

INMUNOPARASITOLOGIA: ORIGEN, ESTADO ACTUAL Y PERSPECTIVAS¹

Pierre Ambroise-Thomas²

ANTECEDENTES

Durante mucho tiempo la inmunología permaneció a la zaga en el estudio de las enfermedades parasitarias debido, sobre todo, a la dificultad para obtener material de parásitos adecuado para preparar antígenos. Como se sabe, la mayor parte de los parásitos no se pueden cultivar *in vitro*. En ciertos casos su multiplicación en animales de laboratorio es imposible, difícil o escasamente productiva. Por otra parte, el ciclo vital de estos organismos incluye muchas fases diferentes, cada una con características antigénicas más o menos definidas (antígenos específicos de fase).

Una dificultad nueva e importante es la selección de la fase que mejor se adapta a cierto objetivo; por ejemplo, el diagnóstico oportuno de una enfermedad parasitaria. Otro obstáculo semejante es la gran complejidad de los antígenos parasitarios: si utilizamos el término mosaico de antígenos para microorganismos como las bacterias y los virus, habrá que encontrar una expresión superior para describir la complejidad antigénica de los parásitos.

Por otro lado, algunas de las muchas fracciones antigénicas son comunes a varias especies de parásitos o son compartidas por el parásito y su huésped u otros microorganismos. Estas fracciones no específicas son la causa de muchas reacciones cruzadas. Por consiguiente, la purificación de antígenos parasitarios resulta muy difícil y pocas veces logra obtener reactivos muy puros, aun si se emplean técnicas complejas. En ocasiones, algunos grupos de investigadores, con ayuda de equipos muy complejos, han creído aislar fracciones verdaderamente específicas de ciertos parásitos. Pero en realidad, estudios ulteriores demostraron (como sucedió en el caso de la hidatidosis) que esas fracciones podían encontrarse en especies de parásitos más o menos emparentadas con la estudiada. En las condiciones experimentales actuales dichas fracciones antigénicas son extraordinarias, mucho mejores que otras, pero no absolutamente específicas.

¹ Presentado en el Simposio de Inmunoparasitología celebrado en Medellín, Colombia, del 20 al 23 de junio de 1983.

² Universidad de Grenoble, Facultad de Medicina, Laboratorio de Parasitología y Patología de Enfermedades Exóticas. Dirección postal: 3800 La Tronche, Francia.

APLICACIONES PRINCIPALES

A pesar de todas estas dificultades, la inmunoparasitología ha adquirido grandes recursos técnicos y científicos. Se conocen varias aplicaciones importantes, principalmente en el diagnóstico y la evaluación de la curación, después del tratamiento, de varias parasitosis. En fecha más reciente se tornó más real la esperanza de elaborar una vacuna contra varias parasitosis, en especial el paludismo.

También es digna de mención la creciente rapidez con que se está desarrollando esta nueva disciplina. Cada descubrimiento, cada adelanto técnico, se pone en práctica muy pronto. Así ha sucedido con la identificación de nuevas clases de inmunoglobulinas (IgE), el cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*, las pruebas serológicas nuevas y más sensibles (radioinmunovaloración y prueba de inmunoabsorción enzimática, mejor conocida por la sigla ELISA), los métodos de extracción, purificación y caracterización de fracciones proteínicas y muchos adelantos más.

INMUNODIAGNOSTICO DE PARASITOSIS

Hasta ahora el diagnóstico inmunológico de las parasitosis ha dependido sobre todo de técnicas serológicas. Como es evidente, estas solo pueden usarse en casos de parasitosis intratisular profunda donde el contacto huésped-parásito es lo bastante cercano para provocar la producción de anticuerpos circulantes. Las diversas técnicas serológicas pueden dividirse en dos categorías, descritas a continuación.

En los *métodos que emplean un antígeno determinado* se requiere

como reactivo antigénico el parásito completo o un fragmento del mismo; por ejemplo, la inmunofluorescencia indirecta y las diferentes pruebas para aplicaciones determinadas, como la de Sabin y Feldman para identificar toxoplasmosis o la de Vogel-Minning para la esquistosomiasis. En la práctica estos estudios se hacen con cantidades muy pequeñas de material parasitario; sin embargo, es claro que los métodos que necesitan parásitos vivos adolecen de ciertas limitaciones. Desde el punto de vista científico, la principal ventaja de las pruebas con ciertos antígenos en particular es que ponen de manifiesto, sobre todo, antígenos somáticos de superficie, que figuran entre los más importantes por estar situados en la interfase de la relación huésped-parásito.

Las *reacciones que utilizan antígenos solubles* se hacen con extractos parasitarios más o menos purificados. Entre estas técnicas figuran la hemaglutinación indirecta, aglutinación de diversas partículas sensibilizadas, contraelectroforesis, fijación del complemento, ELISA, radioinmunovaloración, prueba inmunológica en capa delgada (TIA) y otras; poseen ventajas e inconvenientes prácticamente complementarios de los que presentan los métodos a base de antígenos determinados.

Las aplicaciones actuales del inmunodiagnóstico tienen que ver prácticamente con todas las parasitosis viscerales, pero sobre todo con la toxoplasmosis. En efecto, el diagnóstico serológico de esta protozoosis es la aplicación más importante de la inmunoparasitología. Cada año se hacen en Francia unos 5 millones de pruebas para detectar toxoplasmosis. En realidad, este es un caso especial pues las pruebas serológicas se hacen más para determinar la presencia de inmunidad

espontáneamente adquirida en mujeres jóvenes, con miras a aplicar profilaxis de la toxoplasmosis congénita, que para diagnosticar la enfermedad, que en la mayor parte de los casos no es manifiesta.

Los dos métodos de referencia en este campo son la inmunofluorescencia indirecta y la prueba del colorante. Se están estudiando otras técnicas (ej., ELISA) para mejorar las características y la rapidez de las pruebas serológicas de detección en grandes grupos de población. En realidad, los resultados dependen de la calidad de los antígenos disponibles. Cuando estas pruebas se hacen en embarazadas puede haber una verdadera urgencia por determinar el comienzo o la evolución de la enfermedad.

La búsqueda de anticuerpos IgM por distintos métodos serológicos (IgM inmunofluorescente) puede proporcionar información complementaria. No obstante, existe una probabilidad de error principalmente en relación con la presencia del factor reumatoide o de anticuerpos antinucleares. La detección de anticuerpos IgM puede bloquearse si los anticuerpos antitoxoplásmicos de IgG son demasiado abundantes. Para evitar estas probabilidades de error se han propuesto varios métodos, tales como absorción de los sueros en IgG polimerizada o aglomerada por calor, tratamiento previo de los sueros con proteína A, aislamiento de la fracción IgM de las gammaglobulinas y titulación de los anticuerpos específicos. Ninguno es completamente satisfactorio o práctico.

Hace muy poco tiempo se dio con una probable solución, consistente en hacer la prueba ELISA primero por el método de "doble emparedado" y luego por el de ELISA invertida, lo cual es más sencillo y parece ser igualmente preciso.

Con estas técnicas es probable detectar IgM antitoxoplásmica en más de 80% de los recién nacidos con toxoplasmosis congénita; con la IgM inmunofluorescente la proporción es de 25%.

Otra aplicación sobresaliente del serodiagnóstico de parasitosis se observa en la amebiasis, en la cual varias técnicas serológicas (inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación indirecta y electrosinéresis) son positivas en más de 95% de los casos de localización hepática, o sea, un índice diagnóstico excelente.

Es claro que las pruebas serológicas no se pueden aplicar en caso de parasitosis exclusivamente intestinales. Los exámenes coproparasitológicos permiten hacer un diagnóstico más sencillo e innegable. Por lo que respecta a otras protozoosis, la principal utilidad del serodiagnóstico del paludismo sería cuando se dificulta el diagnóstico parasitológico directo, como en el caso de portadores de paludismo desconocidos entre donantes de sangre. En cambio, la leishmaniasis y en especial la tripanosomiasis (tanto la forma africana como la sudamericana), se han beneficiado enormemente de los métodos serológicos.

Las helmintiasis que se han estudiado mediante pruebas serológicas son la hidatidosis (con más de 90% de positividad en las formas hepáticas), fascioliasis, esquistosomiasis, triquinosis y filariasis como la oncocercosis. En general, las mejores pruebas son las que utilizan técnicas correctas y antígenos suficientemente purificados que dan una positividad mayor de 90%, proporción superior a la de los estudios parasitológicos.

En realidad, es importante matizar estos valores totales que incluyen resultados de naturaleza muy diferente. Por esta razón, los resultados serológicos positivos bajos solo pueden ser presuntivos debido al riesgo de reacciones

cruzadas, especialmente frecuentes en infestaciones con nematelmintos. El diagnóstico puede hacerse únicamente si la positividad es alta o muy alta: 50 a 60% de casos positivos.

De cualquier modo, el uso simultáneo de varias pruebas inmunológicas hechas con diferentes tipos de antígenos mejora mucho los resultados y facilita su interpretación. A menudo sucede que un suero negativo o ligeramente positivo en una prueba puede ser muy positivo en otra; esto se ha demostrado en casi todas las parasitosis profundas y usando pruebas tan variadas como inmunofluorescencia indirecta, electrosinéresis, ELISA y determinación de IgE específica (hidatidosis) mediante diversas radioinmunovaloraciones, como la prueba del radioalergosorbente (RAST) y la del radioinmunsorbente (RIST).

Entre las nuevas perspectivas del estudio serológico de las parasitosis es preciso mencionar los resultados obtenidos hace poco con nuevos tipos de antígenos. Ya no se trata de extractos somáticos sino de antígenos metabólicos excretados y secretados por parásitos que se han multiplicado en cultivo o se han conservado con vida *in vitro*. Estos antígenos son muy prometedores y, en ciertos casos, parecen ser idénticos a antígenos circulantes que se han identificado en animales con infestación experimental (toxoplasmosis). Se han obtenido buenos resultados preliminares en paludismo, toxoplasmosis, amebiasis, fascioliasis, toxocariasis y oncocercosis. Es evidente que estos antígenos metabólicos se producen en cantidades minúsculas en los medios de cultivo o de supervivencia. Por consiguiente, hay que recurrir a técnicas muy sensibles que utilicen muy poco reactivo. En todas las aplicaciones actuales, y en particular en las infestaciones por nematodos, los antígenos me-

tabólicos parecen tener una especificidad mucho mayor que los somáticos.

Recientemente se ha abierto un nuevo campo de diagnóstico indirecto de parasitosis en el cual ya no se detectan anticuerpos sino antígenos circulantes o complejos inmunitarios circulantes no saturados con anticuerpos. Durante varios años esto se ha venido haciendo con técnicas de inmunoprecipitación, que no son muy sensibles, por lo cual los resultados y aplicaciones prácticas eran limitados. Con la creación de métodos mucho más sensibles (ej., ELISA), los resultados se han multiplicado y ya se extienden a toxoplasmosis, fascioliasis, esquistosomiasis, criptococosis y candidiasis profunda. En ciertos casos, por lo menos, la detección de antígenos circulantes permitirá:

□ diagnosticar muy a tiempo las parasitosis, aun antes de que aparezcan los primeros anticuerpos circulantes, y

□ hacer un diagnóstico indirecto, incluso en pacientes totalmente desprovistos de anticuerpos circulantes a causa de inmunodeficiencia primaria o secundaria a tratamiento inmunosupresor.

ENCUESTAS EPIDEMIOLOGICAS

Las encuestas epidemiológicas se están convirtiendo cada vez más en uno de los mejores usos de las técnicas de inmunodiagnóstico. En general, las pruebas serológicas requieren muestras mucho más sencillas (ej., micromuestras por punción digital) que los exámenes parasitológicos, y en los resultados hay poca probabilidad de resultados falsamente negativos; sin embargo, puede haber resultados falsamente positivos (reacciones cruzadas). Por tanto, la interpretación suele ser difícil y debe ba-

sarse en criterios de evaluación muy precisos y en una metodología rigurosa, por ejemplo, mediante muestreo de los pacientes y realización de estudios longitudinales.

En general, las encuestas epidemiológicas basadas en pruebas serológicas son complementarias de otras técnicas de evaluación. El estudio inmunológico es concebible únicamente cuando las pruebas parasitológicas directas no pueden hacerse o resultan problemáticas, como sucede cuando el nivel de transmisión es muy bajo. A pesar de estas limitaciones tan estrictas, las pruebas serológicas se usan cada vez más para hacer estudios epidemiológicos cuando es indispensable lograr una gran precisión; por ejemplo, para evaluar la eficiencia de un programa de erradicación y para decidir si se suspenden o reducen las medidas de prevención. En la actualidad, los resultados más espectaculares se han obtenido con paludismo, tripanosomiasis africana y sudamericana, amebiasis, esquistosomiasis y filariasis como la wuchereriosis y la oncocercosis.

Durante varios años las reacciones cutáneas fueron el método más usado para la detección serológica o las encuestas inmunológicas en grandes grupos humanos. Pero poco a poco se han dejado de usar debido a ciertos inconvenientes prácticos, entre ellos la necesidad de usar cantidades relativamente grandes de antígenos parasitarios y la espera de 48 ó 72 horas para interpretar los resultados en el caso de ciertas parasitosis. A ello se agregan varias limitaciones de diagnóstico, como la falta de oportunidad y la persistencia de reacciones cutáneas positivas mucho tiempo después de la curación.

Actualmente se están llevando a cabo investigaciones en varios países con el objeto de definir de nuevo la factibilidad de la aplicación de las reacciones cutáneas, que son sin duda un medio extraordinario y sencillo de detección y de estudio de la inmunidad celular. Se han realizado pruebas con los nuevos tipos de antígenos metabólicos mencionados antes y usando una técnica de micropuntura que requiere muy poco reactivo y limita el riesgo de sensibilización o de fenómenos inmunopatológicos, como ocurre en la toxoplasmosis.

EVALUACION DE LA CURACION DE LAS PARASITOSIS

Entre las muchas aplicaciones de las pruebas serológicas en las parasitosis, con frecuencia se olvida el control postterapéutico, a pesar de que es un campo en el que la inmunoparasitología resulta particularmente valiosa. En la mayor parte de las enfermedades parasitarias resulta difícil confirmar la curación después del tratamiento, incluso si los exámenes parasitológicos son negativos. Estos exámenes tienen una probabilidad elevada de resultados falsamente negativos. Empleando la expresión clásica, el resultado negativo solo significa que los parásitos no fueron aislados, no que hayan desaparecido. Esta causa de error se puede reducir repitiendo los exámenes, pero esta repetición es en sí misma una limitación.

Las pruebas serológicas no están sujetas a esta probabilidad de resultados falsamente negativos, pues la detección de anticuerpos es mucho menos problemática y aleatoria que la identificación de los parásitos. En general, en las protozoosis el tratamiento produce de inmediato una disminución de los títulos

de anticuerpos. Por el contrario, cuando las helmintiasis son tratadas sobreviene una elevación transitoria de la respuesta serológica, la cual alcanza el punto máximo 4 a 6 semanas después del tratamiento y luego disminuye en forma gradual. En ambos casos, si hubo curación deben transcurrir entre 10 y 12 meses antes de que las pruebas serológicas (ej., inmunofluorescencia indirecta) sean negativas por completo. Aun cuando son uno de los medios más precisos de evaluar la curación, estas pruebas tienen el inconveniente considerable de que se tornan negativas en fase tardía. Una primera mejoría, al menos en ciertas parasitosis como la hidatidosis, sería la cuantificación de IgE específica más bien que de IgG. Esta representaría una de las mejores aplicaciones de la detección de antígenos circulantes, ya que al parecer la reacción se vuelve negativa con gran rapidez: 2 a 3 meses después de la curación.

PERSPECTIVAS

Inmunopatología y vacunas antiparasitarias

En la actualidad, la inmunoparasitología ya no está limitada al diagnóstico serológico, pues se han abierto dos campos nuevos fascinantes: la inmunopatología de las enfermedades parasitarias y la posibilidad de elaborar vacunas antiparasitarias. En el primero destacan, desde luego, los estudios sobre el meningoencefalitis en el paludismo causado por *P. malariae*, ciertas complicaciones hepáticas causadas por esquistosomas intestinales, la anemia del paludismo causado por *P. falciparum* y los trastornos articulares en la filariasis.

En el otro campo se están acelerando las investigaciones para encontrar una vacuna contra diversas

parasitosis: toxoplasmosis, amebiasis, esquistosomiasis. En realidad, la búsqueda de una vacuna contra el paludismo por *P. falciparum* es la que parece estar más adelantada. Aun no es posible fijar una fecha para la conclusión de estos estudios, pero es razonable esperar que en el futuro cercano contemos con una vacuna contra la única forma mortal de paludismo. Esta posibilidad abre enormes perspectivas desde el punto de vista médico, socioeconómico y, más sencillamente, humano.

RESUMEN

Se hace un repaso de los principales adelantos logrados por la inmunoparasitología en su corta existencia. Luego de señalar los obstáculos que deben superarse para obtener antígenos adecuados, se explican brevemente las principales aplicaciones prácticas de la nueva disciplina, a saber: inmunodiagnóstico de parasitosis, encuestas epidemiológicas, evaluación de la curación de las parasitosis después del tratamiento, inmunopatología de enfermedades parasitarias y perspectivas de la elaboración de vacunas antiparasitarias, principalmente contra el paludismo causado por *P. falciparum*. La descripción de estos adelantos está basada en la experiencia del autor y en una revisión bibliográfica. Se destaca la rapidez del avance de la inmunoparasitología en años recientes y la orientación práctica de muchas investigaciones en este campo. □

BIBLIOGRAFIA

Ambroise-Thomas, P. L'immuno-fluorescence aux anti-IgM marquées dans le dépistage précoce de la Toxoplasmose acquise ou congénitale. Bilan de 24 000 examens. C.R. Colloque sur la sérologie toxoplasmique. Lyon, Fond. Mérieux Ed., 1975, pp. 131-139.

Ambroise-Thomas, P., Francesio, J., Simon, J., Micouin, C. y Pierson, Y. Les facteurs rhumatoïdes, cause de non spécificité de l'immuno-fluorescence anti-IgM dans la Toxoplasmose. *Ann Biol Clin* 38:315-319, 1980.

Ambroise-Thomas, P. La vaccination contre le paludisme. État actuel et perspectives. *Cab ORSTOM (Série Ent Méd Parasit)* 18:87-102, 1980.

Ambroise-Thomas, P. Applications et perspectives de l'immunologie parasitaire. *Cab Med* 7:413-416, 1981.

Ambroise-Thomas, P. Le test ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) et ses applications à l'immunologie parasitaire. *Lyon Med* 245:9-13, 1981.

Camargo, M. E., Ferreira, A. W., Mineo, J. R., Takiguti, C. K. y Nakahara, O. S. Immunoglobuline G and immunoglobuline M enzyme linked immuno-sorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun* 21:55-58, 1978.

Houba, V. *Immunological Investigations of Tropical Diseases*. Edimburgo, Livingstone, 1980.

Naot, Y. y Remington, J. S. An enzyme-linked immuno-sorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 142:757-766, 1980.

Remington, J. S. y Miller, M. J. 195 and 75 anti-toxoplasma antibodies in diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 121:357-363, 1966.

SUMMARY

IMMUNOPARASITOLOGY: ORIGINS, PRESENT STATUS AND PROSPECTS

This study reviews the salient advances scored by immunoparasitology during its brief existence. An account of the obstacles to be overcome before satisfactory antigens can be obtained is followed by a brief explanation of the chief practical applications of the new discipline, to wit: the immunodiagnosis of parasitoses, epidemiological sur-

veys, post-treatment evaluation of recovery from parasitic diseases, immunopathology of parasitic diseases, and the outlook for the development of vaccines against them, particularly, against falciparum malaria. The description of these advances is based on the author's own experience and on a review of the literature. The paper highlights the rapid pace of advances in immunoparasitology during recent years and the practical direction of much research in this field.

RESUMO

IMUNOPARASITOLOGIA: ORIGEM, SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS

Passam-se em revista os principais avanços da imunoparasitologia em sua curta existência. Após assinalar os obstáculos que devem ser superados para obter antígenos adequados, explicam-se brevemente as principais aplicações práticas da nova disciplina: imunodiagnóstico de parasitoses, pesquisas epidemiológicas, avaliação da cura das parasitoses após o tratamento, imunopatologia de enfermidades parasitárias e perspectivas da elaboração de vacinas antiparasitárias, principalmente contra o paludismo causado por *Plasmodium falciparum*. A descrição desses avanços baseia-se na experiência do autor e numa revisão bibliográfica. Destacam-se a rapidez do avanço da imunoparasitologia nos últimos anos e a orientação prática de muitas pesquisas nesse campo.

RÉSUMÉ

IMMUNOPARASITOLOGIE: ORIGINE, ÉTAT ACTUEL ET PERSPECTIVES

On passe en revue les succès rapportés par l'immunoparasitologie durant sa courte existence. Après une indication des obstacles à surmonter pour obtenir des antigènes appropriés, on explique brièvement les principales applications pratiques de la nouvelle discipline, à savoir: immunodiagnostic des parasitoses, enquêtes épidémiologiques, évaluation de la guérison des parasitoses après le traitement, immunopathologie des maladies parasitaires et perspectives de l'élaboration de vaccins antiparasitaires, principalement contre le paludisme causé par *Plasmodium falciparum*. La description de ces progrès est basée sur l'expérience de l'auteur et sur une étude bibliographique. On souligne la rapidité du développement de l'immunoparasitologie durant les dernières années, ainsi que l'orientation pratique de nombreuses investigations dans ce domaine.