

Cinética de la repuesta serológica del ratón tras la infección primaria experimental con embrióforos de *Echinococcus granulosus*

par J.-M. TORRES RODRIGUEZ * y C. WISNIVESKY

Centro Panamericano de Zoonosis, O.S.P./O.M.S., Buenos Aires, Argentina.

Résumé.

Cinétique de la réponse sérologique dans l'hydatidose expérimentale primaire de la Souris infestée par *Echinococcus granulosus*.

A l'aide des réactions d'agglutination du latex, d'hémagglutination indirecte, de double diffusion sur gel et d'immunoélectrophorèse, la cinétique de la réponse sérologique d'un groupe de souris CF-1, infectées par voie orale avec des embryophores d'*Echinococcus granulosus*, a pu être analysée.

Les anticorps humoraux ont atteint une concentration sérique détectable par immunoélectrophorèse entre le 48^e et le 76^e jour d'infection. Les réactions d'agglutination du latex, de double diffusion et d'hémagglutination, sont devenues positives entre les jours 125 et 144.

Les premiers anticorps formés ont été ceux qui correspondent à l'antigène 5, qu'on avait considéré jusqu'à présent comme spécifique d'*Echinococcus granulosus*.

La corrélation des résultats sérologiques et des données anatomo-pathologiques suggère que l'existence d'hydatides contenant du liquide est une condition préalable à la production d'anticorps humoraux.

Summary.

Kinetics of the serological response in the experimental primary hydatid disease of mice infected with *Echinococcus granulosus* embryophores.

A serological response kinetics study was carried out in CF-1 mice orally infected with *Echinococcus granulosus* embryophores using immuno-electrophoresis, double diffusion, latex agglutination and passive hemagglutination.

* Dirección actual: Instituto Municipal de Investigación Médica, Sección Microbiología y Serología, Paseo Marítimo s/n, Barcelona, España.

Accepté le 14 février 1978.

Starting from the 76th day after the infection, serum antibodies reach the minimum detectable level by immunoelectrophoresis test. Band number 5, now considered as specific for *E. granulosus*, was proved to be the first precipitating system exhibited in this test.

Double diffusion, latex agglutination and passive hemagglutination tests developed positive results later (125-144 days after infection).

Correlation between serologic and anatomo-pathologic findings suggest that hydatid cyst fluid presence in the cysts is necessary for circulating antibodies production.

Introducción

Hasta la fecha solamente se conocen algunos datos aislados sobre la cinética de la respuesta inmune en la hidatidosis experimental (1, 6). Médiante la hemaglutinación Orihara (5) realizó el estudio de la evolución serológica en el ratón después de la infección primaria experimental con huevos embrionados de *Echinococcus multilocularis*.

En un trabajo anterior (2), se demostró que los ratones albinos isogénicos de la cepa «CF-1» eran sensibles a la infección primaria por vía oral al emplear una dosis de 1.000 o más embrióforos de *E. granulosus*. La validez de este modelo experimental hizo posible el estudio de la respuesta inmunológica de estos animales frente a antígenos de diferentes fases evolutivas de *E. granulosus* utilizando técnicas serológicas estandarizadas.

Materiales y métodos

Infección experimental. Un lote de 116 ratones de la cepa «CF-1» fueron infectados por vía oral través de una sonda esofágica con 1.000 embrióforos de *E. granulosus*. Los parásitos grávidos se obtuvieron por infección experimental en perros.

Sueros. A partir del 16° día de la infección y hasta el día 376, se sacrificaron grupos de 4 a 7 ratones a intervalos de 17 a 35 días. Con cada grupo de animales se preparó un pool de suero realizándose a continuación la autopsia de cada ratón con el fin de determinar la presencia de quistes hidatídicos, su localización, número, estado, diametro y presencia de protoescólex en su interior. Este procedimiento se siguió con un total de 90 ratones.

Como controles se utilizaron: a) un pool de sueros obtenidos de 8 ratones sanos y b) otro pool de suero de 12 ratones que a los 120 días de ser infectados según la metodología descrita, al realizar la autopsia no se comprobó la presencia de ningún quiste hidatídico.

También como control se empleó suero hiperinmune anti líquido hidatídico preparado en ovino (3).

Antígenos. Se prepararon antígenos solubles a partir de líquido hidatídico ovino total (LHOT); protoescolex; embrióforos y formas adultas no grávidas de *E. granulosus*.

Los materiales usados para obtener estos antígenos se obtuvieron de quistes hidatídicos procedentes de ovinos infectados naturalmente y de perros a los que se alimentó con 20.000 protoescolices, recogiendo por autopsia los esquinococos adultos (2).

Todos los antígenos fueron preparados en condiciones estandarizadas, según recomendaciones del Centro Panamericano de Zoonosis (4, 9), conservándose por liofilización y utilizándose a una concentración de 200 mg/ml.

Técnicas inmunológicas. Se emplearon las pruebas de aglutinación de látex (AL), hemaglutinación indirecta (HAI) y doble difusión en medio sólido (DD) con antígeno de LHOT, e inmunolectroforesis (IEF) con antígenos solubles de LHOT, escólex, embrióforos y formas adultas, no grávidas, de *E. granulosus*. Las pruebas se realizaron de acuerdo a la metodología recomendada por Guisantes y cols. (3), así como por el Centro Panamericano de Zoonosis (9).

Previamente al desarrollo de esta experiencia, las pruebas se valoraron con los dos grupos de sueros controles. La reactividad fue nula para el grupo de ratones sanos, mientras que el pool de suero de ratones infectados que no desarrollaron hidátides originó una reacción positiva exclusivamente en hémaglutinación indirecta alcanzando un título máximo de 1/16; todas las demás pruebas fueron negativas.

En base a estos resultados se consideraron como positivos todos los pools de sueros cuyos títulos fueron superiores a 1/16 para la HAI y 1/2 para la AL, así como los que presentaron uno o más sistemas precipitantes en DD o IEF. En esta última prueba se tuvo especial cuidado en la identificación del arco 5°, de morfología y disposición característica cuando se aplica la metodología estandarizada (3). En casos dudosos se buscó una reacción de identidad con el suero control de ovino anti-líquido hidatídico.

Resultados

La tabla I muestra la correlación que existe entre el tiempo transcurrido desde la infección y la respuesta serológica a los diferentes antígenos de *E. granulosus*.

Los primeros quistes hidatídicos visibles macroscópicamente se observaron en los ratones sacrificados a los 48 días de la infección. El diametro promedio de estos quistes era de 3 mm.

El siguiente grupo sacrificado el día 76 es el primero en que por IEF se detectaron anticuerpos contra los antígenos de LHOT y escólex; contra éste último la reacción fue más intensa con 3 arcos de precipitación.

Por reacción de identidad con el suero hiperinmune anti LHOT se confirmó que el único sistema detectado en IEF correspondía al arco 5°, que fue observado exclusivamente contra el antígeno de LHOT.

A partir del día 76° todos los sueros mostraron en IEF sistemas precipitantes contra LHOT; solamente en dos de los pools séricos no se observó el arco 5° aunque si otros sistemas precipitantes no caracterizados.

Las pruebas de HAI y AL se positizaron el día 144 de la infección, encontrándose un título de 1/256 para la primera y de 1/16 para el látex. En la misma fecha la doble difusión mostró por primera vez 2 sistemas precipitantes contra LHOT, lo que coincidió con un incremento neto del número de arcos en la IEF.

A partir del día 144 se aprecia un aumento progresivo del título de anticuerpos para la HAI, que oscila entre 1/512 y 1/2.048, sin que se sobrepase este último valor, el que se observó al aparecer en el interior de los quistes las primeras cápsulas prolíferas.

Tabla I. Cinética de la respuesta serológica en la hidatidosis primaria del ratón valorada con antígenos de *Echinococcus granulosus*. Su correlación con los hallazgos necropsicos. Técnicas empleadas: Inmunolectroforesis, doble difusión (DD); látex y hemaglutinación indirecta (HAI).

GRUPO DE RATONES	Nº DE ANIMALES	TIEMPO DE INFECCIÓN (DÍAS)	HALLAZGOS NECROPSICOS	INMUNOELECTROFORESIS ¹⁾				D.D. ¹⁾ L.H.	LATEX ²⁾ L.H.	H.A.I. ³⁾ L.H.
				L.H.**	ESCOLEX	EMBRIOF.	E. gran.			
1	7	16	-	0	0	0	0	0	0	0
2	7	34	-	0	0	0	0	0	0	0
3	4	48	QUISTES DE 3mm. diámetro	0	0	0	0	0	0	0
4	7	76	-	1(5)	3	0	0	0	0	0
5	4	110	-	1(5)	0	0	0	0	0	0
6	7	125	ALTA MORTALIDAD (15 ANIMALES)	c.i. ³⁾	c.i. ³⁾	c.i.	c.i.	0	0	0
7	7	144	-	4(5)	3	0	0	2	1/16	1/256
8	7	161	-	3(5)	1	0	c.i.	2	1/4	1/512
9	6	195	PRESENCIA DE PROTOESCOLEX	2	1	c.i.	c.i.	2	1/8	1/1024
0	6	227	-	c.i.	c.i.	c.i.	c.i.	0	0	1/1024
11	7	262	-	3(5)	4	1	c.i.	2	1/8	1/2048
12	5	285	-	5(5)	8	1	c.i.	2	1/8	1/1024
13	7	318	INFECTANTES AL PERRO	3(5)	1	0	0	0	0	1/1024
14	7	348	-	3(5)	5	0	c.i.	2	1/16	1/2048
15	6	376	-	2	c.i.	0	c.i.	2	1/8	1/512

* Presencia del arco 5° (Capron et al. 1967).

1) Expresado en número de sistemas precipitantes. 3) c.i. = Cantidad insuficiente

** Líquido Hidatídico.

2) Expresado en título serológico.

de suero.

En la AL, los títulos variaron entre 1/4 y 1/16 (fig. 1). Dos pools de suero correspondientes a los días 227 y 318, resultaron negativos para esta prueba y para la doble difusión en tanto que ambos presentaron un título alto en la HAI y uno de ellos (día 318) también mostró en IEF sistemas precipitantes contra los antígenos de escólex y LHOT, incluyendo el arco 5°.

Lamentablemente la escasez de suero impidió que se valorara la respuesta serológica a los antígenos preparados a partir de embrióforos y formas adultas de *E. granulosus* en todos los pools séricos. Solamente 12 pools se estudiaron en IEF contra antígeno de embrióforo y unicamente 7 fueron enfrentados al antígeno de *E. granulosus* adulto.

En este número limitado de pruebas solamente 2 de los pools presentaron arco (1) de precipitación contra los embrióforos y ninguno mostró anticuerpos precipitantes para *E. granulosus* adulto.

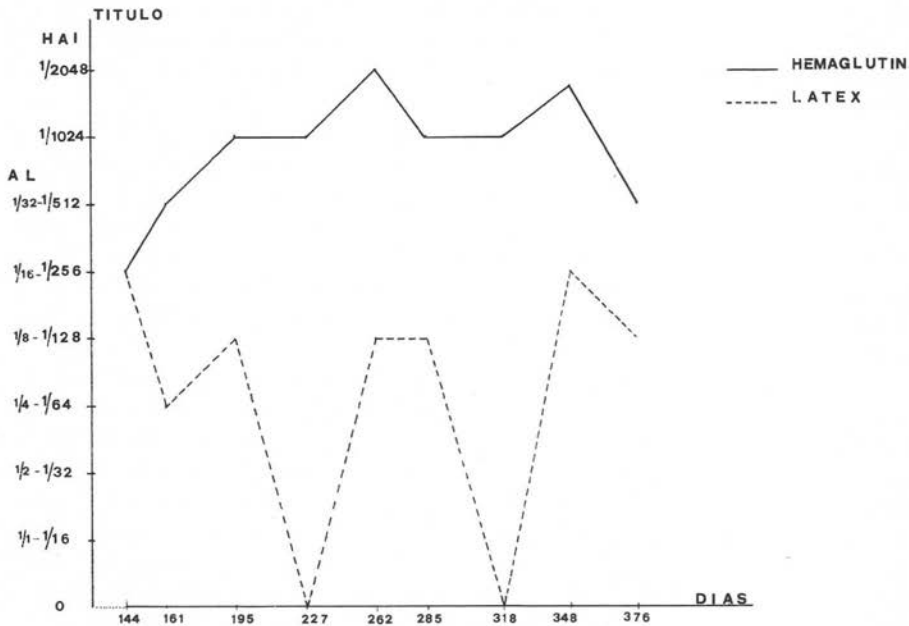


Fig. 1. Evolución en el tiempo de los títulos de hemaglutinación indirecta y aglutinación de latex con antígeno de líquido hidatídico, en la hidatidosis primaria experimental del ratón.

Discusión

El modelo experimental descrito ha permitido estudiar la cinética de la respuesta inmune humoral en el ratón durante el curso de la hidatidosis primaria, aproximándose a los que sucede en el curso de la infección natural.

Debido al empleo de diversos antígenos hidatídicos y de varias pruebas serológicas se planteó la necesidad de recurrir a los « pools » de suero por lo que no fue posible estudiar la respuesta inmunológica individual; por este motivo no se puede descartar que en algunos animales aislados exista una respuesta serológica más precoz.

Entre los días 48 et 76 de la infección aparecen los primeros anticuerpos detectables únicamente por IEF (día 76). En contra de lo esperado las reacciones de hemaglutinación indirecta y de latex resultaron negativas hasta el día 144 en que se hallaron títulos serológicos elevados. La mayor sensibilidad de estas dos pruebas frente a las de inmunoprecipitación puede ser igualada o aun superada con el empleo de sueros concentrados por liofilización (1/3 del volumen inicial), según la metodología recomendada para la IEF.

Los primeros anticuerpos detectados no estaban dirigidos contra los antígenos de embrióforo sino contra LHOT y el antígeno soluble de escólex. Esto podría atribuirse a la menor capacidad inmunogénica de los embrióforos; a favor de esta hipótesis está la dificultad que existe para obtener sueros hiperinmunes en conejos contra este antígeno. Por otra parte la rápida evolución hacia la vesiculización impediría un estímulo antigénico persistente.

Por otra parte no se puede descartar que algunos ratones considerados individualmente produjeran anticuerpos contra los embrióforos, pero al prepararse el pool de sueros, se produciría una dilución importante del supuesto positivo.

El primer y único sistema precipitante contra LHOT, que se detecta a partir del día 76 corresponde al arco 5°, reconocible por su morfología característica y por una reacción de identidad total con un suero anti líquido hidatídico de referencia; simultáneamente también se observaron otros 3 arcos de precipitación contra antígeno de escólex.

Los primeros quistes hidatídicos macroscópicamente visibles aparecen el día 48 siendo *no fértiles* en su totalidad ya que hasta 3 meses más tarde no se aprecian cápsulas prolíferas; esto sugiere que para que se desencadene la respuesta inmune humoral es necesaria la formación previa de la hidátide incluyendo su líquido hidatídico. La reacción contra el antígeno de escólex se debería a las comunidades que existe entre ésta el líquido hidatídico comprobado en otros trabajos (1, 7).

El arco 5° descrito por Caprón y cols. (1) se produjo exclusivamente contra líquido hidatídico, resultado que coincide con los obtenidos por Varela-Díaz y Torres (7) quienes por métodos de inmunoprecipitación no encontraron el arco 5° con antígenos solubles de escólex, membrana germinativa y membrana laminar, pero sí contra líquido hidatídico de quistes ovinos tanto fértiles como estériles.

Trabajos posteriores (8, 11) demuestran que el antígeno responsable del arco 5° (antígeno 5) es compartido por la membrana germinativa y el tegumento y parénquima de los protoescolex, así como por *E. multilocularis* otros cestodos vecinos como *Taenia hydatigena* (8).

Capron y cols (1) han señalado la presencia del arco 5° en el hamster después de la 4a semana de la inoculación intraperitoneal de escólex. La aparición más precoz de la respuesta serológica puede atribuirse al modelo experimental empleado, en particular por el uso de escólex, antigénicamente más activos que los embrióforos con mayor rapidez evolutiva hacia la vesiculización que estos últimos.

La negatividad hallada en la prueba de látex y doble difusión para los pools de los días 227 y 318, seguramente es producto de un artefacto técnico, no pudiéndose

verificar estos resultados por la falta de suero suficiente. A favor de que se trate de resultados falsos negativos está el hecho de que ambos pools fueron positivos con las otras pruebas (IEF y HAI); asimismo las muestras inmediatamente anteriores y posteriores resultaron positivas tanto en AL como en DD.

La carencia de estudios sobre las relaciones antigénicas que existen entre los diferentes estados evolutivos de *E. granulosus*, impide extraer conclusiones respecto a la negatividad de los sueros enfrentados a los antígenos solubles del parásito adulto.

La brusca positividad de la DD, HAI y AL, con títulos elevados desde el comienzo, se correlaciona con la rotura de quistes hidatídicos de localización hepática y pulmonar, producida unos 20 días antes, y que ocasionó una elevada mortalidad de ratones. La liberación de antígenos hidatídicos al romperse los quistes determinarían una respuesta serológica secundaria, la que en IEF se tradujo por un claro incremento del número de sistemas precipitantes.

Conclusión

Mediante el empleo de técnicas estandarizadas de hemaglutinación indirecta, aglutinación de látex, doble difusión e inmunoelectroforesis se analizó la cinética de la respuesta serológica en el ratón « CF-1 » infectado por vía oral con embrióforos de *Echinococcus granulosus*.

Los anticuerpos séricos alcanzan una concentración detectable por inmunoelectroforesis entre los días 48 y 76 de la infección, correspondiendo al arco 5° que hasta la fecha se había considerado específico de *E. granulosus*.

Las reacciones de hemaglutinación, látex y doble difusión se positivizaron entre los días 125 y 144.

La respuesta serológica se correlaciona con las observaciones anatómo-patológicas procedentes de las necropsias de los ratones infectados. Los datos obtenidos sugieren que la presencia de hidátides formadas, conteniendo líquido hidatídico, es una condición previa para la producción de anticuerpos.

AGRADECIMIENTOS

Hacemos presente nuestro agradecimiento al Dr. Luis A. Yarzabal, del Centro de Micrología Médica (Venezuela) y al Prof. Dr. Amadeo Foz-Tena (Universidad Autónoma de Barcelona) por su valiosa colaboración al revisar críticamente el presente trabajo.

Bibliografía

1. Capron A., Vernes A., Biguet J. (1967): Le diagnostic immunoelectrophorétique de l'hydatidose. In Le kyste hydatique du foie. Journées Lyonnaises d'hydatidologie. Simep, Lyon, p. 27.

2. Coli C. W., Schantz P. M. (1974): Growth and development of *Echinococcus granulosus* form embryophores in an abnormal host (*Mus musculus*). *J. Parasitol.*, 60, 53.
 3. Guisantes J. A., Yarzabal L. A., Varela-Diaz V. M., Ricardes M. I., Coltorti E. (1975): Standardization of the immunoelectrophoresis test with whole and purified hydatid cyst fluid antigens for the diagnosis of human hydatidosis. *Rev. Inst. Med. trop. Sao Paulo*, 17, 69.
 4. Torres Rodriguez J.-M. (1976): Valoración de los métodos para el diagnóstico inmunológico de la hidatidosis humana. *Med. Clin.*, 66, 298.
 5. Orihara M. (1969): Studies on Echinococcosis. Changes of serum titers in mice infected experimentally with *E. multilocularis*. *Jap. J. Vet. Res.*, 17, 121.
 6. Pauluzzi S. (1969): Serologic response of mice and rats to secondary experimental hydatid disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 18, 7.
 7. Varela-Diaz V. M., Torres J. M. (1977): Antigenic characterization of *Echinococcus granulosus* cysts. *Boll. Sieroter. Milanese*, 56, 303.
 8. Varela-Diaz V. M., Coltorti E. A., Rickard M. D., Torres J. M. (1977): Comparative antigenic characterisation of *Echinococcus granulosus* and *Taenia hydatigena* fluids by immunoelectrophoresis. *Res. Vet. Sci.* 23, 1.
 9. Varela-Diaz V. M., Yarzabal L. A. (1972): Técnicas de laboratorio para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis. Centro Panamericano de Zoonosis. OSP/OMS Buenos Aires.
 10. Yarzabal L. A., Bout D. T., Naquira F., Capron A. (1977): Further observations on the specificity of antigen 5 of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol.* 63, 495.
 11. Yarzabal L. A., Dupas L. H., Bout D., Capron A. (1976): *Echinococcus granulosus*. Distribution of hydatid fluid antigens in tissues of the larval stage. I. Localization of the specific antigen of hydatid fluid. *Exp. Parasitol.* 40, 391.
-