

# ANTICUERPOS CONTRA ESPOROZOITOS DE MALARIA HUMANA Y SIMICA PRODUCIDOS EN RATAS<sup>1</sup>

R. S. Nussenzweig<sup>2</sup>, W. Montuori<sup>2</sup>, G. L. Spitalny<sup>2</sup> y D. Chen<sup>2</sup>

*Estos datos constituyen la primera demostración de que los esporozoítos de malaria humana y simica son inmunogénicos, ya que la inyección de dosis pequeñas de parásitos en ratas provocó rápidamente la formación de cantidades apreciables de anticuerpos CSP.<sup>3</sup>*

En los diversos métodos usados comúnmente para detectar anticuerpos anti-maláricos se recurre casi siempre a las fases eritrocíticas de estos parásitos como fuente de antígeno (1). Sin embargo, los componentes antigénicos de los parásitos de la malaria en sus diferentes fases de desarrollo difieren considerablemente, a pesar de que algunos antígenos son compartidos o comunes (2, 3). Además, los antígenos comunes no incluyen todos los componentes antigénicos de los parásitos, ni comprenden los antígenos funcionales, es decir, protectores de las diversas fases de desarrollo del parásito. Esto lo revela el hallazgo de que los roedores inmunizados con esporozoítos atenuados por irradiación se vuelven totalmente resistentes a un inóculo de esporozoítos que de otro modo es letal, pero continúan siendo completamente susceptibles a la inoculación de formas eritrocíticas de la misma cepa parasitaria (4).

Con anterioridad se demostró que en la malaria aviaria y del roedor se pueden detectar anticuerpos antiesporozoítos, es

decir, anticuerpos dirigidos contra las formas infecciosas de los parásitos de malaria. En ambos casos, estos anticuerpos fueron observados al inmunizarse los animales con esporozoítos atenuados por irradiación. La aglutinación de esporozoítos se observó primero en la malaria aviaria (5). En el sistema de malaria de los roedores, la incubación de esporozoítos de *Plasmodium berghei* con suero inmune provocó la formación de un precipitado en un extremo del esporozoíto. Este precipitado se identificó con facilidad mediante microscopia de fase y se denominó reacción de precipitado circunsporozoítico (CSP) (6). Se demostró que los anticuerpos que intervenían en la reacción CSP eran estrictamente específicos para la etapa infecciosa del parásito, es decir, antiesporozoítos; no se observó reacción contra otras etapas de desarrollo de estos parásitos (7).

En la malaria del roedor, las ratas son muy buenas productoras de anticuerpos anti-esporozoítos, ya que con una sola inyección de un pequeño número de esporozoítos de *P. berghei*, obtenidos de glándulas salivales ( $1.0 \times 10^4$  a  $7.5 \times 10^4$  parásitos) se consiguen sistemáticamente reacciones CSP positivas, detectables una semana después de la inmunización (8). Por consiguiente, se procuró obtener anticuerpos en ratas contra esporozoítos de *Plasmodium cynomolgi*, un parásito de simios. Para esto se usaron

<sup>1</sup> Trabajo publicado por The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., en *The Journal of Immunology* 110(2):600-601, 1973. Se publica con la autorización de dicha revista. Este estudio contó con el apoyo de una subvención para investigaciones, AI-08952, de los Institutos Nacionales de Salud y una subvención de adiestramiento, AI-00361, de estos Institutos, así como de subvenciones de la Organización Mundial de la Salud y de la Organización Panamericana de la Salud.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Preventiva de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York, Nueva York.

<sup>3</sup> Precipitado circunsporozoítico.

ratas jóvenes, de cepa CFN de las Granjas Carworth (ciudad de Nueva York, N.Y.). Estas fueron inmunizadas por ruta intravenosa con esporozoítos de *P. cynomolgi bastianellii*, viables o irradiados con rayos X. Los esporozoítos se obtuvieron por disección de las glándulas salivales de *A. stephensi* infectados e irradiados a un nivel de 10 kilorads, conforme a técnicas antes descritas (9).

Una sola inyección intravenosa de  $1.0 \times 10^5$  ó  $4.0 \times 10^5$  esporozoítos de *P. cynomolgi* en ratas produjo anticuerpos antiesporozoíticos detectables por primera vez de una a dos semanas después de la inmunización (cuadro 1). Dentro de ese intervalo de dosificación, se consiguieron resultados análogos cuando en la inmunización se usaron esporozoítos irradiados o no tratados, es decir, viables. Las muestras de suero fueron positivas para anticuerpos antiesporozoíticos durante unos 30 días después de la inmunización. Al administrarse una inyección intravenosa de refuerzo durante ese período se obtuvo sistemáticamente un aumento significativo en el título de la reacción CSP que se mantuvo positiva por otro período similar (1 mes).

En vista de estos resultados, los autores trataron de inducir la producción de anticuerpos en ratas contra esporozoítos de *Plasmodium falciparum*, un parásito de malaria humana. En estos experimentos se usó la cepa caracterizada en fecha reciente

como Birmania (Thau) de *P. falciparum* (10). Los mosquitos infectados fueron sometidos a una dosis de irradiación con rayos X de 15 kilorads antes de la disección de las glándulas salivales.

Dos ratas fueron inmunizadas con inyección intravenosa de  $3.0 \times 10^5$  y  $1.0 \times 10^5$  esporozoítos, respectivamente. Los sueros no diluidos de ambos animales, obtenidos el noveno y el decimotercer día después de la inmunización, dieron reacciones CSP altamente positivas cuando se incubaron con esporozoítos de *P. falciparum*, obtenidos por disección de mosquitos infectados previamente irradiados. Al administrarse una inyección de refuerzo a estos dos animales con igual número de esporozoítos al decimotercer día después de la inmunización primaria, aumentó el título de anticuerpos, y al decimoséptimo día estos sueros reaccionaron por lo menos hasta una dilución de 1:10. El suero de rata normal dio reacciones negativas.

No se manifestó reacción cruzada entre los sueros anti-*P. cynomolgi* y los esporozoítos de *P. falciparum*. Se observó también lo inverso, es decir, los sueros de ratas inmunizadas con esporozoítos de *P. falciparum* no produjeron reacción cruzada con esporozoítos de *P. cynomolgi*.

Los datos actuales constituyen la primera demostración de que los esporozoítos de malaria humana y símica son inmunogénicos

CUADRO 1—Reacción circunsporozoítica (CSP) en ratas inmunizadas con una sola inyección intravenosa de esporozoítos de *P. cynomolgi* naturales o irradiados con rayos X.

No.	Esporozoítos inyectados	Animales con reacción CSP positiva	
	Tratamiento previo	No. de animales	Positivos el primer día
			<i>Mediana</i>
$4.0 \times 10^5$	Ninguno <sup>a</sup>	5/5	7
$1.0 \times 10^5$	Ninguno <sup>b</sup>	2/2	14
$4.0 \times 10^5$	Irradiación con rayos X	3/3	9
$1.0 \times 10^5$	Irradiación con rayos X	6/6	7

<sup>a</sup> Anticuerpos CSP detectables en todos los casos en el término de 20 a 35 días después de la inmunización.

<sup>b</sup> Los animales de estos grupos nunca mostraron formas eritrocíticas detectables en la sangre periférica.

ya que la inyección de dosis relativamente pequeñas de parásitos en ratas provocó la rápida formación de cantidades apreciables de anticuerpos CSP. Parece probable que se puedan obtener en forma análoga antisueros contra esporozoítos de otras especies de malaria símica y humana, y que esto constituya un medio eficaz para estudiar similitudes antigénicas de esporozoítos de diferentes especies maláricas. Además, como los esporozoítos de malaria humana y no humana son fundamentalmente indistinguibles por microscopía óptica, los antisueros contra esporozoítos de cepas y especies conocidas de malaria podrían usarse para determinar las especies de parásitos hallados en mosquitos y servir de ayuda para identificar los vectores naturales de la enfermedad.

Por último, los autores han demostrado antes que la reactividad cruzada en la reacción CSP entre esporozoítos de *P. berghei* y *P. vinckei* coincide con una amplia protección cruzada en animales inmunizados con esporozoítos de estas dos especies de malaria de roedores (4). En consecuencia, estudios de las propiedades antigénicas de diferentes especies y cepas de malaria humana y símica pueden ser de utilidad en la selección de cepas con miras a la preparación de una vacuna antimalárica.

### Resumen

Se demostró con anterioridad la manifestación de anticuerpos antiesporozoítos después de la inmunización con esporozoítos, atenuados por irradiación, de malaria aviar y de los roedores. Estos anticuerpos son estrictamente específicos de una etapa,

es decir, no son inducidos por otras etapas de la evolución del parásito de la malaria ni reaccionan contra ellas. La presencia de estos anticuerpos provoca la formación de un precipitado al incubar *in vitro* esporozoítos en suero inmune, reacción denominada de precipitado circunsporozoítico (CSP).

Se observó que una sola inyección intravenosa de  $1.0 \times 10^5$  esporozoítos de *P. cynomolgi*, parásito de la malaria símica, producía sistemáticamente anticuerpos CSP detectables al cabo de una semana o dos después de la inmunización. Así mismo las ratas presentaron también anticuerpos CSP en un plazo inferior a dos semanas después de la inmunización con esporozoítos de la cepa de Birmania de *P. falciparum*. No se observaron reacciones cruzadas entre los esporozoítos de estas dos especies maláricas. Este método ofrece la posibilidad de determinar: a) analogías antigénicas entre esporozoítos de distintas especies maláricas, y b) las especies maláricas halladas en mosquitos en una determinada zona geográfica mediante la reacción de los esporozoítos de las glándulas salivales contra antisueros conocidos. □

### Agradecimientos

Los autores agradecen a Alban Calderón y a Dick Nawrot su valiosa asistencia técnica. Expresan también su gratitud a los Dres. David Clyde y Vincent McCarthy, del Instituto de Medicina Internacional, Facultad de Medicina de la Universidad de Maryland, por haber facilitado generosamente mosquitos irradiados infectados con la cepa Birmania (Thau) de *P. falciparum*, y al Dr. R. Ward, del Walter Reed Army Institute of Research, por haber facilitado el *Plasmodium cynomolgi bastianellii*.

### REFERENCIAS

- (1) Brown, I. N. En *Advances in Immunology*. Vol. 11, Academic Press: Nueva York, 1969.
- (2) Sodeman, W. A. y Jeffery, G. M. *J Parasit* 50:477, 1964.
- (3) El-Nahal, H. M. S. *Bull WHO* 37:154, 1967.
- (4) Nussenzweig, R. S.; Vanderberg, J. P.; Most, H., y Orton, C. *Nature* 22:488, 1969.
- (5) Mulligan, H. W.; Russel, P. F., y Mohan, B. N. *J Mal Inst India* 3:513, 1949.
- (6) Vanderberg, J. P.; Nussenzweig, R. S., y Most, H. *Milit Med* 134:1183, 1969.

- (7) Vanderberg, J. P.; Nussenzweig, R. S.; Sanabria, Y.; Nawrot, R., y Most, H. *Proc Helm Soc Washington* (en prensa).
- (8) Spitalny, G. L. y Nussenzweig, R. S. *Exp Parasit* (en prensa).
- (9) Vanderberg, J. P.; Nussenzweig, R. S.; Most, H., y Orton, C. *J Parasit* 54:1175, 1968.
- (10) Clyde, D. F.; Hlaing, N., y Tin, F. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 66:369, 1972.

### Antibodies against Sporozoites of Human and Simian Malaria Produced in Rats (Summary)

Anti-sporozoite antibodies have previously been shown to occur upon immunization with X-irradiated sporozoites of avian and rodent malaria. These antibodies are strictly stage specific, i.e. are not induced by and do not react with other developmental stages of the malaria parasites. The presence of these antibodies causes the formation of a precipitate upon *in vitro* incubation of sporozoites in immune serum, termed the circumsporozoite precipitation (CSP) reaction.

It was found that a single intravenous injection into rats of  $1.0 \times 10^5$  sporozoites of *P. cynomolgi*, a simian malaria parasite, con-

sistently produced CSP antibodies, detectable one or two weeks after immunization. Rats also produced CSP antibodies less than 2 weeks after immunization with sporozoites of the Burma strain of *P. falciparum*. No cross-reactions were observed between the sporozoites of these two malarial species. This method provides the possibility of determining: a) antigenic similarities between sporozoites of different malarial species, and b) the malarial species found in mosquitoes in a given geographic area, by reacting salivary gland sporozoites with known antisera.

### Anticorpos antiesporozoítas de malária humana e simiana produzidos em ratos (Resumo)

Já se demonstrou anteriormente a ocorrência de anticorpos antiesporozoítas após a imunização com esporozoítas de malária das aves e dos roedores, submetidos aos raios X. Tais anticorpos ocorrem em estágio rigorosamente específico, vale dizer, não são induzidos por outros estágios de desenvolvimento dos parasitas palustres, nem reagem em face destes. A presença desses anticorpos causa a formação de um precipitado, ao se proceder a incubação *in vitro* de esporozoítas em soro imune, na chamada reação de precipitação circumsporozoítica (CSP).

Verificou-se que uma única injeção intravenosa em ratos de  $1.0 \times 10^5$  esporozoítas do parasito da malária simiana *P. cynomolgi* pro-

duziu constantemente anticorpos CSP identificáveis uma ou duas semanas após a imunização. Também foram produzidos anticorpos CSP em ratos, menos de duas semanas após a imunização com esporozoítas da variedade birmanesa de *P. falciparum*. Não observamos reações cruzadas entre os esporozoítas dessas duas espécies palustres. Esse metodo oferece a possibilidade de determinação de: a) semelhanças antigênicas entre esporozoítas de diferentes espécies palustres, e b) das espécies palustres encontradas em mosquitos de uma dada área geográfica, mediante a reação de esporozoítas das glândulas salivares com antiseros conhecidos.

### Anticorps des sporozoites du paludisme humain et simien produits chez les rats (Résumé)

Il a été établi antérieurement que des anticorps anti-sporozoites se produisent lors de l'immunisation avec des sporozoites du palu-

disme aviaire et du paludisme des rongeurs. Ces anticorps sont strictement spécifiques de ce stade, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas produits

par et ne réagissent pas avec d'autres stades de développement des parasites du paludisme. La présence de ces anticorps cause la formation d'un précipité lors de l'incubation *in vitro* de sporozoïtes dans un sérum immun, appelé la réaction du précipité circonsporozoïte (PCS).

Il a été constaté qu'une seule injection intra-veineuse dans des rats de  $1.0 \times 10^5$  sporozoïtes de *P. cynomolgi*, un parasite du paludisme simien, a produit régulièrement des anticorps de PCS décelables une ou deux semaines après l'immunisation. Les rats ont également produit

des anticorps de PCS moins de deux semaines après l'immunisation avec des sporozoïtes de la souche birmane de *P. falciparum*. Nous n'avons observé aucune réaction croisée entre les sporozoïtes de ces deux espèces paludéennes. Cette méthode offre la possibilité de déterminer a) les similitudes antigéniques entre les sporozoïtes de différentes espèces paludéennes et b) les espèces paludéennes trouvées chez les moustiques dans une région géographique donnée en faisant réagir les sporozoïtes de la glande salivaire avec des antisérums connus.