

Inv. Pesq.	33 (1)	Págs. 1-6	Enero 1969
------------	--------	-----------	------------

## Preparación de un cardioantígeno colestonizado de atún, *Thunnus thynnus* (L.) de la costa sudatlántica de España y su valor en el serodiagnóstico de la sífilis\*

por

MANUEL GUTIERREZ \*\*

Estimulados por un estudio de COSTA (1958-1959) y sin más referencias sobre la extracción de productos activos de corazón de peces, iniciamos unas investigaciones orientadas hacia el aprovechamiento industrial del corazón de atún de las almadrabas de España, obteniendo un cardioantígeno de músculo total, enriquecido con colesteroína. Proponemos, en principio, para dicha extracción un método fácil y económico, usando material corriente de laboratorio y reactivos de gran pureza.

El producto obtenido es homogéneo, de color amarillo, transparente, y no deja precipitados, aun después de un año de envasado y conservado a temperaturas variables entre 12 y 30°C, mostrándose después de este tiempo sensible en el serodiagnóstico de la sífilis. Puede proporcionar un margen comercial digno de tenerse en consideración. Designamos al cardioantígeno *T.t.(L.) 1966*, con las iniciales de la especie y el año de preparación.

Por no ser habituales las técnicas para realizar sistemáticamente reacciones de fijación del complemento ni tener disponibles sueros de enfermos en nuestro laboratorio del Instituto de Investigaciones Pesqueras, aparte de mayor garantía en las comprobaciones, enviamos unas muestras a la Dra. M. FAURE, Jefe del Servicio de Bioquímica de Antígenos del Instituto Pasteur de París, donde muy amablemente fueron estu-

\* Recibido para su publicación el 2-IX-67.

\*\* Laboratorio del Inst. Invest. Pesqueras. Puerto Pesquero. CÁDIZ.

diadas comparativamente con el cardiólípido denominado *B. W. n.º 19-67*, que responde a las normas preconizadas por la O. M. S. y siguiendo la técnica analítica de KOLMER. Los resultados de los experimentos, según comunicación personal de la Dra. M. FAURE, quedan resumidos por ella en las tablas I, II y III.

### MATERIAL Y MÉTODO

Las muestras de músculo cardíaco proceden de ejemplares de la almadraba de Barbate (Cádiz), costa sudatlántica de España, capturados en la fase denominada de «revés» correspondiente a la campaña de 1966, sin tener en cuenta el sexo y con una talla media de unos 220 cm aproximadamente.

Hay que procurar que toda la vidriería esté lavada con solución salina a unos 40°C, seguido de un abundante lavado con agua destilada, seca y esterilizada. No deben usarse materiales lavados con jabón, carbonato sódico ni antisépticos. Se pueden seguir varios métodos de extracción empleados habitualmente para corazón de buey, destacando entre otros los de BORDET-RUELENS, KOLMER, KOLMER modificado, COSTA y muy especialmente se puede ensayar el método rápido de FAURE.

Después de nuestra experiencia, recomendamos inicialmente, por su sencillez, el siguiente método de extracción y preparación del cardioantígeno de atún.

TABLA I

Dosificación comparativa de la muestra [*T. t. (L.) 1966*] de antígeno recibida y del antígeno *B. W. n.º 19-67* en relación con diferentes diluciones de sueros positivos.

DILUCIONES DEL ANTÍGENO	DILUCIONES DE LA MEZCLA DE LOS SUEROS							
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0
<i>B. W. n.º 19-67</i>								
1/200 . . . .	4+	4+	4+	4+	4+	4+	+	—
1/400 . . . .	4+	4+	4+	4+	4+	4+	+	—
1/800 . . . .	3+	2+	3+	3+	4+	4+	2+	—
1/1600 . . . .	±	—	—	—	—	—	—	—
<i>Muestra</i>								
1/400 . . . .	4+	4+	4+	4+	2+	—	—	—
1/800 . . . .	4+	4+	4+	4+	2+	—	—	—
1/1600 . . . .	4+	4+	4+	4+	+	—	—	—
1/3200 . . . .	3+	2+	2+	+	—	—	—	—
0 . . . . .	±	—	—	—	—	—	—	—

TABLA II

Ensayos comparativos del antígeno *B. W. n.º 19-67* al 1/200 y de la *muestra* recibida [*T. t. (L.) 1966*] al 1/400 en relación con diferentes diluciones de sueros positivos.

SUEROS	ANTÍGENOS	DILUCIONES DE LOS SUEROS							
		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	0
1	<i>B. W. n.º 19-67</i>	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
	<i>Muestra . . .</i>	4+	4+	4+	4+	4+	4+	+	—
2	<i>B. W. n.º 19-67</i>	4+	4+	4+	+	—	—	—	—
	<i>Muestra . . . .</i>	4+	4+	+	±	—	—	—	—
3	<i>B. W. n.º 19-67</i>	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—	—
	<i>Muestra . . . .</i>	4+	4+	4+	4+	+	—	—	—
4	<i>B. W. n.º 19-67</i>	4+	4+	4+	4+	+	—	—	—
	<i>Muestra . . . .</i>	4+	+	—	—	—	—	—	—
5	<i>B. W. n.º 19-67</i>	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	—
	<i>Muestra . . . .</i>	4+	4+	4+	4+	4+	±	—	—

TABLA III

Ensayos comparativos del antígeno *B. W. n.º 19-67* al 1/200 y de la *muestra* recibida [*T. t. (L.) 1966*] al 1/400 en relación con los sueros enteros negativos y positivos.

ANTÍGENOS	S U E R O S											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>B. W. n.º 19-67</i>	—	—	4+	—	—	—	4+	—	—	—	4+	—
<i>Muestra . . . .</i>	—	—	4+	—	—	—	4+	—	—	—	4+	—
0 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

ANTÍGENOS	S U E R O S											
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
<i>B. W. n.º 19-67</i>	—	—	4+	—	—	4+	—	—	—	*	—	—
<i>Muestra . . . .</i>	—	—	4+	—	—	4+	—	—	—	*	—	—
0 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	*	—	—

\* Anticomplementario.

Se tomará corazón total con predominio de ventrículo, se limpia cuidadosamente procurando no perder jugo muscular y se quitan los pequeños coágulos sanguíneos, vasos y pericardio. Se corta en trozos muy pequeños y se pesa una cantidad para control de las cantidades de reactivos a usar (nosotros hemos partido de 50 g) y colocándola en un Erlenmeyer con tapón esmerilado, se adiciona alcohol etílico absoluto en la proporción de 1 a 1,2 ml/g de corazón fresco. Se agita con el fin de asegurar la coagulación de las proteínas, conservando la actividad el cardioantígeno, y se deja en la oscuridad y a la temperatura ambiente de

20-28°C, durante 2 a 3 días, procurando agitar una vez cada 24 horas.

Pasado este tiempo, se filtra a través de papel libre de grasa, se escurre bien para eliminar en lo posible el alcohol y se pasa la papilla a una caja de Petri de unos 14 cm de diámetro, donde se termina de picar finamente y por último se extiende en una capa fina, desecándose en la estufa a 36-37°C durante unas 24 horas, no sufriendo el producto ninguna alteración durante esta operación. Una vez seco, se reduce el peso de 1/4 a 1/5, se coloca en otro Erlenmeyer, se añade acetona pura en la proporción de 2 ml/g de corazón fresco, se deja en la oscuridad y se agita dos veces cada 24 horas. La acetona se renueva pasados 4 días, continuando la agitación y haciendo nueva renovación pasados otros 4 días, después de 8 a 15 horas se filtra y la pasta extendida en una caja de Petri se deseca en la estufa a 36°C durante unas 2 a 3 horas. La extracción con acetona es un paso importante, siendo conveniente usar un producto de gran pureza con el fin de eliminar ciertos cuerpos grasos que pueden conferir al cardioantígeno poder hemolítico y anticomplementario dando un antígeno inadecuado. Después de evaporada la acetona, el residuo se pasa nuevamente a un Erlenmeyer o a una probeta con tapón esmerilado, se añade etanol absoluto en la proporción de 2 ml/g de corazón fresco, se agita tres veces cada 24 horas y se hace la extracción a la temperatura de 20-28°C en la oscuridad durante unos 8 a 10 días. Pasado este tiempo, se filtra por papel poroso y libre de grasa, obteniéndose un líquido totalmente transparente de color amarillo fuerte, al que hay que añadir, para completar la preparación del cardioantígeno, colessterina pura, en la proporción de 6 mg/ml de extracto.

Si fuera necesario para facilitar la disolución de la colessterina, se puede calentar en baño maría a 45-50°C.

La preparación del cardioantígeno de atún, según este método, se puede resumir de la forma siguiente :

1. Músculo cardíaco con predominio de ventrículo, limpio de coágulos, vasos y pericardio se pica y trata con alcohol etílico absoluto en la proporción de 1-1,2 ml/g de corazón fresco, dejándolo 2 ó 3 días en la oscuridad y agitando una vez cada 24 horas.
2. Filtrar y desecar a 36-37°C durante 24 horas.
3. Colocar en un Erlenmeyer y extraer con acetona pura en la proporción de 2 ml/g de corazón fresco, agitar dos veces cada 24 horas y dejar 4 días, sustituir la acetona en la misma proporción y dejar otros 4 días, sustituir nuevamente de la misma forma y después de 8-15 horas filtrar y desecar a 36°C.
4. Colocar el corazón seco y triturado en un Erlenmeyer o probeta con tapón y extraer con etanol absoluto en la proporción de 2 ml/g de

corazón fresco, agitar tres veces cada 24 horas manteniéndolo en la oscuridad durante 8-10 días.

5. Filtrar, y al líquido amarillo, añadir colesteraína pura en la proporción de 6 mg/ml de extracto, quedando preparado el cardioantígeno.\*

## RESULTADOS

En la tabla I se observa que el antígeno *B. W. n.º 19-67* que ha servido de control es sensible a la dilución 1/800 y 1/1600 para un suero diluido al 1/64 y 1/1 respectivamente, mientras que el *nuestro* lo fue al 1/800 y 1/3200 para el mismo suero diluido al 1/16 y 1/1 con una intensidad de 3+, siendo positivo incluso a 1/4.

En la tabla II se puede apreciar los resultados obtenidos con el antígeno *B. W. n.º 19-67* diluido al 1/200 y el *nuestro* al 1/400 frente a varios sueros positivos a diferentes diluciones y con una intensidad de 4+ correspondiéndose respectivamente las siguientes diluciones de los sueros: 1/64 y 1/32, 1/4 y 1/2, 1/32 y 1/8, 1/8 y 1/1, 1/64 y 1/16.

En la tabla III se hace un estudio comparativo entre el antígeno *B. W. n.º 19-67* y el *nuestro* a las diluciones 1/200 y 1/400 respectivamente frente a sueros enteros negativos y positivos como se usan habitualmente para serodiagnóstico de la sífilis, apreciándose idénticos resultados con una intensidad los positivos de 4+ y resultando anticomplementario la muestra número 22 para ambos.

Del análisis de estos resultados iniciales podemos concluir que este cardioantígeno, según el método seguido en su preparación, es un producto de fácil obtención, de gran estabilidad, carente de poder hemolítico y anticomplementario y siendo útil en clínica para el serodiagnóstico de la sífilis.

Desde el punto de vista industrial, hay que añadir que puede ser un producto con un margen comercial que merece consideración y que se puede calcular aproximadamente, sabiendo que de 50 g de corazón fresco se preparan unos 16 frascos de 5 ml de cardioantígeno, con un precio que puede oscilar entre 25-35 ptas. y con un gasto de preparación usando reactivos de gran pureza de unas 250 ptas. El corazón fresco con un peso medio de unos 500 g y un precio variable según la época del año, de unas 30 ptas. tiene una merma de peso por la limpieza, de 1/5 a 1/10.

\* Este producto ha sido patentado por el Patronato «Juan de la Cierva» con la denominación T. t. (L.) 1966, n.º 350.102.

## SUMMARY

Preparation of a cholesterinized cardiantigen from the tuna fish, *Thunnus thynnus* (L.), of SW coast of Spain, and its value in the serodiagnosis of syphilis. — A prepareate of absolute alcohol-cardiantigen-cholesterol, designed as *T. t. (L.) 1966* from the initials of the name of the species (Bluefin tuna) and the date of preparation, is easy and economical to obtain. It is a deep yellow liquid with great stability in an environment temperature oscillating between 12 and 30°C. With a title of 1/3200 it is sensible for sera entitled 1/4, and with 1/800 will be useful for 1/16 sera. A title of 1/400 tested with 24 samples of 1/1 positive and negative sera, gave the same results (strong reaction of 4+) that the control antigen entitled 1/200. The experimental results obtained by Dr. M. FAURE, of the Institut Pasteur, of Paris, are reported in the tables I to III.

## BIBLIOGRAFÍA

- COSTA, A. L. — 1958-1959. Altissima dose ottimale raggiunta dagli antigeni di cuore di *Xiphias gladius* e di *Thunnus thynnus* con nuovo metodi di estrazione e depurazione. *Atti della Società Peloritana di Scienze Fisiche Matematiche e Naturali*, 5(I):65-72.
- FAURE, M. — 1967. Comunicación personal.