

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS EN SUEROS DE HUMANOS INFECTADOS CON *ECHINOCOCCUS GRANULOSUS*¹

Miguela V. Pérez Esandi²

Al estudiar el aislamiento de anticuerpos contra los parásitos, parece ser más eficaz el inmunoabsorbente preparado con glutaraldehído y, con ciertas modificaciones, se sugiere la posibilidad de que podría facilitar el estudio de la respuesta inmunitaria a la infección por Echinococcus.

Introducción

En sueros de pacientes con equinococosis, los anticuerpos dirigidos contra los antígenos presentes en el líquido hidatídico pueden ser detectados mediante técnicas serológicas tales como hemaglutinación indirecta (HI), floculación de látex, floculación de bentonita, fijación del complemento y pruebas de hipersensibilidad en la piel. Véase la revisión hecha por Kagan (1).

Kagan *et al.* (2) demostraron actividad serológica en la fracción IgG del suero de un paciente. Castagnari *et al.* (3) encontraron un aumento en los niveles de IgG e IgA, ambos en pacientes sometidos a operación quirúrgica años atrás, y en casos recientemente diagnosticados. Encontraron que la actividad serológica en HI reside en las fracciones IgG e IgM, aunque en títulos más bajos en este último. Melli *et al.* (4) pudieron detectar actividad reagínica en una fracción que contenía IgA pero que carecía de IgG e IgM. La absorción del suero de pacientes con suero de conejo anti-IgA humano no eliminó la actividad reagínica, lo que sugirió la presencia de otro tipo de inmunoglobulina similar a la descrita por Ishizaka, Ishizaka y Lee (5) en el suero de pacientes atópicos (IgE).

Es evidente de estos estudios que la infección con quistes de *Echinococcus* estimula la formación de anticuerpos circulantes pertenecientes a varias clases de inmunoglobulinas. Este trabajo describe el aislamiento de estos anticuerpos mediante un método inmuno-específico.

Materiales y métodos

Líquido hidatídico de ovinos (LHO)

Se usó para este estudio una mezcla o banco de líquidos hidatídicos de quistes de hígado de ovinos infectados. Se agregó merthiolato al 1/10,000 como conservador y el líquido se guardó a -20°C . Se concentró ya sea por liofilización o diálisis contra Carbowax 20,000.

Suero de pacientes con quistes hidatídicos

Las mezclas P-1 y P-2 provenían de 7 y 8 pacientes respectivamente, cuyos títulos en HI variaban de 1/200 a 1/40,000. Todos estos pacientes recibieron "tratamiento biológico" en el Hospital Alvarez, Buenos Aires, Argentina. Este tratamiento consiste en una serie de inmunizaciones contra los antígenos de *Echinococcus granulosus* administrados por vía intradérmica o subcutánea, o ambas. El antígeno empleado es una mezcla de membrana húmeda por cada 4 ó 5 litros de líquido hidatídico, ambos de origen ovino y bovino. Algunos pacientes han estado bajo este tratamiento por un período de más de 10 años.

¹Publicado originalmente en *The Journal of Parasitology* 56(2): 336-339, 1970, con el título "Isolation and characterization of antibodies from sera of humans infected with *Echinococcus granulosus*".

²Del Centro Panamericano de Zoonosis, OPS, Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina.

La mezcla P-3 provenía de cinco pacientes de hidatidosis, que no recibieron tratamiento biológico.

Las mezclas de sueros normales (SN-1 y SN-2) eran de personas libres de hidatidosis, según datos clínicos y serológicos.

Antes de usarse, todos los sueros fueron delipidizados mediante centrifugación seguida de filtración a 4°C.

Antisueros

El suero de conejo anti-suero humano total fue provisto por la Dra. Rosa Pirovsky (Instituto de Oncología, Escuela de Medicina de la Universidad de Buenos Aires). Los sueros de conejo anti-IgG y anti-IgM humanos fueron adquiridos de Inmunochemia (Buenos Aires). El Dr. Ricardo Margni (Departamento de Microbiología e Inmunología, Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires) proporcionó gentilmente el suero de conejo anti-IgD. El suero de conejo anti-IgG humano se preparó de acuerdo con la técnica descrita por Binaghi, Oriol y Boussac-Aron (6).

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas en el eluido del inmunoabsorbente se midió por el método espectrofotométrico a 280 m μ , y se hizo la determinación cuantitativa por el método de Biuret.

Inmunodifusión en gel (ID)

La ID se llevó a cabo en portaobjetos usando difco, bacto-agar, en ClNa 0.15 M, con merthiolato al 1/10,000.

La concentración proteica del líquido hidatídico de ovino era de 6-12 mg/ml, y la de los anticuerpos eluidos, de 3.25 a 6 mg/ml.

Inmunoelectroforesis (IE)

Se realizó esta prueba de acuerdo con el micrométodo de Scheidegger (7).

Hemaglutinación indirecta (HI)

Las titulaciones se hicieron por micro-método empleando el sistema "Microtiter" (Cooke Engineering Co.).

Glóbulos rojos de ovino

Se prepararon los glóbulos rojos sensibilizados con LHO de acuerdo con la técnica descrita por Kagan y Norman (8). Estos glóbulos se usaron para detectar en las fracciones eluidas anticuerpos contra los antígenos específicos presentes en el líquido hidatídico.

Inmunoabsorbentes

Se usaron dos preparaciones de inmunoabsorbentes de LHO. El primero fue preparado con LHO liofilizado, reconstituido en agua a una concentración de proteína de 5.45 mg/ml. Se agregaron 550 mg de albúmina bovina cristalizada (ABC) a 60 mg de proteína de LHO.

El segundo inmunoabsorbente se preparó usando LHO concentrado por diálisis contra "carbawax" 20 M (Union Carbide Chemical Co.) y conteniendo 14.25 mg de proteína/ml. Se agregaron 320 mg de globulina gamma humana, electroforéticamente pura, a un total de 114 mg de proteína de LHO. El LHO no es soluble en glutaraldehído, pero lo es con la ayuda de otra proteína (proteína portadora).

La mezcla de LHO y de la proteína portadora en un volumen de 8 a 12 ml, se dializó contra 400 volúmenes de solución tope de acetato (0.2 M, pH5). Después de la diálisis se controló el pH y se ajustó, cuando era necesario, con solución tope de acetato (1 M, pH 5). Se agregó luego gota a gota 1 ml de una solución acuosa de glutaraldehído al 2.5% (Schuchart, Munich) por cada 250 mg de proteína, con agitación suave. Se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante tres horas. Se forma un gel que se rompe con un homogeneizador de tejidos y la suspensión resultante se centrifuga a 3,000 rpm durante 15 minutos. La suspen-

sión se lava tres veces con 200 ml de solución tope de fosfato (0.2 M, pH 7.2) y luego se dispersa en 200 ml de solución tope de glicina (0.2 M, pH 2.8). Después de un segundo lavado con esta solución, la proteína insoluble se lava con la solución tope de fosfato usada al principio hasta que la absorción del sobrenadante a 280 m μ es de 0.02. El inmunoabsorbente se guarda a 4°C, en merthiolato al 1/10,000 hasta su uso.

La polimerización se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Avrameas y Ternynck (9).

Resultados

Cuando se mezcló el suero inmune con el inmunoabsorbente, luego de agitarlo suavemente por 30 minutos y centrifugarlo, no se pudo demostrar actividad del anticuerpo ni en el sobrenadante del suero absorbido ni en la solución tope de fosfato (pH 7.2) usada para lavar el complejo.

Se realizó la elución de proteínas absorbidas usando una solución tope de glicina-CIH (0.1 M, pH 2.8) a 4°C durante 15 minutos. Después de centrifugarse, el sobrenadante se pasó a través de un filtro miliforo (tipo HA, tamaño de poro: 0.45 μ) y se dializó contra tope de fosfato. Se hicieron generalmente dos eluciones, cada una con 5 ml de tope de glicina, y la mezcla lavada se concentró por diálisis contra sacarosa a una concentración de proteína de 3.25–6.0 mg/ml. El rendimiento de proteína obtenido en una serie de siete experimentos se muestra en el cuadro 1. Se encontró que repitiendo el tratamiento con solución tope de glicina 4 ó 5 veces se eluían más proteínas, aun de un inmunoabsorbente que había sido puesto en contacto con suero humano normal. El material eluido después de la absorción de suero humano normal (SHN) era principalmente albúmina mientras que los análisis de inmunodifusión e inmunolectroforesis de las proteínas eluidas de sueros inmunes indican que la mayoría eran inmunoglobulinas de la clase IgG (figura 1). En

CUADRO 1—Rendimiento de proteínas eluidas del inmunoabsorbente después de la absorción de los sueros.

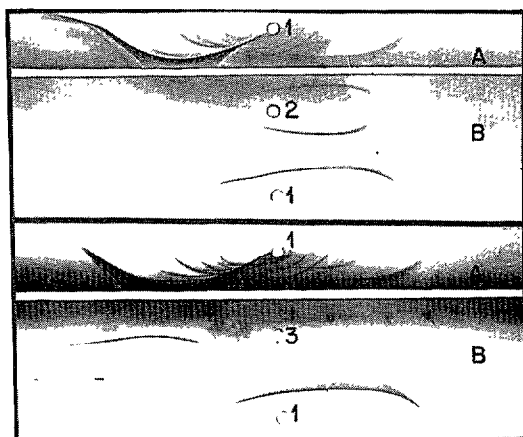
| Inmunoabsorbente | Mezcla de sueros | Volumen en ml | Total de proteínas eluidas en mg |
|------------------|------------------|---------------|----------------------------------|
| I | P-1 | 8 | 10.73 |
| I | P-2 | 8 | 6.51 |
| I | SN-1 | 8 | 1.27 |
| I | SN-2 | 8 | 1.27 |
| II | P-2 | 9 | 6.48 |
| II | P-2 | 9 | 6.04 |
| II | P-3 | 5 | 7.80 |

I y II: Distintas preparaciones de inmunoabsorbentes.
P-1, P-2 y P-3: Mezclas de sueros de pacientes.
SN-1 y SN-2: Mezclas de sueros normales.

el análisis de Ouchterlony aparecieron bandas de precipitación entre las proteínas eluidas y los antisueros específicos contra IgG, IgA e IgM, pero no contra IgD. Usando suero de conejo anti-suero humano total y suero de conejo anti-IgG humano apareció un arco de precipitación en IE correspondiente a IgG, pero cuando se hicieron varias eluciones, también se pudieron detectar pequeñas cantidades de albúmina.

La determinación cuantitativa de la concentración de inmunoglobulinas eluidas usando "Immunoplates" (Hyland) revelaron que

FIGURA 1—Análisis inmunolectroforético del material eluido de los inmunoabsorbentes.



1. Suero humano normal.
 2. Material eluido de sueros de pacientes.
 3. Material eluido de suero humano normal.
- A Suero de conejo antisuero humano normal.
B Suero de conejo anti-IgG de suero humano normal.

más de la mitad de las proteínas eluidas eran IgG. Se encontraron también IgM e IgA pero a concentraciones más bajas que las necesarias para la determinación cuantitativa por inmunodifusión radial.

La actividad de anticuerpo de las proteínas eluidas fue determinada por difusión en gel y hemaglutinación indirecta usando líquido hidatídico total como antígeno. Se observaron tres arcos de precipitación con proteínas purificadas de las mezclas P-1, P-2 y P-3, mostrando la presencia de anticuerpos dirigidos al menos contra tres determinantes antigénicos, situados en diferentes moléculas. En la prueba de HI el número de unidades hemaglutinantes del anticuerpo en las fracciones eluidas eran aproximadamente la mitad del correspondiente al suero original. La concentración mínima de proteínas purificadas que daban hemaglutinación positiva variaba en preparaciones diferentes, entre 3 y 14 mg/ml. Estas cifras son de un orden de magnitud similares a aquellas descritas para IgG en otros sistemas.

Cuando las fracciones eluidas de dos experimentos fueron nuevamente puestas en contacto con el inmunoabsorbente lavado, el 68 y el 80 por ciento respectivamente, de las proteínas, fue retenido en forma específica, indicando que más de la mitad del material conservó actividad de anticuerpo.

Discusión

El hecho de que no todas las proteínas eluidas tengan actividad de anticuerpo puede ser atribuido a varios factores.

Las condiciones drásticas usadas para disociar el complejo antígeno-anticuerpo pueden haber contribuido a la destrucción parcial de la actividad de anticuerpo de las inmunoglobulinas y la aplicación de condiciones menos severas (por ejemplo Cl_2Mg : 5M, pH 7.5), como lo describieron Avrameas y Ternynck (9), podrían ser necesarias para conservar mejor esta actividad.

La contaminación de las inmunoglobulinas purificadas, con otras proteínas del suero que

se absorben en forma inespecífica al inmunoabsorbente, podría también explicar el menor grado de actividad de las proteínas eluidas. Se encontró que el antígeno polimerizado había absorbido albúmina de suero humano normal, y esta fue también detectada en eluidos provenientes de sueros inmunes cuando se hicieron más de dos eluciones. Es interesante tener en cuenta, sin embargo, que las tres clases principales de inmunoglobulinas están representadas en los eluidos aunque algo contaminadas con otras proteínas. Por supuesto, que la distribución de inmunoglobulinas en pacientes que recibieron el llamado "tratamiento biológico" puede no ser indicativa de lo que ocurre durante la enfermedad natural, pero es interesante recalcar que las mismas inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA estaban presentes en los eluidos de los sueros de pacientes que no habían recibido dicho tratamiento y que el rendimiento de proteínas eluidas era mayor en este caso.

El aislamiento de anticuerpos dirigidos contra parásitos ha sido descrito por Strejan y Campbell (10) usando la técnica de Singer *et al.* (11). El uso de inmunoabsorbentes preparados con glutaraldehído parece ser menos complicado y más rápido y con ciertas modificaciones podría encontrar una aplicación más extensa en el estudio de la respuesta inmunitaria a la infección por parásitos.

Resumen

Se aislaron anticuerpos de sueros de pacientes de hidatidosis usando un inmunoabsorbente preparado por polimerización con glutaraldehído de líquido hidatídico de ovino. Así preparado, este inmunoabsorbente parece ser menos complicado y más rápido, y en la investigación de la respuesta inmunitaria a la infección por parásitos, se considera la posibilidad de encontrar una aplicación más extensa del mismo, previa introducción de algunas modificaciones. Los anticuerpos eluidos fueron de clase IgG en

su mayor parte, pero también se encontraron IgA e IgM en los sueros de pacientes. Debe recalcar que las tres clases de inmunoglobulinas estaban algo contaminadas con otras proteínas; además, es de interés señalar también que estas inmunoglobulinas asimismo estaban presentes en los sueros de pacientes que no habían recibido el tratamiento, y que

en este caso fue mayor el rendimiento de proteínas eluidas. □

Agradecimiento

Se desea agradecer a los doctores Stratis Avrameas, J. F. Williams y R. Oriol por sus valiosas sugerencias y ayuda en la lectura del manuscrito.

REFERENCIAS

- (1) Kagan, I. G. "A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease." *Bulletin WHO*, 39:25-37, 1968.
- (2) Kagan, I. G., Maddison, E. S. y Norman, L. "Reactivity of human immunoglobulins in echinococcosis and trichinosis." *Amer J Trop Med Hyg*, 17:79-85, 1968.
- (3) Castagnari L., Della S. y Pozzuoli, R. "Sulla distribuzione immunoglobulinica degli anticorpi sierici anti-idatidei." *Boll Ist Sieroter* (Milán) 47: 63-69, 1968.
- (4) Melli, G., Mazzei, D. y Ortolani C. "Caratterizzazione immunologica delle reagine delle idatidosis: osservazione preliminari." *Boll Ist Sieroter* (Milán) 45:497-507, 1966.
- (5) Ishizaka, K., Ishizaka, T. y Lee, E. H. "Physicochemical properties of reaginic antibodies. II. Characteristic properties of reaginic antibody different from human gamma-A-isoheamagglutinin and gamma-D-globulins." *J Allergy* 37:336-349, 1966.
- (6) Binaghi, R. A., Oriol, R. y Boussac-Aron, Y. "Immunogenicity of heterologous Fc and Fab immunoglobulin fragments in rabbits, guinea pigs and rats." *Immunology*, 18: 63-69, 1967.
- (7) Scheidegger, J. J. "Une microméthode de l'immunoelectrophorese." *Int Arch Allergy*, 7:103-110, 1955.
- (8) Kagan, I. G. y Norman, L. "The isolation and characterization of two host antigens in hydatid fluid of *Echinococcus granulosus*." *Amer J Trop Med Hyg* 12:346-357, 1963.
- (9) Avrameas, S. y Ternynck, T. "The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents." *Immunochemistry* 6:53-66, 1969.
- (10) Strejan, G. y Campbell, D. H. "Hypersensitivity to *Ascaris* antigens." *J Immunol* 99:347-356, 1967.
- (11) Singer, S. J., Fothergill, J. E. y Shainoff, J. R. "A general method for the isolation of antibodies." *J Amer Chem Soc* 82:565-571, 1960.

Isolation and characterization of antibodies from sera of human beings infected with *Echinococcus granulosus* (Summary)

Antibodies were isolated from sera of patients with hydatidosis using an immunoabsorbent prepared by cross-linkage of sheep hydatid fluid with glutaraldehyde. The use of immunoabsorbents prepared in this way appears to be a less complicated and more rapid approach, which with certain modifications could find wide application in the study of immunoglobulin responses to parasitic infec-

tion. The eluted antibodies were mostly IgG but some IgA and IgM were also found in the sera of patients. It is interesting to note that the three main classes of immunoglobulins were present, sometimes contaminated by other proteins; in addition, these immunoglobulins were also present in the sera of patients that had not been treated, and the yield of protein was greater in this case.

Isolamento e caracterização de anticorpos em sôros de seres humanos infectados com *Echinococcus granulosus* (Resumo)

Foram isolados anticorpos de sôros de pacientes de hidatidose mediante o emprêgo de um imunoabsorvente preparado por polimerização com glutaraldeído de líquido hidatídico

de ovino. Assim preparado, êsse imunoabsorvente parece menos complicado e mais rápido e na pesquisa da reação imunitária à infecção por parasitos considera-se a possibilidade de

encontrar uma aplicação mais ampla do mesmo, após introduzir algumas modificações. Os anticorpos isolados foram, na sua maioria, de classe IgG, mas também se encontraram IgA e IgM nos sêros dos pacientes. Deve-se assinalar que as três classes de imunoglobulinas estavam um tanto contaminadas com outras pro-

teínas; além disso, é de interesse assinalar também que essas imunoglobulinas estavam presentes igualmente nos sêros de pacientes que não tinham recebido tratamento e que nesse caso foi maior a quantidade de proteínas isoladas.

Isolement et caractérisation d'anti-corps dans les sérums d'individus infectés par *Echinococcus granulosus* (Résumé)

On a isolé des anti-corps de sérums de patients souffrant de hydatidose en utilisant un immuno-absorbant préparé par polymérisation avec de l'aldéhyde glutarique tiré du liquide hydatidique d'ovins. Ainsi préparé, cet immuno-absorbant paraît moins compliqué et agir plus rapidement et, dans la recherche de l'immunité aux infections parasitaires, on considère la possibilité de lui trouver une application plus large après y avoir introduit quelques modifications. Les anti-corps élués ont été de la classe

IgG en majeure partie, mais on en a trouvé des classes IgA et IgM dans les sérums des patients. Il convient de souligner que les trois classes d'immuno-globulines étaient quelque peu contaminées par d'autres protéines; en outre, il est également intéressant de souligner que ces immuno-globulines étaient aussi présentes dans les sérums de patients qui n'avaient pas été soumis au traitement, et que dans ce cas le rendement de protéines éluées a été plus important.