

## La Sero-Floculación Palúdica

El serodiagnóstico en el paludismo ha dado lugar a numerosos trabajos encaminados a completar los procedimientos de diagnóstico bacteriológico, fundados únicamente en la investigación del parásito.

Aparte de las investigaciones tales como las de Lo Monaco y Panichi (aglutinación de hemáties de enfermos palúdicos o de individuos sanos por el suero palúdico ti 1/5). Abrami y Senevet, con el fenómeno de la schizontólisis, etc., son de notar sobre

todo los notables trabajos que se esforzaron en llevar a la práctica *del* diagnóstico de paludismo los principios de la reacción de desviación del complemento, valiéndose de antígenos variables, según los autores; así DeBlasi empleaba sangre de palúdicos rica en parásitos, H. Horowitz Wlassova utilizaba placentas de enfermas con abundantes hematozoarios, **Savtchecko** y Boronoff servíanse de un antígeno extraído de hígado palustre, y Gordon Thomson empleó en 1917

el tratamiento del paludismo en sus formas asexuales.

### REFERENCIAS

1.—Cordes, W., and de la **Torre**, T.: First Experiences with Atebrine, a New Antimalaricum. United Fruit Co., Medical Department, Twentieth Annual Report, 1931, page 51.

2.—Baber, M. A, Komp, W. H. W., y Newman, B. M.: Observations and Experiments in the Panamá División of the United Fruit Co., with Special Reference to Certain Measures for the Control of Malaria. United Fruit Co., Medical Department, Seven-

teenth Annual Report, 1928, page 34.

3.—Whitmore, E. R.: **The** Place of Plasmochine in Malaria Control. United Fruit Co., Medical Department, Eighteenth Annual Report, 1929, page 30.

4.—Thonnard-Neumann, E. & Le Doux, H. A.: The Treatment of Malaria with Erion, (Atebrine) a New Synthetic Drug - Report of 75 cases. United Fruit Co., Medical Department, Twentieth Annual Report, 1931, page 57.

5.—Phelps, Bruce M., Jantzen, Walter: Clinical Experience with Atebrine, United Fruit Co., Medical Department, Twentieth Annual Report, 1931, page 69.

su antígeno, consistente en cultivos del hematozooario, según el método de Bass, sometidos a una preparación según técnica especial ( centrifugación, lavado con agua destilada para quitar la hemoglobina y disolución de la masa de parásitos restantes y leucocitos por medio de la sosa decinormal, y neutralización posterior con ácido clorhídrico en solución al mismo título).

Los resultados inconstantes, y sobre todo la gran dificultad en la preparación de dichos antígenos, hicieron que no entrasen en la práctica ordinaria los **resultados** de estas investigaciones.'

En este estado de cosas, el Dr. Henry, de Constantina (Argelia) , dio a conocer, en una comunicación presentada al *Congrés pour Vancement des sciences* de Constantina, en abril de 1927, un nuevo procedimiento de examen serológico del paludismo, establecido sobre el principio teórico de los endógenos, **cuyo** enunciado es como sigue:

Junto a los antígenos venidos del exterior del organismo (exantígenos y creadores de los anticuerpos) , debe reconocerse la existencia de otros antígenos nacidos en el mismo organismo a favor de diversos procesos infecciosos u otros, que por este he-

cho llamaremos endógenos, y que son a su vez capaces de producir sus anticuerpos correspondientes (antiendógenos). Según Henry, estos endógenos están representados en el caso de paludismo por el pigmento ocre y el pigmento melánico.

La reacción de Kenry consiste en objetivar por medio de una reacción de floculación la presencia de estos endógenos y entendiéndonos.

Para salvar la dificultad que presenta la obtención de los verdaderos pigmentos, el autor utiliza substancias cuya composición sea lo más aproximada posible a ellos; así se emplean dos sales de hierro en sustitución del pigmento ocre, y una melanina extraída de la coroides del buey en sustitución del pigmento melánico llamando a estos endógenos utilizados, endógenos mómologos o de sustitución.

No siendo aún completo el conocimiento del pigmento ocre desde el punto de vista químico, si bien se revela en él con facilidad el hierro por la reacción al ferrocianuro de potasio y al ácido clorhídrico por la formación de azul de prusia, vióse el autor obligado para establecer su endógeno de sustitución a estudiar diversas substancias a base de hierro (hierro coloidal complejo de hierro con los lipoides, sales orgánicas de hierro: peptonatos, cacodilatos, metilarseniatos, etc.), llegando al mejor resultado de floculación con el me-

tilarsinato y el albuminato de hierro, y en sustitución del pigmento melánico, la melanina citada.

Desde últimos del año pasado hemos puesto en práctica el estudio de esta reacción en los enfermos de los dispensarios antipalúdicos del delta del Ebro. Los resultados obtenidos hasta abril dieron lugar a una comunicación con el Dr. Torrademé al *Congreso Internacional del Paludismo* de Argen (mayo 1930) y en el Congreso de Médicos de Cataluña (junio 1930).

Hemos continuado después dicho estudio, que habíamos iniciado bajo las indicaciones y detalles de técnica que nos fueron dadas por el autor Dr. Henry y por el profesor Lebourdelles, a quien les hacemos constar desde aquí nuestro sincero agradecimiento.

Damos a continuación la técnica detallada para la práctica de dicha reacción, y luego los resultados obtenidos por nosotros,

I. *Preparación de los endógenos.*—Los endógenos empleados son tres: un metilarsinato de hierro y una melanina.

El primero se halla en el comercio en forma ya directamente utilizable, sin más que llevar la disolución al título necesario (metharfer Bouty).

El segundo (albuminato de hierro) se prepara de la manera siguiente:

Pesar un gramo de albuminato de hierro Merck, que se echa

en un matraz de vidrio neutro que contenga 600 c. c. de agua destilada; se calienta al baño María, agitando de vez en cuando. En veinticinco minutos las agujas están ya generalmente disueltas. Después se enfría y se completa hasta 600 c. c. Se filtra. Esta solución a 1/600 se reparte en ampollas de vidrio neutro, se esteriliza al autoclave cuatro días seguidos a vapor libre. Presenta entonces un aspecto ligeramente turbio, un poco coloidal. Estas ampollas, utilizables para la reacción, deben agitarse de vez en cuando. Hay que vigilar la alteración rápida posible de las soluciones mal esterilizadas o de las ampollas abiertas. El enturbiamiento, apenas sensible, de las soluciones estériles, es fácil de distinguir del enturbiamiento de las soluciones alteradas. Antes de abrir las ampollas, agitar cuidadosamente para poner en suspensión el ligero sedimento formado. Es preferible tener pequeñas ampollas de reactivo, para emplear una para cada reacción.

Para la reacción la solución madre se diluye a 1/4.800 y a 1/6.000.

El tercero, la melanina, se obtiene, como hemos dicho, de la coroides del buey: se elimina el cristalino, se raspa la coroides y se recoge líquido gelatinoso y melanina. Se mezcla y se añade al magma dos veces su volumen de agua destilada, y se tritura bien con la mano aceptizada. Se le añade luego formol en canti-

dad de 1200; es posible que precipiten algunas albúminas. A este efecto se espera diez minutos y se filtra a través de algodón de vidrio. El filtrado negruzco se centrifuga en zinc durante ocho minutos a 4.000 vueltas, en grandes tubos de centrifuga estériles. El líquido negruzco que sobrenada es decantado, recogido, en recipientes estériles y conservado en la hielera. Si los recipientes se agitan fuertemente, una vez al menos por semana, la melanina se mantiene en suspensión fina, muy utilizable después de la dilución conveniente. Conviene no utilizar la melanina recientemente preparada; es mejor esperar un mes, en razón de las modificaciones de opacidad sucesivas que sobrevienen para una dilución dada de la emulsión madre. Después de un mes los cambios eventuales son poco importantes. Para la reacción macroscópica, diluir la emulsión madre hasta una opacidad correspondiente a la de un tubo marcado 0,20 gr. de una escala albuminométrica.

Esta constituye la emulsión A. La emulsión B se obtiene diluyendo a la mitad la emulsión A. La emulsión A se hace agua salada al 3 1.000.

II. *Dispositivo de la reacción.*—Tenemos, pues, tres antígenos (endógenos), que son el metilarisato de hierro, el albúminato de hierro y la melanina. Los dos primeros constituyen en la técnica la ferrofloculación, y la melanina la melanofloculación.

En el tiempo que podríamos llamar de prerreacción se preparan las diluciones a utilizar partiendo de la dilución madre en que se conserven. Tendremos así que preparar las diluciones, siguientes:

Dilución de metilarsinato al 1 por 450.			
—	de	—	de al 1 por 4.800 (en agua destilada).
—	de	—	de al 1 por 6.000 (en idem id)
—	de	—	de al 1 por 4.800 (en idem salada al 1 por 1.000).
—	de	—	de melanina, solución A
—	de	—	de B
—	de	—	de A'

A estos grados de diluciones óptimas se llega, previa titulación, cada vez que preparamos albuminato o melanina en cantidad suficiente para largo tiempo.

Se disponen en dos gradillas con seis tubos de hemolisis en cada uno, perfectamente limpios (nosotros hemos empleado siempre material esterilizado, aunque esta condición no es precisa). Se ponen en cada tubo 0,2 de c. c. de suero den enfermo, más 1 c. c. de la solución del endógeno, según indicamos en los cuadros adjuntos.

Tanto la ferrofloculación como la 'melanofloculación constan de dos partes, que "se llevan a cabo simultáneamente: una, reacción en agua destilada, o sea

que las diluciones de los endógenos han sido hechas con agua destilada y el tubo tiene suero y agua destilada, y la otra, reacción es en agua salada, al 111.000 en la ferrofloculación y al 3 y medio por 1.000 en la melanofloculación. Obliga a ello el hecho de que algunos sueros floculen espontáneamente en agua destilada (fenómenos de autofloculación), mientras que esta autofloculación no se da con el agua salada. Así pues, en los casos en que el tubo control con agua destilada (núm. 4) flocule, no se tiene en cuenta para nada los cuatro primeros tubos, y da el resultado únicamente la lectura de los tubos con agua salada números 5 y 6.

I. FERROFLOCULACION CANTIDADES EN DÉCIMAS DE C. C.

REACTIVOS	Reacción en agua destilada				Reacción en agua salada	
	Tubos reacción			Testigo	Reión.	Testigo
	Núm. 1	Núm. 2	Núm. 3	Núm. 4	Núm. 5	Núm. 6
Suero . . . . .	2	2	3	2	2	2
Melanina, dilución A. . . . .	10					
Melanina, dilución B. . . . .		10				
Melanina, dilución B. . . . .			9			
Agua bidestilada (testigo) . . . . .				10		
Melanina, dilución A. . . . .					10	
Agua salada al 3'5 + 1.00 (testigo)..						10

II. MELANOFLOCULACION CANTIDADES EN DÉCIMAS DE C. C.

REACTIVOS	Reacción en agua destilada				Reacción en agua salada	
	Tubos reacción			Testigo	Reión.	Testigo
	Núm. 1	Núm. 2	Núm. 3	Núm. 4	Núm. 5	Núm. 6
Suero . . . . .	2	2	2	2	2	2
Metharfez a 1/450 en agua destilada	10	10	10			
Albuminato de hierro a 1/4.800 . . . . .						
Albuminato de hierro a 1/6.000 . . . . .				10		
Agua destilada . . . . .						
Albuminato de hierro a 1/4.800 en agua salada a 1/1.000 . . . . .					10	
Agua salada a 1/1.000 . . . . .						10

Después de la repartición se agitan convenientemente los tubos y son llevados a la estufa a 37° durante una hora y media, y se dejan luego media hora a la temperatura del laboratorio antes de la lectura defíní V. va; esto en cuanto a la ferro-reacción; los tubos de la melano-reacción deben dejarse a la estufa 2,45

horas, más 15 minutos, a la temperatura del laboratorio.

Así, pues, según las indicaciones del autor hay que hacer la lectura dos horas después de la repartición para la ferrofloculación, y tres horas después para la melanofloculación. Se observa entonces en los tubos positivos un precipitado en el fon-

do del tubo, que puede ponerse en suspensión invirtiendo los tubos suavemente dos veces. Nosotros hemos preferido observar los tubos cada quince o treinta minutos, con objeto no sólo de ver cuándo aparece la floculación, sino el observarla mejor antes de que se deposite todo el floculado en el fondo del tubo; cuando la floculación es neta se observa macroscópicamente un aspecto inconfundible como de copos de nieve o de agua jabonosa. Así 'hemos podido observar *que* en muchos sueros la floculación es precoz, siendo ya intensamente positiva a los quince o treinta minutos.

De todos modos, no hemos dejado nunca de hacer la lectura definitiva después del tiempo indicado por el autor. Dicha lectura puede hacerse ya a simple vista o ya con la ayuda de la lupa o del aglutinoscopio. Henry y otros han aplicado a este método la fotometría de Vernes; no damos detalles de esta técnica, por no tener aún casuística propia.

La pequeña maniobra de invertir suavemente dos veces los tubos antes de la lectura es necesaria, sobre todo en los tubos de melanina, porque ciertos sueros favorecen la sedimentación de la melanina, y esta operación, practicada sin sacudida alguna, suprime la sedimentación y respeta la floculación verdadera.

Huelga decir que es preciso que el suero sea lo más limpio posible. Conviene hacer la extracción

de sangre en ayunas, y practicar la reacción veinticuatro horas después. Nosotros hemos practicado en general la extracción por punción venosa, y en algunos casos por ventosa escarificada (niños de poca edad).

x x x

Hemos practicado la serofloculación de Henry en 134 sujetos. En algunos de ellos la reacción se repitió varias veces, de donde un total de ellas de 145.

Dividiremos estos 134 casos por grupos, para resumir la exposición:

*Grupo 1.*—Individuos no palúdicos, sin antecedentes palúdicos, habitantes de una comarca no palúdica situada a unos 100 kilómetros del Delta: 30 casos. La reacción ha sido negativa en todos ellos.

*Grupo 2.*—Enfermos con paludismo en evolución y con antecedentes palúdicos cargados. Presencia de parásitos en sangre periférica. Extracción de sangre en período de apirexia.

Número de examinados, 36. La reacción ha sido netamente positiva en 35 y negativa en uno sólo, y aun en éste no se hizo más que la íerofloculación, y, como luego veremos, es más sensible y tiene más valor la melanorreación.

En dos de estos enfermos hemos practicado la reacción dos veces, la primera durante el acceso y la segunda después de él. En uno de ellos el resultado ha sido igualmente positivo las dos veces. Pero en el otro ha sido

abolida la reacción durante el acceso, y fuertemente positiva después, concordando en esto con lo observado por el autor, doctor Henry.

En uno de los casos citados no se encontró un parásito en el primer examen; pero habiendo sido positiva la reacción de Henry, volvióse a investigar al día siguiente, y se encontraron algunos.

*Grupo 3.*—Enfermos con bazo palpable. Número de enfermos, 14, 11 con parásitos en sangre periférica y tres sin ellos. La reacción ha sido positiva en 12, negativa en uno y ligeramente positiva en otro.

*Grupo 4.*—Enfermos con antecedentes palúdicos lejanos, cuyas manifestaciones palúdicas se remontan a varios años (de tres a veintitrés o más de la fecha actual), sin esplenomegalia o con esplenomegalia ligera y observados, 30.

Veintidós de ellos han presentado la reacción negativa; pero los otros ocho han dado una reacción netamente positiva, con todo y haber transcurrido de diez y veinte años y más desde su última manifestación clínica palúdica. Estos ocho enfermos son los que tienen antecedentes palúdicos más cargados.

*Grupo 5.*—Entéranos con antecedentes palúdicos positivos, sin esplenomegalia, sin parásitos en sangre periférica y con buen estado de salud (mismas condiciones que el grupo anterior), pero cuyos antecedentes eran

más recientes (desde varios meses a tres años). Número de casos observados, 31.

Veinte de ellos positivos y 11 con reacción negativa (un número mayor, pues, de positivos en este grupo que en el anterior).

*Grupo 6.*—Enfermos inoculados con *Plasmodium vivax* (malaria terapia). Hemos de agradecer al generoso concurso de la ilustre dirección del *Instituto Pedro Mata*, de Reus, el haber podido estudiar siete enfermos paludizados con fines terapéuticos. En cuatro de ellos hemos practicado la reacción desde el primer caso, continuando practicándola en los siguientes con el fin de ver en qué (momento aparecía la reacción positiva en dichos sueros y la marcha que seguían. La inoculación había sido hecha por vía intramuscular (sangre de enfermo con *Plasmodium vivax*).

Enfermo número 1.—Incubación, siete días. La reacción fue netamente positiva después del segundo acceso, y continúa siéndolo después del tercer acceso.

Enfermo número 2.—Incubación, diez y seis días. La reacción fue ligeramente positiva después del primer acceso, fuerte después del segundo y más intensa después del tercero, manteniéndose así después del cuarto, sexto y séptimo.

Enfermo número 3.—Incubación, diez y nueve días. Netamente positivo después del primer acceso, y aumenta en inten-

sitiad después del segundo y tercer acceso.

Enfermo número 4.—**Incubación**, diez y nueve días. Positiva netamente después del primer acceso, y aumenta en intensidad después del segundo.

En otros tres enfermos paludizados por el mismo fin, y habiendo tenido 17, 15 y 15 accesos, respectivamente, hemos practicado la reacción después de tres meses de terminado el tratamiento. La reacción fue sólo ligeramente positiva.

Este mismo hecho se observó en otro enfermo, a quien practicada, la reacción por segunda vez después de dos meses de tratamiento, dio un resultado positivo mucho más débil.

Es evidente, pues, que el tratamiento influencia la reacción. Nos proponemos estudiarla bajo este aspecto, con objeto de ver su valor como control terapéutico.

*Resultados comparativos entre los tres tipos de reacción (Metharfer, albuminato y melanina)*

En 32 sueros la reacción a la melanina se ha mostrado más intensa, precoz y sensible que el Metharfer y el albuminato.

En siete casos la reacción a la melanina ha sido superior al Metharfer, pero igual al albuminato.

En siete casos se ha mostrado más intensa la reacción con el albuminato.

En tres casos se ha mostrado más intensa el Hetharfer que el albuminato, pero no superior a la melanina.

En los otros casos no ha habido diferencia notable.

En resumen, pues, la reacción a la melanina ha demostrado en general ser más intensa, más precoz y más sensible, debiendo, por tanto, ser preferida a los otros antígenos.

En la actualidad continuamos el estudio de la reacción de Henry en el laboratorio del Manicomio de hombres de Ciempozuelos. Aprovechando el material proporcionado por los enfermos inoculados experimentalmente de paludismo, nos proponemos estudiar más detenidamente todo lo que se refiere a fecha de aparición del poder floculante, la relaciones de la reacción de Henry con otros fenómenos de inmunidad y, principalmente, su relación con el S. R. E.