

TECNICA DE PREPARACION DEL SEGUNDO ESTADIO LARVARIO DEL TOXOCARA CANIS

Por
Margarita ESTRIBI JARQUIN*
(de Caracas - Venezuela)

RESUMEN EN ESPAÑOL: Se describe el método modificado de Olson y Jones, de Saveigny para la obtención del Segundo Estadio Larvario del Toxocara Canis in vitro. Se puede obtener un número importante de larvas sin alteración de ellas y se enfatiza la necesidad de continuar los estudios en animales de experimentación.

Agradezco la colaboración de Norma F. Weatherly y Denise M. Sailstad del Departamento de Parasitología de la Universidad de Carolina del Norte. Chapel Hill. U.S.A., donde este trabajo fue realizado.

RÉSUMÉ FRANÇAIS: On décrit la méthode modifiée de Olson et Jones, de Saveigny, pour obtenir la seconde phase larvaire du Toxocara Canis in vitro. On peut obtenir un nombre important de larves sans aucune altération de celles-ci, et il faut appuyer sur la nécessité de continuer les études avec les animaux expérimentaux.

Mes remerciements pour leur coopération à Norma F. Weatherly et à Denise M. Sailstad du Département de Parasitologie de l'Université de Caroline du Nord, Chapel Hill, Etats Unis, où ce travail a été effectué.

ENGLISH SUMMARY: The method described is that modified by Olson and Jones, of Saveigny, for obtaining the Second Larval Phase of Toxocara Canis in vitro. A considerable number of larvae can be obtained without their alteration and the need is stressed for continued studies with experimental animals.

My thanks for their co-operation go to Norma F. Weatherly and Denise M. Sailstad of the Department of Parasitology of the University of North Carolina, Chapel Hill, USA, where this work was carried out.

El *Toxocara Canis* (Werner, 1782) (1), el parásito más común de los perros, es capaz de infectar al hombre que ingiere huevos fértiles, siendo ésto más frecuente en niños que están en contacto con cachorros infestados o con tierra contaminada con los huevos de los nemátodos¹.

La enfermedad producida por la migración del Segundo Estadio Larvario a través del cuerpo es conocida como Larva Migrans Visceral (Beaver 1952)².

Existen dos principales formas de manifestación clínica: una visceral y otra ocular³.

TABLA I
MANIFESTACION CLINICA

L.M.V. Larva Migrans Visceral	
Edad Promedio	2 años Geofagia
Fiebre	
Tos	
Convulsiones	
Hepatomegalia	
Infiltración Pulmonar	
Eosinofilia crónica	

El ataque ocular (Wilder 1950)⁴ no es raro pero difiere en varios aspectos de los casos sistémicos^{1,3}.

TABLA 2

TOXOCARIASIS OCULAR
1.- Niños mayores
2.- No hay síntomas sistémicos
3.- La respuesta inmune es menor

Existen actualmente tres manifestaciones oculares de la Toxocariasis⁴.

- 1.- Endoftalmitis Crónica Difusa (Wilder 1950)⁴ Fig. 1.
- 2.- Granuloma retinal localizado en el polo posterior (Ashton 1960)⁴ Fig. 2.
- 3.- Retinitis Periférica. (Hogan 1965)⁴.

Aunque el ataque al segmento anterior es raro se han observado uveitis con hipopion, nódulos en el iris y se han visto larvas móviles en la cornea y en el cristalino⁵.

El diagnóstico de la enfermedad en humanos es difícil ya que el parásito no puede ser detectado en la sangre y en heces.

A pesar de existir exámenes serológicos más específicos como es la prueba ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), el diagnóstico definitivo es la identificación de la larva en los tejidos^{6,7}.

Debido a que se desconoce mucho sobre todos los aspectos de la infestación humana, se han utilizado muchos animales de experimentación (ratones, monos, ovejas, pollos, palomas, puercos, conejos) a los cuales se les ha administrado por vía oral, carotídea o intravítrea el 2^{do} estadio larvario de *Toxocara Canis* lográndose produ-

cir la enfermedad con sus manifestaciones semejantes a las de hombre obteniéndose así mayor información sobre esta enfermedad⁸.

OBJETIVOS:

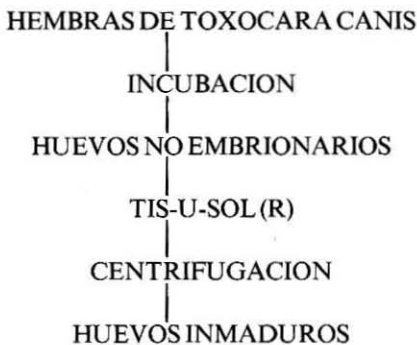
El objetivo de este trabajo fue la preparación del Segundo Estadio Larvario del *Toxocara Canis* para ser usado en animales de experimentación, libre de microorganismos e irritantes químicos.

MATERIAL Y METODOS:

Hembras adultas, grávidas de *Toxocara Canis* (Doble de tamaño del macho) fueron obtenidas del intestino delgado (yeyuno) de un cachorro infestado (detectado por un examen en fresco de la materia fecal previo enriquecimiento con un método de flotación) (Fig. 3).

Las hembras se depositaron en un capsula de Petri conteniendo Tis-u-sol^(R). Fueron dejadas toda la noche en una incubadora a 37° para depositar los huevos.

Los huevos no embrionarios fueron lavados en Tis-u-sol^(R) y colocados en un tubo de centrifugación donde se centrifugaron a una baja velocidad (800 xgr) por 2 ó 3 minutos para sedimentarlos. Se aspiró el fluido hasta pocos milímetros por encima de los huevos. (Esquema I).



Los huevos en un pequeño volumen de solución fueron divididos en 2 grupos.

A un grupo de huevos no embrionarios se les añadió una solución al 0.5% de formalina en Tis-u-sol^(R) (para retardar el crecimiento bacteriano) y fueron colocadas en una cápsula de Petri revestida con Siliclad^(R) (Clay Adams, Inc. New York) un compuesto de silicona soluble en agua con el propósito de prevenir así la adhesión y consecuente pérdida de los huevos.

Los del Grupo II se colocaron en una solución 50: 50 de hipoclorito de sodio y agua corriente (para remover moco y tejidos adheridos a ellos) permaneciendo en esa solución por 4 minutos luego se volvieron a centrifugar para ser sometidos a la formalina como los del otro grupo.

Para la embrionización las dos cápsulas de Petri conteniendo los huevos fueron dejadas a la temperatura del cuarto por 23 días y aireados con pipeta de Pasteur cada 2 ó 3 días. (Esquema 2)



Después de estos días de espera se observó con el microscopio que más del 50% de los huevos contenían el Segundo Estadio Larvario. (Fig. 4).



Fig. 1: Endoftalmitis Crónica Difusa.

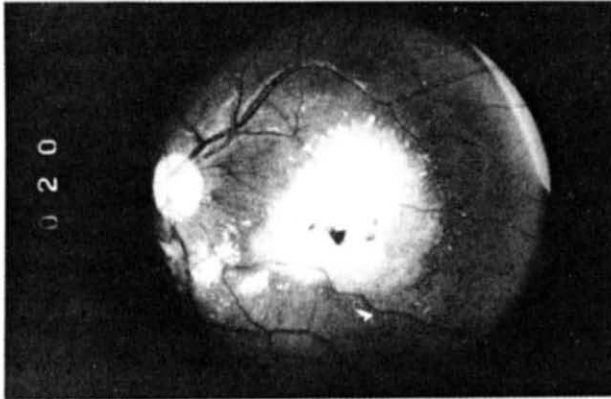


Fig. 2: Granuloma retinal localizado en el polo posterior.

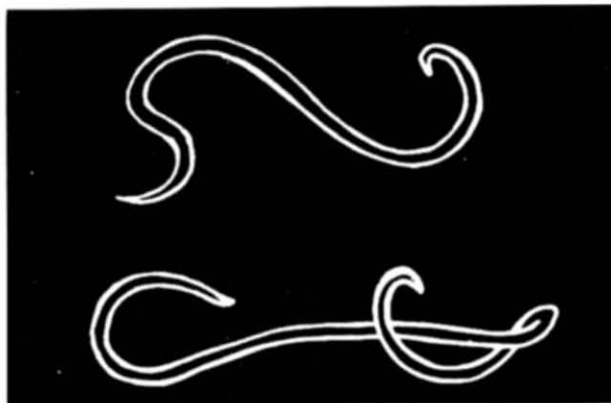


Fig. 3



Fig. 4: Huevos con el Segundo Estadio Larvario.

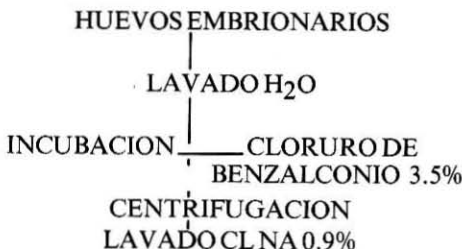
Los huevos embrionarios existían casi en igual proporción en las dos cápsulas de Petri por lo que se decidió reunirlos en un sólo grupo.

El Segundo Estadio Larvario fue obtenido por la incubación completa de los huevos embrionarios utilizando el método modificado de Olson y Jones, de Saveigny (1974)^{9, 10, 11, 12}.

Los huevos embrionarios fueron lavados y centrifugados sucesivamente en 2 oportunidades. Posteriormente se encubaron a 29° en una solución de 3.5% de cloruro de benzalconio por 15 minutos con agitación periódica y nuevamente centrifugados (800 x gr.) por 2 minutos y transferidos a tubos esteriles.

A partir de ese momento la técnica utilizada fue aséptica.

Los huevos se lavaron y centrifugaron por cuatro veces en una solución de cloruro de sodio al 0,9%. (Esquema 3).



Para dejar libre las larvas fue necesario romper la membrana que los recubre. Para esto se colocaron en un moedor de tejidos (Tissue grinder) y manualmente molidos en dos oportunidades.

Una gota de la solución se colocó entre lámina y laminilla y se observó a través del microscopio que las larvas estaban libres. (Fig. 5).

Estas larvas fueron puestas en una solución de Ringer conteniendo Penicilina (100 unit/ml y Estreptomocina 1.5 mgrs/ml).

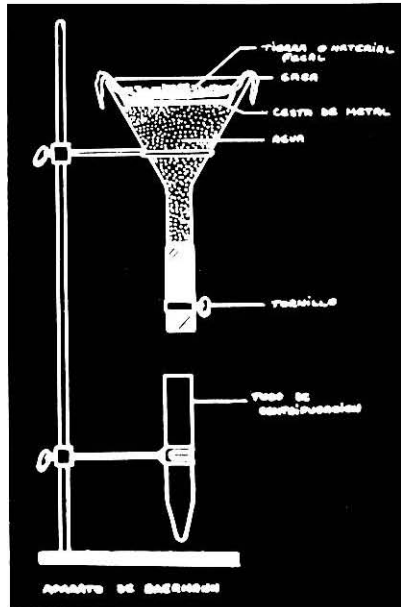
Las larvas fueron recuperadas utilizando el aparato de Baerman¹³. (Esquema 4).

La suspensión de las larvas fue dejada toda la noche en la solución de Ringer con antibióticos a 37° en el aparato de Baerman^{14, 15, 16} conteniendo 3 capas de gasa estéril a través de las cuales las larvas migraron y fueron coleccionadas en el otro lado el día siguiente.

Las larvas obtenidas se lavaron y centrifugaron con Ringer y ya estaban listas para ser usadas en animales de experimentación o en la preparación de antígenos¹⁷.



Fig. 5



Esquema 4

DISCUSION

No se sabe actualmente como la larva entra y sale del ojo, porque los tejidos oculares reaccionan deferente a la infestación, si la larva se queda para siempre en el ojo continua migrando fuera del ojo a otros tejidos y porque la larva tiene predilección por ciertas areas del ojo tales como es la retina periférica.

Debemos de ser conscientes que estas preguntas deben ser contestadas para tener

un mejor conocimiento de la patofisiología de la enfermedad especialmente en lo relacionado al ojo.

Es necesario seguir los estudios en animales de experimentación.

El método permite la obtención de las larvas sin aparente lesión de las mismas. Se trata más de una incubación mecánica donde no hay microorganismos ni materiales tóxicos.

BIBLIOGRAFIA

- 1- LUXENBERG, M.: An experimental approach to the study of intraocular *Toxocara Canis*. Tr. Am. Ophth. Soc. 77: 1979.
- 2- ZINKHAM H.: Visceral Larva Migrans. Am. J. Dis. Child. 132: 1978.
- 3- SCHANTS P., MEYER D. and GLICKMAN L. Clinical Serologic and Epidemiologic Characteristics of Ocular Toxocariasis. Am. J. Trop. Med. Hyg 28: 2-28, 1979.
- 4- FERGUSON EC III, OLSON L.J.: Toxocara Ocular nematodiasis. INT Ophthalmol Clin 7: 583-603, 1967.
- 5- CLICKMAN LT, SCHANTZ. P, CYPRESS R.: Canine And Human Toxocariasis Review of transmission, pathogenesis and clinical Disease. Journal of American Veterinary Medical Association. J.A.V.M.A. 175: 1979.
- 6- SCHIELDS. J.A., LERNER H.A. and FELBERG N.T.: Aqueous Cytology and Enzymes in nematode Endophthalmitis. Am. J. Ophth. Chicago 84: 319; 322, 1977.
- 7- GLICKMAN L., CYPRESS R., HILES. D. and GESSNER T.: Toxocara-Specific antibody in the serum and aqueous humor of a patient with presumed ocular and visceral toxocariasis. Am. J. Trop. Med. Hyg 28: 29-35, 1979.
- 8- HAYDEN. D.W and KRUININGEN. H.J.: Experimentally induced Canine Toxocariasis. Laboratory Examinations and Pathologic changes with emphasis on the gastrointestinal tract. Am. J. Vet. Res. 36: 1605-1614, 1975.
- 9- OLSON. L.J., JONES F.R.: Preparation of sterile *Toxocara Canis* Larvae. J. Parasitol 60: 941, 1974.
- 10- OSHIMA T.: Standardization of techniques of infecting mice with *Toxocara Canis* and observations on the normal migration routes of the larvae. J. Parasitol. 47: 652-656, 1961.
- 11- HASS. D.K. and TODD A.C.: Extension of a technique for hatching ascarid eggs in vitro. Am. J. Vet. Res. 1962.
- 12- GREVE. J.H.: Age resistance to *Toxocara Canis* in ascarid-free dogs Am. J. Vet. Res. 32:, 1971.
- 13- HOGARTH. SCOTT R.S.: Visceral Larva Migrans.- An immunofluorescent Examination of rabbit and human Sera for antibodies to the ES antigens of the second Stage Larvae of *Toxocara Canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris Leonina*. (Nemátoda. Immunology. 10: 217, 1966.
- 14- COLLINS R.F., IVERY M.H.: Specificity and sensitivity of Skin test reactions to extracts of *Toxocara Canis* and *Ascaris Suum*.
I Skin tests done on infected Guinea Pigs. Am. J. Trop. Med Hyg 24: 455-459, 1975.
- 15- ROCKEY. J. DONNETLY J. STROMBERG B and SOULSBY E.J.L.: Immunopathology of *Toxocara Canis* and *Ascaris Suum* infections of the eye. The role of the eosinophil. Invest Ophthalmol Visual S.O. 18: 1979.
- 16- WARD. L.: Host response in the *Toxocara Canis*-Wite mouse model. Comunicación personal. University of North Carolina. Chapel Hill, 1981.
- 17- QUINN. R., SMITH V., BRUCH R.G. And Girdwood R.W.: Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris* SPP ova in the environmet.
I.A. comparison of flotation procedures for recovering *Toxocara* SPP ova from soil. I. Hyg Camb 84: 83, 1980.

* Dra. Margarita ESTRIBI. Apdo 29003. Caracas 1021 A. Vezuela