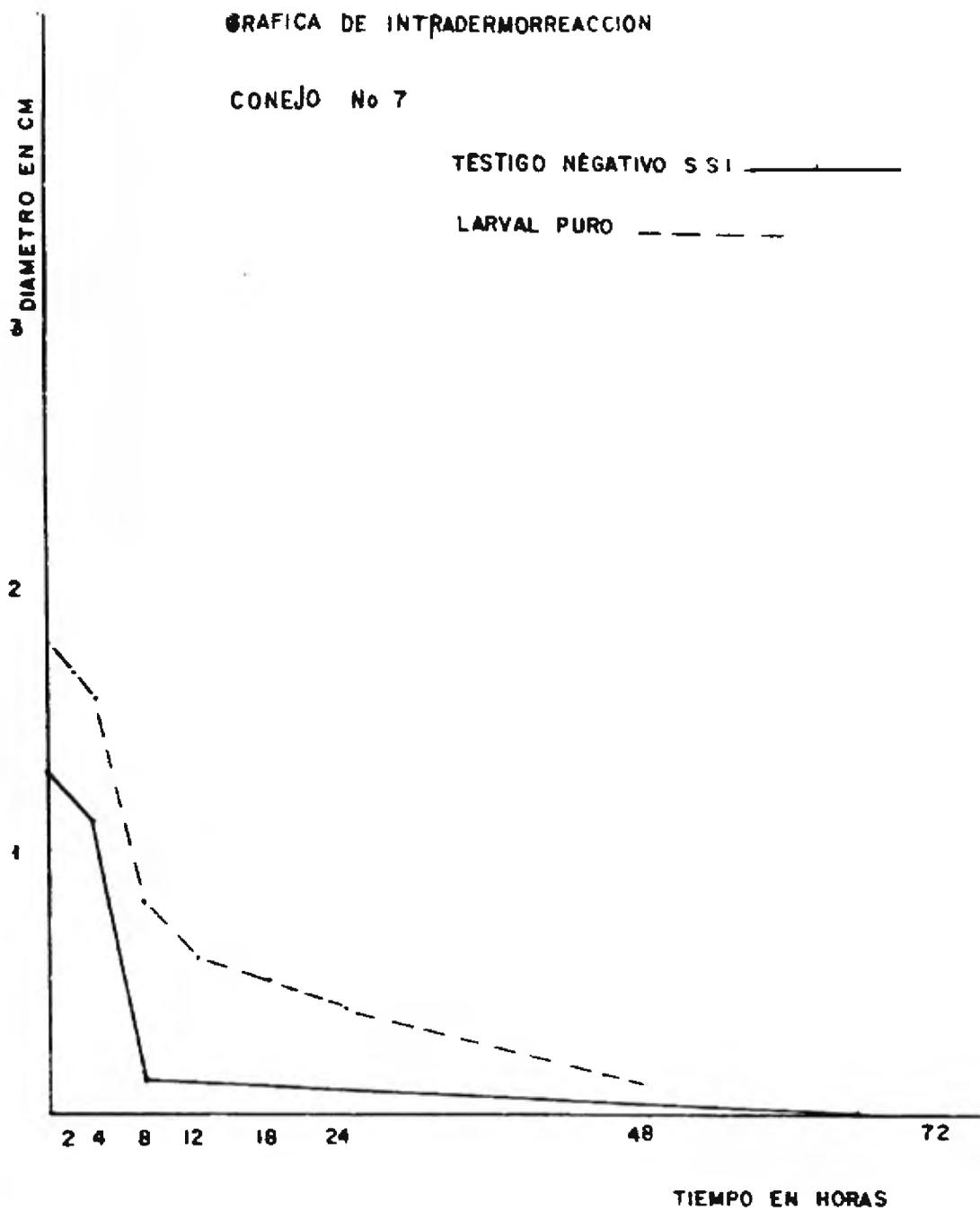


GRAFICA DE INTRADERMORREACCION

CONEJO No 7

TESTIGO NEGATIVO S SI —————

LARVAL PURO - - - - -

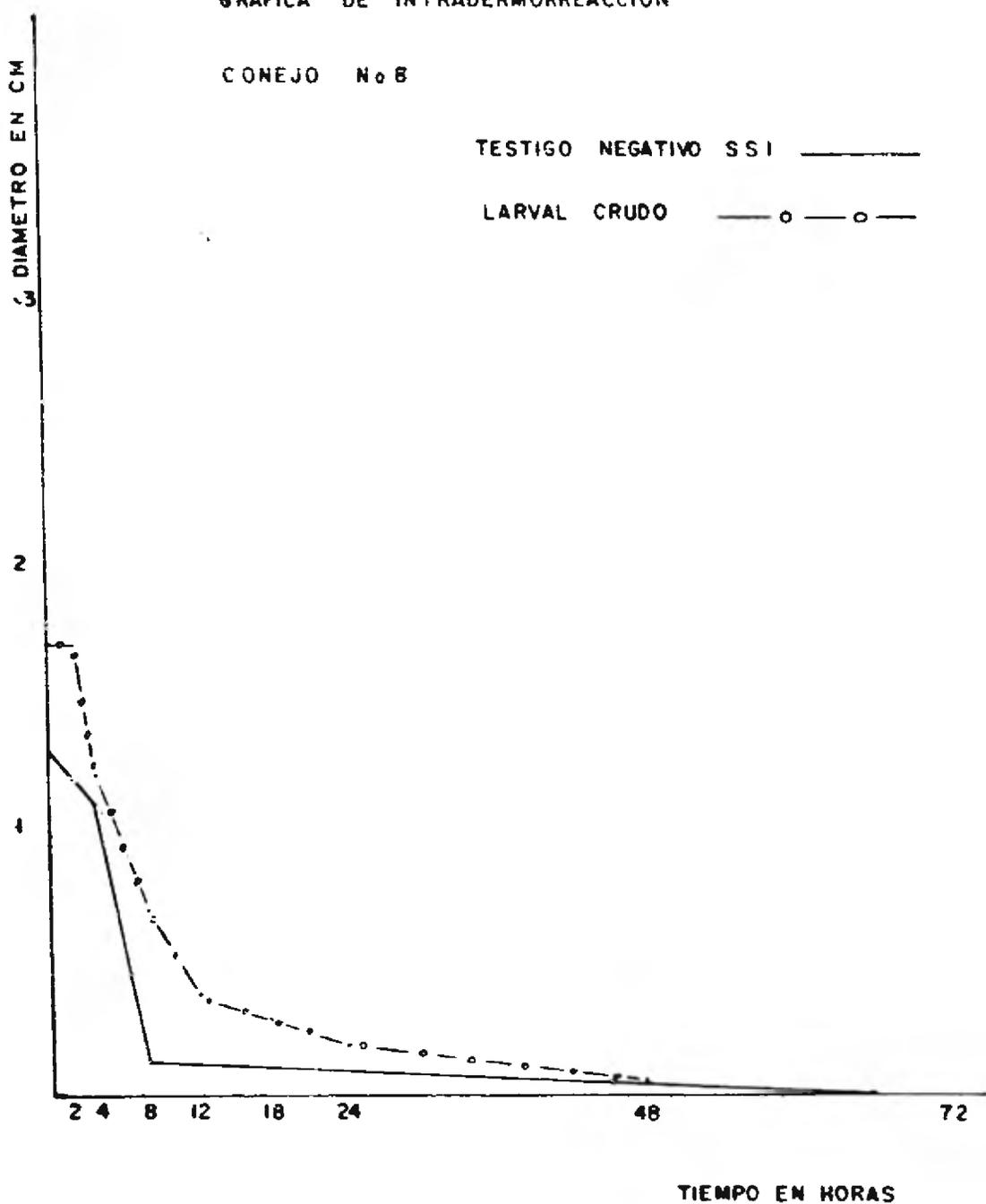


GRAFICA DE INTRADERMORREACCION

CONEJO N° 8

TESTIGO NEGATIVO SSI ———

LARVAL CRUDO — o — o —

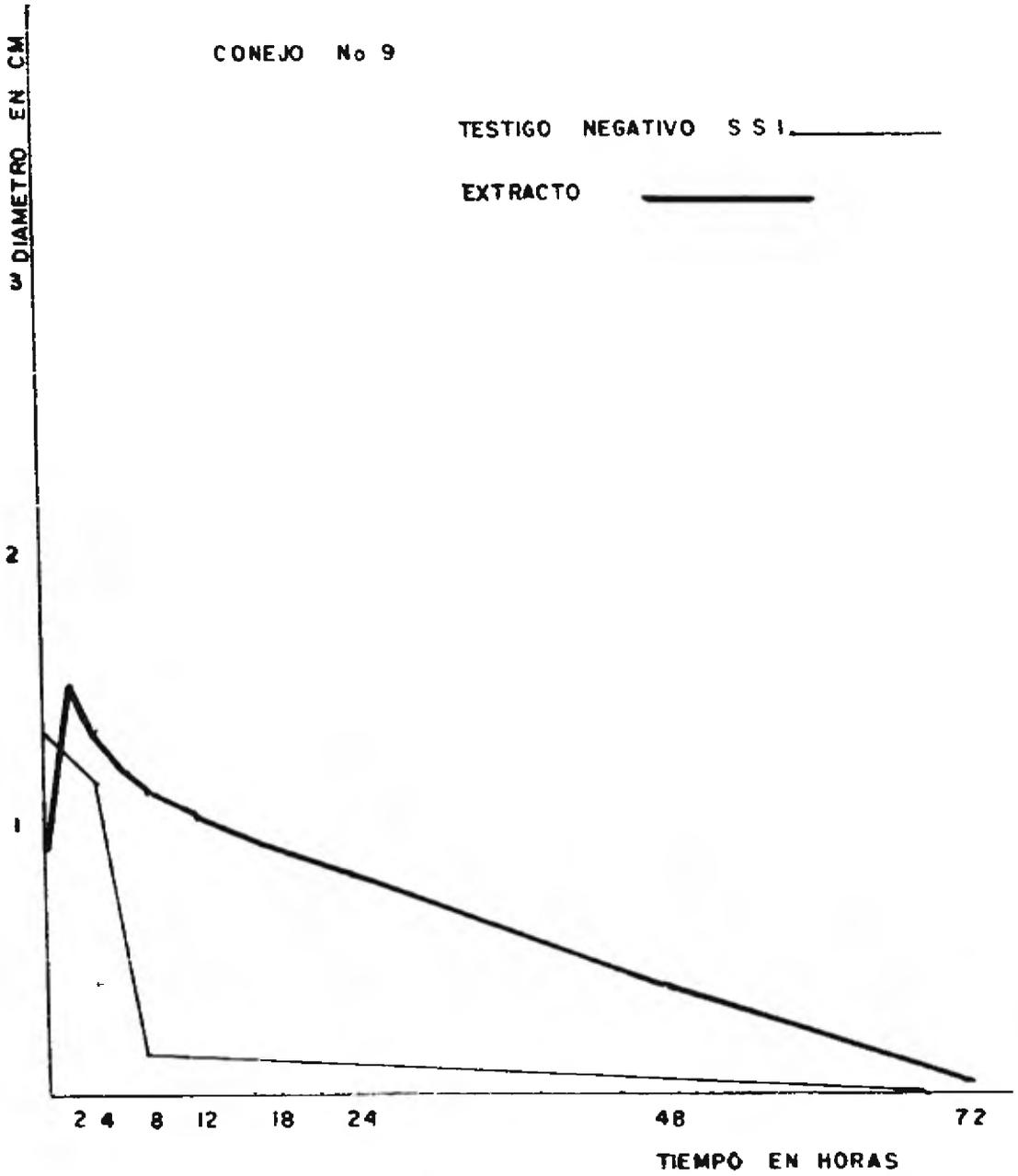


GRAFIÇA DE INTRADERMORREACCION

CONEJO No 9

TESTIGO NEGATIVO S S I \_\_\_\_\_

EXTRACTO \_\_\_\_\_



## DISCUSION DE LOS RESULTADOS

No obstante que se han utilizado muchas técnicas para la obtención de antígenos de diferentes parásitos, entre ellos el de Ascaris lumbricoides suum; en éste y de acuerdo a nuestros resultados, el mejor método de extracción fué el de sacarosa-acetona, con el que se obtuvo una mayor concentración de proteínas y la eliminación de ciertos elementos que pudieran en algún momento interferir en la actividad antigénica. En la tabla No 1 se muestra que la mayor concentración de proteínas determinadas por la técnica de Lowry ( 26 ) fué el método de extracción de sacarosa-acetona para el antígeno cuticular puro con 4.36 mg/ml, el cual al ser inoculado al conejo, produjo una buena respuesta humoral, tal y como se observa en la tabla No 2 en la que se cuantificaron los anticuerpos por hemaglutinación, correspondiéndole un mayor título (I:640) al mismo antígeno cuticular puro (sacarosa-acetona)

Así mismo detectamos que todos los antígenos extraídos con sacarosa-acetona, fueron los que provocaron una mayor respuesta en el conejo, siendo semejante el título para los antígenos mucular crudo y puro respectivamente, en este caso particular, consideramos que ambas técnicas de extracción no eliminan la gran cantidad de lípidos y carbohidratos presentes en esta estructura y son los que interfieren en la respuesta inmune.

Por lo que se refiere al comportamiento electroforético, este estudio, se efectuó utilizando los diferentes antígenos que se extrajeron y se usó suero hiperinmune de conejo contra antígeno completo de Ascaris lumbricoides suum se observó que el menor número de bandas que se presentan es con el antígeno cuticular

obtenido con sacarosa-acetona (Esquemas 5,6,7,8,9 ) y el de larvas de tercer estadio extraído igualmente con sacarosa-acetona .

Conocido el comportamiento y reactividad en la inmuno electroforésis ,se siguió con la sensibilización de los conejos y se continuó el sangrado periódico de los animales ,para conocer la respuesta inmune,presentandose el mayor título a los 15 días , detectado por hemaglutinación .

Por lo que respecta a la inmunodifusión que se montó ,se puede observar que tambien el menor número de bandas que se detectan es con el antígeno cuticular y larval extraídos con sacarosa-acetona al interaccionar con el suero hiperinmune (Esquema 6 ) .

En la contrainmunoelectroforésis el comportamiento es más específico ,detectandose el menor número de bandas con el antí geno cuticular puro (sacarosa -acetona ) y en el caso del larval extraído por el mismo método,la reactividad indica un mayor nú mero de bandas (3) (Esquemas 7,8 ) .

## CONCLUSIONES

1.- La manipulación, la temperatura así como el tiempo que transurre en procesar el parásito, alteran su constitución química y por lo tanto la reactividad de los diferentes antígenos que se probaron .

Por lo que la preparación de los diferentes antígenos deberá de efectuarse lo más rápido posible para evitar en lo posible cualquier tipo de alteración .

2.- De los antígenos que se estudiaron y probaron el que dió una mayor reactividad en cada una de las reacciones que se usaron para detectar su comportamiento inmunológico fué el outicular puro, por lo que creemos que es el que debe de usarse para diagnóstico de la enfermedad .

3.- Es necesario la estandarización del antígeno ya que sino se efectúa, la reactividad se ve disminuida y nos puede dar resultados falsos al momento de las lecturas correspondientes .

4.- Todos los antígenos que se prepararon se pueden almacenar debidamente liofilizados, con lo que se mantienen en buenas condiciones de estabilidad durante bastante tiempo, evitándose al máximo su reactividad así como su desnaturalización .

5.- El mejor método de extracción para la preparación de los diferentes antígenos fué el de sacarosa-acetona ya que con esto se eliminan gran cantidad de lípidos que pudieran interferir en la reactividad .

6.- Como en esta enfermedad y en otras parasitosis la intradermorreacción no representa ningún valor diagnóstico, solo puede ser usada para estudios epidemiológicos .

APENDICE 1  
METODOS QUIMICOS

1. DETERMINACION DE PROTEINAS, METODO DE LOWRY

1.1 FUNDAMENTO :

Es un método colorimétrico, mediante el cual se mide el color azul que se produce al agregar el reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu a una solución alcalina de proteínas.

El reactivo de Folin-Ciocalteu (sales de litio del ácido-- fosfomolibdotúrgico ) oxida compuestos fenólicos en condiciones alcalinas ,por lo que se reduce de un color inicial amarillo oro a un color azul intenso .

Este reactivo se usa para medir compuestos fenólicos así como para determinar tirosina, el aminoácido que contiene una cadena lateral fenólica. Dado que todas las proteínas contienen tirosinas , esta reacción ha sido muy usada para determinar cuantitativamente proteínas. Los grupos indol e imidazol de triptofano e histidina, reaccionan también con el reactivo, pero la reacción es más débil que la obtenida con la estructura de anillo fenólico.

La intensidad del color depende del contenido de tirosina y triptofano, pero hay ciertos factores que influyen en la reacción como son el tiempo que la proteína está expuesta al álcali antes de agregar el reactivo de fenol y la presencia de grupos SH u otros grupos reductores .

En la modificación de Lowry , el método se hace aún más sensible por la adición de una pequeña cantidad de cobre en tartrato debilmente alcalino con lo que se aumenta el desarrollo del color. El complejo de tipo Biuret entre cobre y proteína ,

se trata posteriormente con el reactivo de fenol. El complejo formado y las cadenas aromáticas de las proteínas reducen el reactivo y las dos reacciones juntas son cien veces más sensibles que el método de Biuret, lo que permite detectar cantidades pequeñas de proteínas del orden de 30 a 100  $\mu$ g (1-5  $\mu$ g de N ) con una precisión de  $\pm$  10 %

#### 1.2 Equipo :

Colorímetro

Balanza granataria

#### 1.3 Material :

Tubos de ensayo 13 x 100 mm

Pipetas de 5.0 ml (1/10 )

Pipetas de 1.0 ml (1/100)

Pipetas de 0.1 ml (1/100 )

Gradilla

Espátula

Probeta de 100 ml

Frasco ámbar con tapón esmerilado de 100 ml .

#### 1.4 Reactivos :

- Solución de sulfato de cobre pentahidratado al 1 %:

Disolver 1.0 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) en 50 ml de agua destilada , aferer a 100 ml con agua destilada.

- Solución de tartrato de sodio y potasio al 2.0 % :

Disolver 2.0 g de tartrato de sodio y potasio en 50 ml de agua destilada, aferer a 100 ml con agua destilada .

- Carbonato de sodio al 2.0 % en hidróxido de sodio 0.1 mol/litro  
 Disolver 2.0 g de carbonato de sodio en 50 ml de hidróxido de sodio 0.1 mol/litro ,aforer a 100 ml con solución de NaOH .
- Solución 1 :  
 Se prepare mezclado 1.0 ml de la solución de sulfeto de cobre y 1.0 ml de la solución de tartreto de sodio y potasio en 100 ml de la solución de carbonato de sodio(se prepara justamente antes de usarla )
- Reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu (comercial ) 2 N :  
 Antes de usarlo se diluye volumen a volumen con agua destilada para tenerlo 1 N .
- Solución de albúmina sérica bovina conteniendo 100  $\mu$ g/ml :  
 Disolver 0.1 g de albúmina sérica bovina cristalizada y purificada en 500 ml de agua destilada,se afora a 1000 ml con agua destilada .

#### 1.5 Método :

- Preparación de la curva estándar:  
 En una serie de tubos de ensayo,se preparan a partir de la solución de albúmina sérica bovina,diluciones que contengan 20,40,60,80 y100  $\mu$ g de proteína por ml .
- En otros tubos,se mide 0.1 ml de la muestra de antígeno .
- se complete el volumen a 1.0 con agua destilada .
- Se añaden 3.0 ml de la solución I .
- Se agita y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente .
- A cada tubo se le agrega 0.3 ml de reactivo de fenol de Folin-Ciocalteu 1 N .
- Se mezcla y se deja reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente .

- Se hace la lectura de D.O. en el colorímetro a 500 nm de longitud de onda .

#### 1.6 Interpretación :

- Se grafica la D.O. contra la concentración de los estándares usando papel milimétrico .
- Por interpolación de los valores de D.O. en la curva patrón , se obtiene la concentración de proteínas del antígeno .

### 2. DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS ,METODO DE LA ANTRONA .

#### 2.1 Fundamento :

La antrona en ácido sulfúrico es un reactivo general para carbohidratos ,incluyendo monosacáridos,polisacáridos,glucósidos y ésteres .

Se basa en la formación de derivados del furfural por deshidratación de las moléculas ( 34 ) .

#### 2.2 Equipo :

Colorímetro

Balanza analítica .

#### 2.3 Material :

Tubos de ensayo 13 x 100 mm

Gredilla

Baño de agua a ebullición

Baño de hielo

Pipetas de 0.1 ml (1/100 )

Pipetas de 1 ml ( 1/100 )

Probeta de 100 ml

Matraz aforado de 100 ml .

#### 2.4 Reactivos :

- Solución de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico al 9%  $\frac{1}{10}$  :

Se disuelven 0.2 g de antroens recristalizadas en aproximadamente 50 ml de ácido sulfúrico al 95 % ,se afora a100 ml con ácido sulfúrico al 95 % .El reactivo se prepara al momento de emplearse .

- Solución patrón de glucosa con 100 $\mu$ g /ml :

Se disuelven 0.1 g de glucosa en aproximadamente 500 ml de agua destilada ,se afora a un litro con agua destilada .

## 2.5 Método :

- Preparación de la curva estándar :

En una serie de tubos de ensayo que contengan 2.0 ml del reactivo de antroens y manteniendolos en hielo,se agrega el volumen necesario de la solución patrón de glucosa para tener concentración de 12.5 ,25 ,50 y 100 $\mu$ g/ ml y se completa a 3.0 ml con agua destilada .

- A otros tubos conteniendo 2.0 ml de reactivo,tambien manteniendoles en hielo ,se agrega 0.1 ml de la muestra de los antígenos y se completa a 3.0 ml con agua destilada .
- En los dos pasos anteriores ,el reactivo y la muestra problema o el patrón ,deben quedar en capas cuidadosamente estratificadas .
- Se hace un blanco con 1.0 ml de agua destilada y 2.0 ml del reactivo .
- Se agitan vigorosamente todos los tubos sin sacarlos del baño de hielo,para homogenizar perfectamente .
- Se colocan los tubos en baño de agua a ebullición durante 16 minutos exactos .
- Se pasan a un baño de agua fría .
- Se hace la lectura de la D.O. en el colorímetro a 625 nm de longitud de onda .

## 2.6 Interpretación :

- Los valores de D.O. de los tubos de la curva estándar se grafican contra la concentración sobre papel milimétrico por interpolación de los valores de D.O. en la curva patrón , se obtiene la concentración de carbohidratos del antígeno .

## APENDICE II

### MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

#### 1. Doble Difusión . Técnica de OUCHTERLONY .

##### 1.1 Fundamento .

La doble difusión en gel ,consiste básicamente en colocar una capa de gel fundido sobre una placa de vidrio o plástico ,se deja solidificar y se practican horadaciones en las que posteriormente se deposita el antígeno y el anticuerpo a estudiar .

A medida que el antígeno y anticuerpo difunden ,y siempre que las concentraciones sean equivalentes ,se producirá una banda de precipitación en el agar entre las dos cavidades ,comenzando en el punto en que el antígeno y el anticuerpo estén en proporción equivalente .

La velocidad de difusión de los reactivos es directamente proporcional a su concentración e inversamente proporcional a su peso molecular (27 , 24 ) .

##### 1.2 Equipo :

Bomba de vacío  
Cámara húmeda  
Balanza analítica .

##### 1.3 Material :

Horadores de 2.5 mm de diámetro .  
Capilares de 9 mm por 1 mm de diámetro interior .  
Placas de vidrio de 30 x 25 cm .  
Nivel de gote .  
Matraces Erlenmeyer de 250 ml .  
Probeta de 100 ml .  
Pipetas de 10 ml (1/10 ) .  
Trípí con tela de alambre .

Mechero .

Aplicadores de madera .

Plantilla para perforaciones .

Hisepos .

#### 1.4 Reactivos :

- Amortiguador de veronal pH 8.6,  $r/2 = 0.05$  :

Se disuelve el contenido de un frasco de amortiguador pH 8.6  $r/2 = 0.1$  (de fuente comercial) en un litro de agua destilada y se diluye 1:2 con agua destilada para tener una  $r/2 = 0.05$

- Agerosa al 1.5 % :

Se disuelven 1.5 g de agerosa en 50 ml de agua destilada colocando en un baño de agua hirviente, se agregan 50 ml del amortiguador de veronal pH 8.6 y se añaden 0.1 g de asida de sodio .

- Agar purum al 0.5 % :

Se disuelven 0.5 g de agar purum en 100 ml de agua destilada colocando en un baño de agua hirviente .

#### 1.5 Método :

##### 1.5.1 Preparación de las placas :

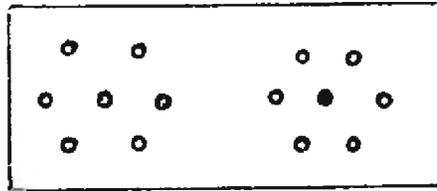
- Sellado de los portaobjetos :

Los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados ,se barnizan con agar purum al 0.5 % fundido y se deja solidificar a temperatura ambiente .

- Se colocan los portaobjetos sellados ,sobre una superficie perfectamente plana y nivelada .

- Se agregan 3 ml de agerosa al 1.5 % fundida y enfriada a  $80^{\circ}$  C se reparte uniformemente sobre cada portaobjetos de manera que quede una capa homogénea, se deja solidificar perfectamente el gel de agar y se colocan en refrigeración durante unos minutos .

- Se coloca la laminilla sobre la plantilla y con el horadador se practican los cortes circulares en forma de roseta; uno central y seis periféricos, con el escobecados se retira el gel de agar ( fig . 1 )



#### 1.5.2 Inmunodifusión :

- Con capilares diferentes, se colocan el antígeno en el pozo central y los sueros en los de la periferia, de manera que se llenen completamente, sin derremar su contenido .
- Se colocan las laminillas en cámaras húmedas y se dejan a temperatura ambiente durante 24-48 horas .
- Se hace la lectura y se registran los resultados .

#### 1.6 Interpretación :

- Se registran los resultados ; dibujando las bandas de precipitación que aparecen . Si es necesario , las laminillas pueden ser teñidas . ( ver pag. 64 ) .

La presencia de bandas de precipitación entre el antígeno y los sueros , se considera como una reacción positiva . La ausencia de bandas de precipitación entre el antígeno y los sueros , se considera como una reacción negativa . Cuando dos sueros colocados en pozos adyacentes reaccionan ante un antígeno determinado y producen líneas de precipitación que coinciden y se funden completamente , indica que ambos comparten los mismos anticuerpos .

(líneas de identidad fig .2 (A) .

Cuando dos sueros colocados en pozos adyacentes reaccionan ante un antígeno determinado , produciendo líneas de precipitación que



de cargas negativas sobre la superficie de agarosa, las cuales atraen iones de carga contraria ,haciendo que la capa de líquido que se encuentra estrechamente en contacto con la superficie del gel adquiera una carga neta opuesta .Al someter este sistema a un campo eléctrico ,se genera una fuerza eléctrica que actúa sobre este líquido cargado positivamente ( $H_3O^+$  ) ,el cual migra hacia el cátodo arrestrando a los anticuerpos cuya carga neta es muy pobre ,logrando así su migración hacia el antígeno .El antígeno debe tener predominio de carga negativa para lograr que migre hacia el polo (+ ) . El KEO se puede aumentar ,si se utilizan amortiguadores de distinta concentración iónica,siendo menor en el gel de agarosa (0.01 ) en comparación con el de la cámara de electroforesis (0.05) ( 19,20 ) .

## 2.2 Equipo :

Cámara de electroforesis .

Fuente de poder .

Bomba de vacío .

Cámara húmeda .

Balanza analítica .

## 2.3 Material :

Portaobjetos .

Hereditores de 2.5 mm de diámetro .

Capilares de 9.0 mm por 1.0 mm de diámetro interior .

Placas de vidrio común de 30x25 cm .

Probeta de 100 ml .

Pipetas de 10 ml (1/10 )

Papel Whatman No .1

Tripie con tela de alambre .

Mechero .

## 2.4 Reactivos :

- Amortiguador para la cámara de electroforesis pH 8.6  $r/2 = 0.05$

Se disuelve el contenido de un frasco de amortiguador de veronal -acetato para electroforesis pH 8.6 ,  $r/2 = 0.01$  (de fuente comercial) en un litro de agua destilada , se diluye 1:2 con agua destilada para tener una  $r/2 = 0.05$  .

- Amortiguador para la preparación del gel de agarosa :

A partir del amortiguador de pH 8.6 ,  $r/2 = 0.05$  se prepara el amortiguador para el gel, diluyendolo en la proporción de 1:5 con agua destilada , para tener una fuerza iónica de 0.01 .

- Agarosa al 1.5 % :

Se mezclan 1.5 g de agarosa y 100 ml de amortiguador de pH 8.6  $r/2 = 0.01$  , se calienta hasta ebullición en baño de agua , de manera que la solución esté completamente clara .

- Agar purum al 0.5 % :

Se disuelven 0.5 g de agar purum en 100 ml de agua destilada en un baño de agua a ebullición , hasta que la solución esté completamente clara .

## 2.5 Método :

### 2.5.1 Preparación de las placas :

- Sellado de los portaobjetos :

Los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados , se barnizan con el agar purum al 0.5 % fundido, dejandolo solidificar a temperatura ambiente .

- Se colocan los portaobjetos sellados , sobre una superficie perfectamente plana y nivelada .

- El gel de agarosa fundido se deja enfriar a aproximadamente  $80^{\circ} \text{C}$

y mediante una pipeta precalentada ,se colocan 3.0 ml en cada portaobjetos ,repartiendole uniformemente ,de manera que quede una capa homogénea,se deja solidificar perfectamente el gel de agar y se colocan en refrigeración durante unos minutos .

- Se perfora el gel con un horador conectado a un sistema de vacío utilizando una plantilla especial ,quedando como se muestra en la

fig. 3

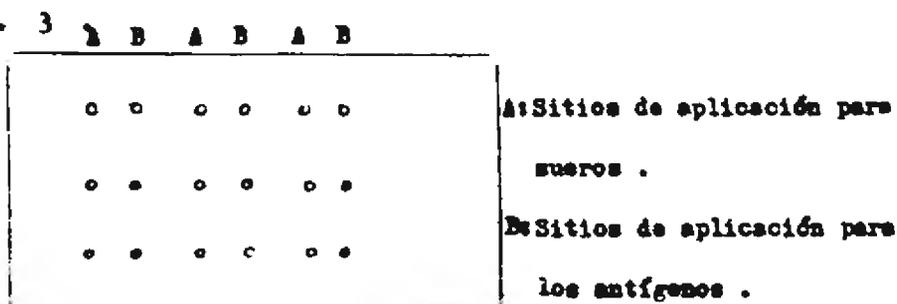


Fig . 3

### 2.5.2 Aplicación de los antígenos y de los sueros .

- Con capilares diferentes,se colocan los sueros a estudiar en cada uno de los pozos que corresponden a las filas A y los antígenos en los pozos de las filas B fig . 3 .
- Se colocan las placas en las cámaras de electroforesis ,de tal manera que los pozos conteniendo los antígenos quedan en el lado del cátodo y los sueros en el del ánodo .
- Las condiciones del corrimiento electroforético son:
  - a) Amortiguador para la cámara de electroforesis pH 8.6 , $r/2=0.05$
  - b) Voltaje 130-160 V .
  - c) Potencial 4 -5 V/cm .
- El contacto entre el amortiguador de la cámara de electroforesis y la placa del gel de agar se establece mediante tiras de papel filtro Whatman No . 1 .
- Se deja correr durante 45 - 90 minutos .

### 2.6 Interpretación :

- Se registran el número y características de las bandas de precipitación que aparecen para los diferentes antígenos.
- La presencia de bandas de precipitación entre los antígenos y los sueros ,se considera como reacción positiva .La ausencia de bandas de precipitación entre los antígenos y los sueros ,se considera negativa .
- Si es necesario ,las laminillas pueden ser teñidas con cualquiera de los colorantes para proteínas ( ver pag 64 ) .

### 3. INMUNOELECTROFORESIS (IEF) .

#### 3.1 Fundamento :

En esta técnica se combinan dos de las propiedades más importantes de los antígenos y anticuerpos ;su capacidad de movilización en un campo eléctrico (electroforesis ) y su capacidad de precipitar en un gel al reaccionar con su antígeno o anticuerpo específico.El método consiste en dos pasos :

primero las proteínas del antígeno se separan por electroforesis y subsecuentemente se les hace reaccionar con su correspondiente anticuerpo,con lo que resulta la formación de líneas de precipitación individuales en el sitio de reacción antígeno-anticuerpo .

En la IEF,se separan adecuadamente los diferentes componentes de una sustancia antigénica ; la migración de los antígenos y anticuerpos está influida por la carga ,tamaño y forma de la molécula, así como por su concentración ,fuerza iónica y pH del amortiguador empleado ;también intervienen,la temperatura,la viscosidad del medio y la intensidad del campo eléctrico ( 19,20 ) .

#### 3.2 Equipo :

Cámara de electroforesis .

Fuente de poder .

Balanza analítica .

Potenciómetro

Bomba de vacío.

Cámara húmeda .

### 3.3 Material :

Portaobjetos .

Horador de 2.5 mm de diámetro .

Cortador rectangular de 55 x 2 mm .

Papel Whatman No .1

Placas de vidrio común de 30 x 25 cm .

Nivel de gote .

Capilares de 9 x 1 mm de diámetro interior .

Aplicadores de madera .

Hisopos .

Mechero .

Tripie con tela de alambre .

Baño de agua .

Matraces Erlenmeyer de 250 ml .

Probeta graduada de 100 ml .

Pipetas de 10 ml (1/10) .

Plastilina .

Sacabocados .

### 3.4 Reactivos :

- Amortiguador para electroforesis pH 8.6 ,  $r/2 = 0.05$  :

Se disuelve el contenido de un frasco de amortiguador de veronal-acetato para electroforesis pH 8.6 ,  $r/2 = 0.1$  (de fuente comercial), en un litro de agua destilada , se diluye 1:2 con agua destilada para tener un  $r/2 = 0.05$  .

- Agarosa al 1.5 % .

Se disuelven 1.5 g de agarosa en 100 ml de amortiguador de pH 8.6

$r/2 = 0.05$  ,se calienta hasta ebullición en baño de agua ,de manera que la solución esté completamente clara .

- Agar purum al 0.5 % :

Se disuelven 0.5 g de agar purum en 100 ml de agua destilada en un baño de agua a ebullición ,hasta que la solución esté completamente clara .

- Solución acuosa de azul de bromofenol al 0.05 % :

Se disuelven 0.05 g de azul de bromofenol en 100 ml de agua destilada .

### 3.5 Método :

#### 3.5.1 Preparación de las placas :

- Sellado de los portaobjetos :

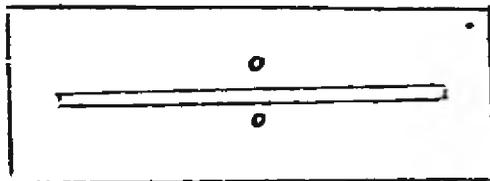
Los portaobjetos perfectamente limpios y desengrasados ,se barnizan mediante un hisopo con agar purum fundido y se deja solidificar a temperatura ambiente .

- Se colocan los portaobjetos sellados sobre una superficie plana y nivelada .

- El gel de agarosa al 1.5 % fundido se deja enfriar aproximadamente a  $80^{\circ}$  C y mediante una pipeta precalentada ,se colocan 3 ml en cada portaobjetos ,repartiendola uniformemente ,de manera que queden en una capa homogénea ,se deja solidificar perfectamente el gel de agar y se colocan en refrigeración durante unos minutos .

- Se colocan las laminillas sobre la plantilla especial ,con el horadador ,se practican los cortes circulares y con el cortador rectangular se hacen los cortes de los canales como se indica en la fig. 4 .

Fig . 4



- Al hacer los cortes con el sacabocados ,se retira únicamente el gel de agar de los dos cortes circulares .

### 3.5.2 Corrimiento electroforético :

- Se colocan los antígenos en estudio en los pozos centrales y una gota de azul de bromofenol en un pozo lateral .
- Se llenan con amortiguador para electroforesis los compartimientos de la cámara .
- Se deposita la laminilla en la cámara de electroforesis ,colocando adecuadamente los puentes de papel filtro Whatman No 1 .
- Se tapa la cámara de electroforesis ,se conecta la fuente de poder y se deja correr durante 90 a 120 minutos de 130-160 V .El corriente puede suspenderse cuando la mancha del colorante ha llegado al otro extremo .

### 3.5.3 Inmuno-difusión (precipitación con anticuerpos ) :

- Se retira la placa de la cámara de electroforesis y se coloca en una cámara de humedad .
- Se quita el agar del canal .
- Mediante capilares,se deposita el suero hiperinmune correspondiente repartiéndolo uniformemente por todo el canal .
- Se deja difundir de 24 a 48 horas para que se lleve a cabo la inmuno precipitación .

### 3.6 Interpretación :

- Se registran los resultados ,observando las laminillas con luz in directa para apreciar mejor los arcos de precipitación ,Si es ne cesario ,se puede teñir con cualquier colorante para proteínas (ver pag. 64) .
- Se determina el número de componentes antigénicos,que están repre sentados por cada una de las bandas de inmunoprecipitado que se observan .

#### 4. TECNICA DE COLORACION

##### 4.1 Fundamento :

Se basa en la capacidad que tienen las proteínas para captar colores como son el rojo de tiazina , el negro de anido, el rojo de Ponceau y el azul brillante de coomassie (24) .

##### 4.2 Equipo :

Agitador de Boherner .

Balanza analítica .

##### 4.3 Material :

Probeta de 100 ml .

Cajas de coplin .

Papel filtro de poro grueso .

Matras volumétrico de un litro .

Matraces Erlenmeyer de un litro .

##### 4.4 Reactivos :

- Citrato trisódico al 5 % :

Se disuelven 50 g de citrato de sodio en un litro de agua destilada .

- Solución de Sørensen pH 7.2 .

Solución A : Fosfato de sodio dibásico 0.15 mol/litro :

Se disuelven 21.3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en aproximadamente 500 ml de agua destilada en un matras volumétrico y se afora a un litro .

Solución B : Fosfato de potasio monobásico 0.15 mol/litros

Se disuelven 20.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en aproximadamente 500 ml de agua destilada en un matras volumétrico y se afora a un litro .

Solución salina isotónica (0.85 % ) :

Se disuelven 8.5 g de NaCl en aproximadamente 500 ml de agua destilada en un matraz volumétrico y se afora a un litro .

Se mezclan partes iguales de las soluciones A y B y se hace una dilución 1:20 con solución salina isotónica (0.85 %).

- Solución de ácido acético al 1 % .
- Colorantes que se pueden usar para la tinción :
  - Rojo de tiazina al 0.3 % en ácido acético al 1 % .
  - Negro de anido 10 B al 0.2 % en ácido acético al 1 % .
  - Rojo de Ponceau al 0.2 % en ácido acético al 1 % .
- Glicerol al 1.5 % en ácido acético al 1 % .

#### 4.5 Método :

##### 4.5.1 Eliminación de precipitados inespecíficos y de las proteínas que más reaccionan .

- Se sumergen las placas en citrato triacético al 5 % durante 20 minutos .
- Se lavan las laminillas con agua destilada y se cubren con tiras de papel filtro humedecidas ,evitando que queden burbujas .
- Se deja secar a temperatura ambiente de 24 a 48 horas .
- Se quita el papel filtro y se sumergen las laminillas en la solución de Sörensen ,y se colocan en el agitador de Bohmer por 3-4 horas haciendo varios cambios de la solución .
- Se lava con agua destilada durante 10 minutos .

##### 4.5.2 Decoloración .

- Se escurre el colorante y se sumergen las laminillas en solución de ácido acético al 1 % durante 30 a 40 minutos ,haciendo varios cambios ,hasta que el gel de agar quede incoloro y solamente las bandas de precipitación teñidas .

##### 4.5.3 Fijación :

- Se sumergen las laminillas en glicerol al 1.5 % en ácido acético al 1 % durante 15 minutos y se deja secar a temperatura ambiente .
- Se requiere conservar las placas por mucho tiempo ,se pueden

sellar con una capa de barniz transparente después de que éstas han secado perfectamente .

## 5. HEMAGLUTINACION INDIRECTA (HI) .MICROTECNICA .

### 5.1 Fundamento :

La hemaglutinación indirecta o pasiva (HI), es una técnica para la identificación de antígenos y la semicuantificación de anticuerpos , en la que los glóbulos rojos de carnero e humane tipo "O" , se utilizan como soporte para fijar a su superficie casi todos los polisacáridos y ciertas proteínas antigénicas, cualidad que se incrementa cuando los eritrocitos son tratados con sustancias tales como el ácido tánico mediante unión por atracción electrostática , o bien por unión covalente del antígeno proteínico , usando por ejemplo glutaraldehído y presentándose la aglutinación cuando se ponen en contacto con inmunoglobulinas específicas . Para semicuantificar las inmunoglobulinas contenidas en una muestra se hacen reaccionar diluciones seriadas del suero con cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos sensibilizados con un antígeno específico , la dilución más alta del suero que determine una aglutinación clara, se considera como punto final de la reacción y presenta el título de anticuerpos .

Como algunos sueros humanos contienen anticuerpos heterófilos capaces de aglutinar eritrocitos de carnero, se debe incluir un control de los mismos eritrocitos tamizados sin sensibilizar . Si existe aglutinación , la prueba se repite con el suero previamente adsorbido con eritrocitos de carnero tamizados (24,32)

### 5.2 Equipo :

Centrifuga clínica .

Baño de agua regulado a 56°C .

Baño de agua regulado a 37° C .

Agitador de Boherner .

### 5.3 Material :

Micropipetas de 0.05 y 0.025 ml .

Bilutores de 0.05 ml .

Placas de microtitulación fondo en " U " .

Tubos de centrifuga cónicos de 15 ml graduados .

Pipetas de 0.2 y 0.1 ml ( 1/100 ) .

Pipetas de 5 y 10 ml .

Pipetas capilares con bulbo .

Vasos de precipitados de 50, 100 y 200 ml .

Matraces Erlenmeyer de 50 y 125 ml .

Gradilla .

### 5.4 Reactivos :

- Solución anticoagulante de citrato de sodio al 3.8 % :

Se prepara una solución de citrato de sodio al 3.8 % disolviendo 3.8 g de citrato de sodio en 100 ml de agua destilada .

Se esteriliza en autoclave a 121 °C y 15 libras de presión , durante 15 minutos y se conserva en refrigeración .

- Solución concentrada de fosfato de sodio dibásico 0.15 mol/litro :

Se disuelven 21.3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en aproximadamente 500 ml de agua destilada en un matraz volumétrico y aforar a un litro .

- Solución concentrada de fosfato de potasio monobásico 0.15 mol/litro.

Se disuelven 20.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en aproximadamente 500 ml de agua destilada en un matraz volumétrico y aforar a un litro .

- Solución de cloruro de sodio 0.15 mol/litro .

Se disuelven 8.8 g de  $\text{NaCl}$  en aproximadamente 500 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de un litro y se afora .

- Solución salina amortiguada con fosfatos (SSAF), pH 7.2

r/2 = 0.015 :

Se mezclan las siguientes soluciones .

Sol.de NaCl 0.15 mol/litro 100.0 ml

Sol.de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.15 mol/litro 24.0 ml

Sol.de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 mol/litro 76.0 ml

- Solución salina amortiguada con fosfatos (SSAF), pH 6.4 .

r/2 = 0.15 :

Se mezclan las siguientes soluciones :

Sol. de NaCl 0.15 mol/litro 100.0 ml

Sol. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.15 mol/litro 32.3 ml

Sol. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.15 mol/litro 67.7 ml

Se ajusta el pH de los amortiguadores .

- Solución de ácido tánico 1:20,000 :

Se pesan 0.1 g de ácido tánico y se disuelven en 100 ml de SSAF

pH 7.2 (dilución 1:1 000 ) .

Para preparar la dilución 1:20,000 ,se toman 2 ml de la solución anterior y se agregan 38 ml de SSAF pH 7.2 .

- SSAF pH 7.2 adicionada del 1 % de suero normal de conejo .

## 5.5 Método :

### 5.5.1 Tamizado de los glóbulos rojos :

- Los glóbulos rojos ,se suspenden en citrato de sodio 3.8 % ,y se lavan tres veces con SSAF pH 7.2 ,centrifugando a 2 000 rpm durante 5 minutos .
- Se mide el paquete celular y se hace una suspensión al 2.5 % agregando 4 ml de SSAF pH 7.2 ,por cada 0.1 ml de paquete de glóbulos rojos .
- En un tubo de ensaye se toman 4 ml de la suspensión de eritrocitos al 2.5 % (procurando que la suspensión esté homogénea ) .
- Se agrega un volumen igual de ácido tánico 1:20 000 .
- Se incuba la mezcla en baño de agua a 37°C durante 15 minutos.

- Se centrifuga a 2 000 rpm durante 5 minutos ,se retira el sobrenadante con una pipeta capilar ,se resuspende en SSAP pH 7.2 y se vuelve a centrifugar durante 5 minutos .
- Se retira el sobrenadante y se resuspende el paquete de glóbulos rojos en 4 ml de SSAP pH 6.4 ,para tener nuevamente la suspensión al 2.5 % .

#### 5.5.2 Sensibilización de los eritrocitos con antígeno :

- Los glóbulos rojos tenizados se sensibilizan agregando un volumen igual de la dilución óptima de antígeno en SSAP pH 6.4 (tomar - 2 ml de la suspensión de células tenizadas al 2.5 % y agregar 2 ml de la dilución óptima de antígeno ) .
- Se guardan los otros 2 ml de células tenizadas .
- Se incuba la mezcla en baño de agua a 37<sup>o</sup>C durante 15 minutos .
- Se retiran las células del baño de agua y se centrifugan durante 5 minutos a 2 000 rpm .
- Se decanta el sobrenadante y se lavan las células dos veces por centrifugación a 2 000 rpm por 5 minutos con SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo .
- Se ajusta el paquete de células al 1.5 %,resuspendiendo en 3.3 ml de SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo .
- Los 2 ml de eritrocitos tenizados sin sensibilización ,se ajustan a una concentración de 1.5 % en SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo (centrifugar ,retirer el sobrenadante y agregar 3.3 ml de SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo ) .

#### 5.5.3 Formalización de los glóbulos rojos .

Cuando se requiere preparar mayores cantidades de eritrocitos sensibilizados para uso frecuente ,es posible preservarlos y estabilizarlos hasta por seis meses,si se tratan con formalina (formalización ),por alguna de las técnicas que se han descrito (32)

uno de estos métodos es el que a continuación se describe :

- A los glóbulos rojos sensibilizados y sin sensibilización se les adiciona lentamente ,gota a gota .1 ml de formalina al 40 % por cada 10 ml de suspensión (a cada uno de los - tubos se les agrega 0.2 ml de formalina al 40 % ) .
- Se deja reposar 18 horas a 4° C .
- Se agregan otros 0.2 ml de formalina al 40 % a cada uno de los tubos .
- Cuando las células han sedimentado (después de 2 ó 3 días ), se retira con SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo .
- Se agitan nuevamente las células y se añade una gota (0.05 ml ) de formalina al 40 % .

#### 5.5.4 Determinación de la concentración óptima del antígeno :

- Se preparen 4 diluciones del antígeno en SSAP pH 6.4 ,por ejemplo 1:20 ,1:40 ,1:80 y 1:160 .
- Se sensibilizan los glóbulos rojos con cada dilución de antígeno como se indicó anteriormente .
- Se prueba con un suero positivo y otro negativo ,cada una de las suspensiones de eritrocitos sensibilizados con las diferentes diluciones del antígeno .La más baja dilución del antígeno que proporcione el título mas elevado con el suero hiperinmune y no reaccione con el suero negativo ,se considerará el óptimo .

#### 5.5.5 Desarrollo de la prueba :

- Se inactiven los sueros problema a 56° C durante 30 minutos o a 63° C , 3 minutos .
- En todas las excepciones de la placa de microtitulación se agrega con una micropipeta 0.025 ml de SSAP pH 7.2 adicionada de suero normal de conejo .
- Se carga el microdilutor con 0.025 ml de suero problema y se coloca en el primer pozo ,se mezcla perfectamente y se trans

fieren 0.025 ml al pozo siguiente ,repetiendo este proceso hasta la última excavación de la hilera de donde se descuentan 0.025 ml .

- A cada dilución del suero ,se adiciona con una micropipeta 0.025 ml de la suspensión de glóbulos rojos al 1.5 %sensibilizados .
- Se coloca la placa en agitación durante 1 a 3 minutos .
- Se deja reposar la placa a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas .
- Se hace la lectura .

#### 5.5.6 Controles requeridos :

- Control del diluyente :

Se depositan 0.025 ml de SSAF adicionada del 1 % de suero normal de conejo en una hilera de pozos y se agrega 0.025 ml de la suspensión de células sensibilizadas al 1.5 % .En estos pozos no deberá observarse aglutinación .

- Control de sueros :

Se prueban las mismas diluciones del suero problema con eritrocitos sin sensibilizar para ver la presencia de anticuerpos heterófilo .

- Se hacen las mismas diluciones del suero control positivo y se agregan 0.025 ml de eritrocitos sensibilizados a cada una de las excavaciones .

- Se realiza la misma operación con un suero negativo conocido .

#### 5.6 Interpretación :

- La dilución más alta de suero que muestre una hemaglutinación clara,se considera como el punto final de la reacción y representa el título de anticuerpos .

- Se debe obtener en cada prueba un valor aproximado al título del suero control positivo y no debe haber reacción en ninguno de los pozos con el suero control negativo .
- Las diluciones del suero problema no deben presentar reacción de aglutinación con los eritrocitos sin sensibilizar .
- Si existe aglutinación , la prueba se repite con el suero previamente adsorbido con eritrocitos de carnero sin sensibilizar .

## B I B L I O G R A F I A

1. Tay, J.; Salazar-Schettino, P.M; Haro, I. de & Bucio .M.I.  
Frecuencia de las helmintiasis intestinales en  
México. Rev. Inv. Salud Pública (México) 36 : 241 (1976)
2. Alverez Chacón R. y cols. Investigación de la posibi  
lidad de parasitosis cruzada entre humanos y porcinos,  
por una variedad común de *Ascaris* .  
Bol. Med. Hosp. Inf. 6 : 963 (1973) .
3. Biagi, F.F. Apreciación de la importancia económica de las  
helmintiasis intestinales .  
Prensa, Med, Mex., 11-12 : 346 ( 1963 ) .
4. Martuchelli, Q.A. Frecuencia de las parasitosis intes  
tinales en niños de la República Mexicana .  
Rev. Mex. Ped., 4 : 111 (1967) .
5. Biagu, F.F. Observaciones sobre 88 casos de complicaciones  
quirúrgicas de las ascariasis .  
Bol. Med. Hosp. Inf . 4 : 447 (1962) .
6. Faust, E.C, P.F. Russell . Craig and Faust's Clinical Parasitology.  
6a ed. Lea & Febiger . Philadelphia, 1978 (1957) .
7. Taffs, L.F. The in vitro action of immune pig serum on  
second - and third - stage *Ascaris suum* larvae.  
*Parasitology* .51 : 327 (1960) .
8. Guerrero, Silverman, H. *Ascaris suum*: Immune reaction in mice .  
1. larval metabolic and somatic antigens, *Exp. Parasit.* 26 : 272 (1969).

9. Jung, R.C., Dupuy, H.J., DE Witt, C.W. Hemagglutination -  
-inhibition test for the evaluation of the antigeni-  
city of ascaris fractions. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 4 : 526 (1969).
10. Martuchelli, Q.A . Frecuencia de las parasitosis intes-  
tinales en México .*Rev.Med.Hoap.Grel.(Mex)*, 8 : 579 (1960) .
11. Thompson, and Adriane . Isolation of a heme protein  
antigen from *Ascaris suum* .*Biochim.Biophys.Acta* ,  
271 : 225 (1972) .
12. Sato, Y . Applications of the immunoadsorbent to the puri-  
fication and preparation of specific antigens for immuno  
logical reactions in helminth infections.  
*Acta.Med. Biol.* 2 : 109 (1975 )
13. Ziprin, Jenka, E.L. Humoral factors effecting mouse peritoneal  
cell adherence reactions to *Ascaris suum* .  
*Am.Soc.Microbiol.* 3 : 499 ( 1975 ) .
14. Bindsell, E. Immunity to *Ascaris suum*. Investigations of the  
fate of larvae in immune and non-immune mice .*Acta.Path.Micro*  
biol .Scand. 77: 223 ( 1969 ) .
15. Imperato, S., Foresi, C., Martinetto, P. Comparative analysis of  
antigenic constitutions of *Ascaris lumbricoides* var.Hominis  
and var.suum . *Riv.Ist.Sierotiv Ital.* 43: 235 ( 1968 ) .
16. Bird, P. Further observations on the structure of nematode -  
cuticle . *Parasit.* 48 : 32 ( 1957 ) .
17. Lee, D.L. The physiology of nematodes .1<sup>st</sup> ed. Philadelphia :  
1-25 (1965) .

18. Fuchs, S., Harrington, P. Immunological properties of ascaris cuticle collagen. *Biochim. Biophys. Acta.* 221 : 119 (1970) .
19. Tay, J., Velasco, O. Apuntes de Parasitología para Estudiantes de Medicina . México ,1972 .
20. Sprent, J.F.A. The life cycle of nematodes in the family - ascarididae blanchard. *J. Parasit.* 6 : 608 ( 1953 ) .
21. Sprent, J.F.A. On the migratory behavior of the larvae of - various ascaris species in white mice. *J. of Inf. Dis.* 90:165 (1952).
22. Sprent, J.F.A. On the toxic and allergic manifestations produced by the tissues and fluids of Ascaris . II.-Effect of different tissues. *J. Infect. Dis.* 84 : 221 ( 1949 ) .
23. Sprent, J.F.A. On the toxic and allergic manifestation caused by the tissues and fluids of ascaris . II.-Effect of different chemical fractions on worm-free , infected and sensitized guinea pigs. *J. Infect. Dis.* . 86 : 146 (1950) .
24. Kabat, E.A. y Mayer, M.M. Imunología Experimental, 2 da ed . Editorial .La Prensa Médica Mexicana . México (1968) .
25. Jaskoeki, J., Benedict, V., Colacci, A. In vitro hatching of ascaris worm eggs. *Am. Microscopic Soc.* 83 : 294 (1964) .
26. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., y Andell, R; Protein - measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265 ( 1951 ) .
27. Ouchterlony, M.P. Diffusion in gel methods for immunological - analysis . *Prog. allerg . Bas* . 5 : 1,78 ( 1958 ) .
28. Lopez, M.R. Estudio sobre la helmintiasis como causante de eosinofilia elevada, Tesis recepcional. U.N.A.M. Fac. de Medicina .

29. Roitt, J.M. : Essential Immunology .Blackwell Scientific Publications. 2a. ed. 260 .( 1975 ) .
30. Facultad de Química . U.N.A.M. Manual de ejercicios de laboratorio ,Inmunología aplicada . ( 1980 ) .
31. Melcher, L.R. An antigenic analysis of *Trichinella spiralis*. J.Infec.Dis. 73 : 31 . ( 1943 ) .
32. Clarke, D.H., and Casals, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination -inhibition with arthropod -borne viruses. Am.J.Trop.Med.Hyg. 7 :561 . ( 1958 ) .
33. Facultad de Medicina .U.N.A.M. Apuntes de parasitología para estudiantes de Medicina (1975) .
34. Ambler, J., Miller, J, J.N., Johnson, P. and Orr, T. Characterization of an allergen extracted from *Aecaris sumi* .Determination of the molecular weight, isoelectric point, amino acid and carbohydrate content of the native allergen . Immunoch. 10:815 (1972).
35. Turk, J.L. Inmunología en Medicina Clínica .1a ed. Ed. Manual Moderno ,S.A. México .66 (1972) .