

EVALUACIÓN INMUNOENZIMÁTICA DE IGE SÉRICA EN ONCOSERCOSOS DE CHIAPAS, MÉXICO

ELIA PEDROZA JURADO,¹ CONRADO MARTÍNEZ TRUJILLO,¹ ANGÉLICA OCAMPO LUJANO,²
JOSÉ GUADALUPE HUERTA LÓPEZ,²

Pedroza-Jurado E, Martínez-Trujillo C,
Ocampo-Lujano A, Huerta-López JG.
Evaluación inmunoenzimática de IgE sérica
en oncosercosos de Chiapas, México.
Salud Publica Mex 1989;31:772-778

Pedroza-Jurado E, Martínez-Trujillo C,
Ocampo-Lujano A, Huerta-López JG.
Immunoenzymatic evaluation of serum IgE in onchocerciasis
patients from Chiapas, Mexico.
Salud Publica Mex 1989;31:772-778

RESUMEN:

Se midieron concentraciones séricas de IgE total por el método inmunoenzimático Phadezym-PRIST en sueros de 60 individuos oncosercosos de Chiapas, México. El título de IgE total fue significativamente mayor cuando se comparó al obtenido de sueros control de individuos aparentemente sanos. Para estimar el título de anticuerpos IgE que reaccionan con antígenos de *Onchocerca volvulus* y eliminar la reactividad cruzada con antígenos de otros helmintos, seis sueros de individuos oncosercosos se incubaron con una mezcla de extractos antigénicos de *Onchocerca gutturosa*, *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* y *Fasciola hepática*, los cuales estaban acoplados a sefarosa 4B. Posteriormente los sueros se incubaron con un extracto antigénico de *O. volvulus* acoplado a sefarosa 4B. La diferencia entre los títulos de IgE sérica, antes y después de la incubación con antígenos heterólogos y homólogos, sugiere que la IgE dirigida contra antígenos de gusanos adultos de *O. volvulus* varía entre 20 y 65 por ciento del título de IgE sérica total.

Palabras clave: oncosercosis, IgE, serología

ABSTRACT:

Concentrations of total serum IgE were measured by an immunoenzymatic assay (Phadezym-PRIST) in 60 mexican onchocerciasis patients. In order to detect IgE antibodies against adult *Onchocerca volvulus* antigens, separately six onchocerciasis sera were depleted of IgE antibodies by using a mixture of *Onchocerca gutturosa*, *Ascaris suum* and *Fasciola hepática* antigenic extracts coupled with sepharose 4B. Additionally, the sera were incubated with an adult *O. volvulus* antigenic extract coupled with sepharose 4B. The differences found between the IgE levels before and after incubation with heterologous antigens show that the median IgE value against *O. volvulus* adults antigens varies between 20 and 65 percent of the total serum IgE.

Key words: onchocerciasis, IgE, serology

Solicitud de sobretiros: Dra. Elia Pedroza Jurado. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. Apdo. Postal 63, C.P. 29290, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.

(1) Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste (CIES), San Cristóbal de las Casas, Chiapas.

(2) Servicio de Alergia, Instituto Nacional de Pediatría (INP), México, D.F.

Fecha de recibido: 6 de octubre de 1988 Fecha de aprobado: 9 de noviembre de 1989

LA ONCOCERCOSIS ES una enfermedad crónica, de evolución lenta, cuyo agente causal es el nemátodo *Onchocerca volvulus*. Actualmente el diagnóstico de esta enfermedad se realiza con base en la confirmación microscópica de microfílas (MF) en biopsias de piel, y la presencia de nódulos oncocercosos. También se reporta el uso de dietil carbamazina para inducir la reacción de Mazzotti¹ y de la prueba de Prauznitz-Küstner, usando antígeno de la filaria.² Por otra parte, en pruebas de piel se han utilizado antígenos heterólogos;³ sin embargo, entre las pruebas dérmicas y los métodos inmunológicos *in vitro* existe la evidencia de que la sensibilidad y especificidad en la detección de los anticuerpos IgE específicos de *O. volvulus*, en individuos con oncocercosis, puede aumentar significativamente con el uso de antígenos homólogos.³⁻⁶

Un problema que se presenta en el inmunodiagnóstico de esta enfermedad es la gran reactividad cruzada que existe, ya que los anticuerpos de oncocercosos reconocen diferentes alérgenos de extractos antigénicos de *O. volvulus*, muchos de los cuales están presentes en otros helmintos.⁶

Las homologías entre los antígenos de helmintos es la causa de inducción de anticuerpos que reaccionan en forma cruzada, lo cual origina un problema cuando se trata de obtener un antígeno específico de un helminto determinado.⁷⁻¹⁰

Por muchos años se ha reconocido la capacidad de los helmintos para inducir reacciones de hipersensibilidad mediada por reagentes,¹¹⁻¹⁴ siendo un ejemplo el género *Ascaris*, excepcionalmente activo en inducir títulos elevados de IgE en una proporción muy alta en individuos expuestos al parásito^{12,15} y se ha reportado que la respuesta de IgE a *O. volvulus* es más específica del parásito que la respuesta de IgG,⁶ ya que la respuesta de IgE está restringida y dirigida hacia antígenos no reconocidos por anticuerpos que reaccionan con gran variedad de antígenos nemátodos.^{9,16,17}

Debido a que la respuesta de IgE muestra menos reactividad cruzada en su inducción por antígenos de helmintos, se cuantificaron los niveles totales de IgE sérica de 60 individuos oncocercosos, y en seis de estos sueros se determinó la IgE dirigida contra antígenos de *O. volvulus*.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 60 individuos oncocercosos con un inter-

valo de edades de 3 a 38 años, de los cuales se obtuvieron biopsias dobles de las áreas izquierda y derecha de la escápula, deltoides y cresta iliaca, con la ayuda de un esclerocornotomo.

Sueros: se colectaron los sueros de 60 individuos oncocercosos habitantes del municipio de Huixtla, Morelos y en el foco endémico sur de la oncocercosis en el estado de Chiapas, México. Los sueros se conservaron y transportaron en nitrógeno líquido, posteriormente se descongelaron una sola vez, para dividirse en alícuotas y conservarse a -70°C. Se obtuvieron sueros de control de 30 individuos aparentemente sanos con un intervalo de edad de 13 a 15 años, quienes no han vivido en áreas donde ocurre la transmisión de la oncocercosis, sin antecedentes familiares de atopia y examen coproparasitológico negativo al momento del estudio.

Determinación de IgE sérica total: se determinó usando la prueba inmunoenzimática Phadezym-PRIST (Pharmacia, Suecia). Los resultados se expresaron en Unidades Internacionales (UI) por milímetro.

Antígenos: se obtuvieron los gusanos adultos de nódulos subcutáneos de oncocercosos, los cuales se mantuvieron en nitrógeno líquido desde el momento de excisión hasta que llegaron al laboratorio, donde se conservaron a -70°C. La digestión de los nódulos se llevó a cabo siguiendo la técnica de Schulz-Key,¹⁸ los nódulos se incubaron en solución reguladora de salina fosfatada (PBS) 0.15 M, adicionada de 5mg/ml de colagenasa tipo II obtenida de *Clostridium histolyticum* (Sigma, USA) y 1mM de cloruro de calcio. Los gusanos que se obtuvieron, se lavaron y separaron de los tejidos del hospedero, utilizando para ello PBS pH 7.2, adicionado momentos antes de usarse, de 1mM de fenilmetil-floruro de sulfonilo (PMSF), 0.135 mM de cetona HCl-N- α -p-tosil-L-lisina clorometilada (TLCK) y 0.142 mM de cetona de L-1-p-Tosilamida-2-fenil-etilclorometil (TPCK) (Sigma, USA).

Después de lavarse los gusanos se maceraron en un homogenizador Dounce; enseguida el homogenado obtenido se centrifugó a 50 000 xg durante 1 h a 4°C en una centrífuga marca Beckman modelo J-21c. Posteriormente el sobrenadante se dializó contra PBS adicionado de inhibidores enzimáticos por 16 hs a 4°C, luego de lo cual se centrifugó a 48 000 xg a 4°C durante 1 h. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry.¹⁹ Los antígenos solubles se acoplaron a sefarsa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia, Suecia), de acuerdo con las instrucciones del proveedor, en proporción de 4 mg de proteína por ml de gel hidratado.

O. gutturosa: se obtuvieron gusanos adultos a partir de ligamentos de reses infectadas; se lavaron con PBS y se conservaron a -70°C .

A. lumbricoides: se obtuvieron gusanos adultos a partir de individuos habitantes de la zona endémica de oncocercosis, se lavaron con PBS y se conservaron a -70°C .

A. suum: se obtuvieron gusanos adultos a partir de cerdos en el rastro de la ciudad de México, los cuales se lavaron con solución salina 0.15 M, y se transportaron en hielo seco al laboratorio donde se conservaron a -70°C .

F. hepática: se obtuvieron gusanos adultos a partir de reses en el rastro de la ciudad de México, se lavaron con solución salina 0.15 M y se transportaron en hielo seco al laboratorio donde se conservaron a -70°C .

La preparación de los antígenos solubles de estos parásitos siguió el mismo procedimiento empleado para la preparación de los antígenos de *O. volvulus*.

PREPARACION DE INMUNOADSORBENTES

Cada preparación antigénica se acopló, en forma individual, al gel de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno en una relación de 4 mg de proteína por ml de gel hidratado siguiendo las instrucciones del proveedor. Aproximadamente el 95 por ciento de las proteínas solubles se acoplaron al gel, ya que se determinaron proteínas antes y después del acoplamiento.

Los inmunoabsorbentes preparados, se conservaron en PBS adicionado de 0.05 por ciento de azida de sodio a 4°C ; antes de usar los inmunoabsorbentes, estos se lavaron con PBS sin azida de sodio.

ADSORCION DE IGE CON ANTIGENOS HETEROLOGOS

Con la finalidad de eliminar los anticuerpos que pudiesen reaccionar en forma cruzada con los Ags de *O. volvulus*, los sueros diluidos 1:50 se adsorbieron por dos horas en agitación rotatoria a temperatura ambiente con la mezcla de inmunoabsorbentes preparados a partir de antígenos *O. gutturosa*, *A. lumbricoides*, *A. suum* y *F. hepática*; la dilución final se llevó en 1:100 en la solución para diluir suero del equipo de Phadezym-PRIST (Pharmacia) después de lo cual se cuantificó la IgE por la técnica de Phadezym-PRIST (Pharmacia). Otra alícuota del suero pre-incubado con la mezcla de adsorbentes de parásitos se incubó con un adsorbente de *O. volvulus* en relación de 50ul de suero diluido 1:50 por 300 ug de antígeno. La dilución final se ajustó 1:100. Se calculó la IgE remanente

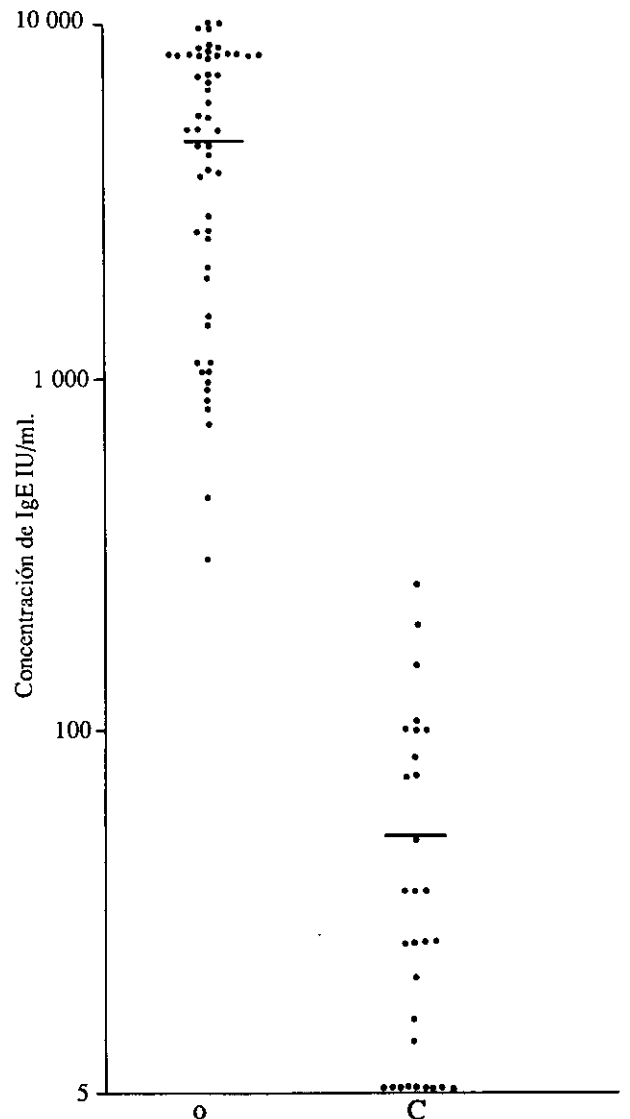


FIGURA 1. Valores de IgE total para individuos oncocercosos (o) y controles sanos (C). La barra indica la MG

después de la depleción con antígenos heterólogos y homólogos, como un porcentaje de la IgE total antes de la incubación con el coctel de Ags de la misma dilución (1:100).

ANALISIS ESTADISTICO

Debido a que los valores de las variables analizadas no se

distribuyen normalmente, se usaron pruebas de rangos para el análisis de los resultados (prueba de U de Mann-Whitney). Para la IgE sérica se calculó la media geométrica (MG).

RESULTADOS

CUANTIFICACION DE LA IgE SERICA TOTAL

Se encontró muy elevada la IgE sérica total en el suero de los individuos oncocercosos (3 442 UI/ml) con valores extremos de 308 a 10 000 UI/ml; la diferencia con

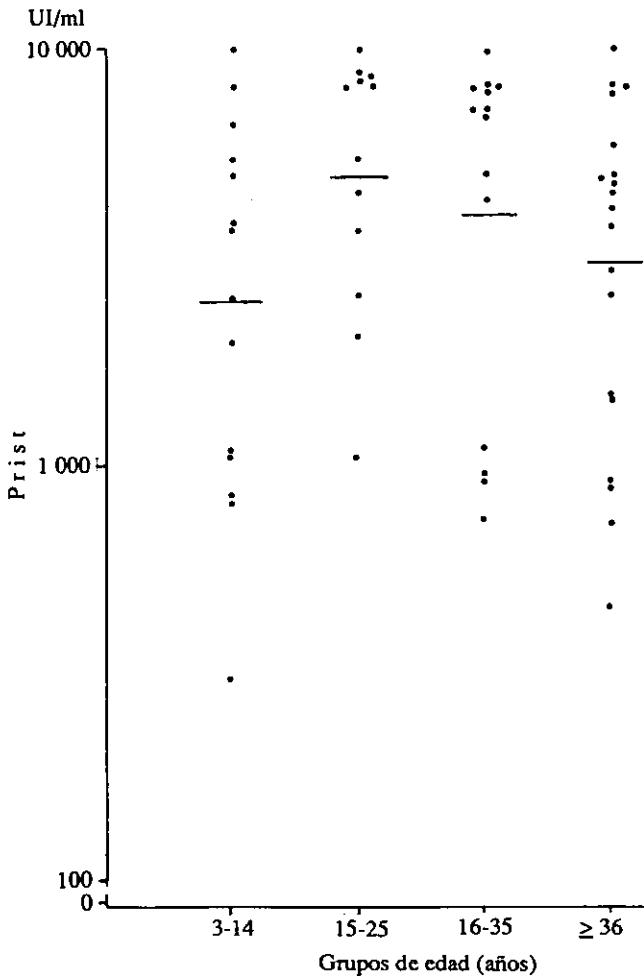


FIGURA 2. Valores de IgE total para diferentes grupos de edad. La barra horizontal indica la MG

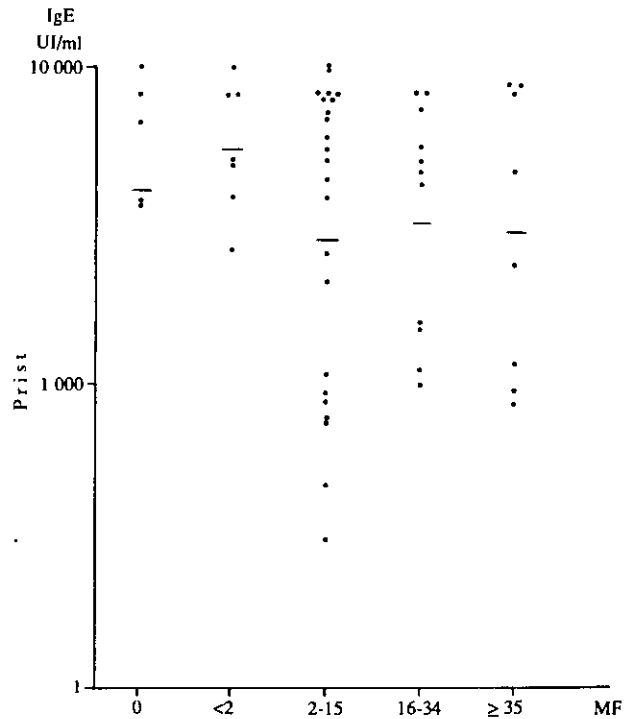


FIGURA 3. Cuenta de microfilarias (MF) en biopsias de piel relacionadas con títulos de IgE total. La barra indica la MG

respecto a los niveles de IgE total de sueros de individuos mexicanos, aparentemente sanos, fue significativa (25 UI/ml; $p < 0.0001$) (figura 1).

No se encontró diferencia significativa entre hombres y mujeres con respecto a los niveles séricos totales de IgE. En cuanto a edad y título de la IgE, tampoco se encontró diferencia estadística significativa (figura 2); sólo en seis sueros de individuos menores de 10 años, negativos a microfilarias, en la biopsia de la piel, se encontraron los niveles de IgE muy elevados (figura 3). La cuenta de microfilarias se mantiene muy baja en niños menores de ocho años; después de esta edad se observa un aumento, que no es significativamente diferente entre los distintos

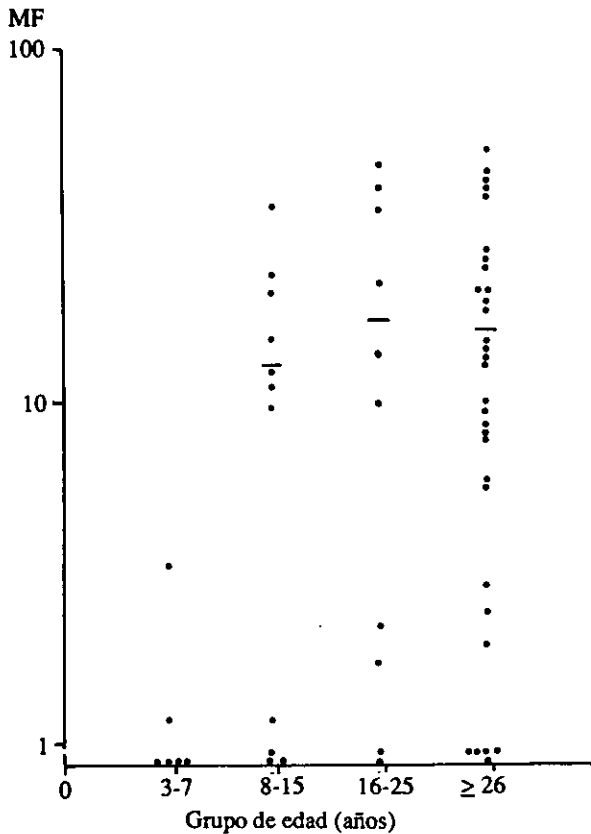


FIGURA 4. Relación de diferentes grupos de edad y número de microfilarias (MF). La barra indica la MG

grupos de edad (figura 4). Respecto al sexo no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre títulos de IgE total y cuenta de microfilarias.

CUANTIFICACION DE IgE ESPECIFICA

La IgE que reacciona con la mezcla de antígenos heterólogos fluctúa entre el 5 y 33 por ciento (cuadro I), en tanto que la IgE que reacciona con los antígenos de *O. volvulus*, varía entre 20 y 65 por ciento con respecto a la IgE total.

DISCUSION

Actualmente el estudio de antígenos helmintos en la inducción de IgE no ha sido suficientemente explotado,

CUADRO I IgE sérica total y específica de antígenos de <i>O. volvulus</i>		
Suero Nº	IgE inespecífica* (%)	IgE- <i>O. volvulus</i> ** (%)
1	20	65
2	5	22
3	26	37
4	20	20
5	27	39
6	33	48

*Los sueros se pre-incubaron con una mezcla de antígenos heterólogos. El porcentaje corresponde a la diferencia entre las determinaciones de IgE total antes y después de la adsorción.

**Suero pre-adsorbido con antígenos heterólogos y posteriormente con antígenos de *O. volvulus*; el porcentaje corresponde a la diferencia entre la IgE total y la que se detectó después de la adsorción con *O. volvulus*.

ya que generalmente la elevación de este anticuerpo se relaciona con procesos alérgicos tales como la fiebre de heno, asma, dermatitis atópica etcétera,^{20,21} en tanto que pasa desapercibida la elevación en la concentración de IgE y su relación con ciertas parasitosis.^{22,23}

El interés en cuantificar los títulos de IgE en oncosercosos mexicanos, reside en que este anticuerpo muestra menor reactividad cruzada que IgE e IgM al ser inducidos por inmunógenos de helmintos, lo cual es una ventaja para tratar de aislar un antígeno que sea específico de *O. volvulus*, por lo que parte de este trabajo es preliminar para tal objeto.

Los resultados en el presente estudio concuerdan con las implicaciones de las enfermedades parasitarias por helmintos como una causa de la elevación de la IgE sérica.

En estos resultados se observa una marcada elevación en la respuesta de IgE en aquellos individuos con títulos bajos de microfilarias, con respecto a los que presentan títulos altos (figura 3). En otros estudios se ha reportado que los niveles de IgM e IgG son mayores en individuos oncosercosos con títulos bajos de microfilarias con res-

pecto a los que presentan títulos altos,²⁵ lo cual parece indicar que en individuos jóvenes con oncocercosis, el sistema inmunológico reacciona a los inmunógenos de *O. volvulus*, reflejándose en un título bajo de microfilarias (figura 3). Sin embargo, la respuesta total de IgE es la suma de la respuesta específica e inespecífica de un inmunógeno determinado, y en el caso de helmintos, además de estimular una respuesta específica al parásito, son capaces de inducir la formación del factor potenciador de IgE hacia antígenos diferentes a los de helmintos, inmunizando con el antígeno deseado y posteriormente

infectando con un helminto.^{14,26} Son varios los factores que intervienen para determinar el isotipo de inmunoglobulina, y la forma en que interactúan no ha sido esclarecida completamente; además de la protección al parásito y en algunos casos la patología tienen una estrecha relación con la respuesta inmune humoral y/o celular inducida por inmunógenos relevantes del mismo. Por otra parte es necesario conocer las características de los antígenos específicos de especie en estos parásitos, ya que son parte fundamental para el diagnóstico específico de las enfermedades originadas por helmintos.

REFERENCIAS

1. Francis H, Awadzi k, Ottesen EA. The Mazzotti reaction following treatment of onchocerciasis with diethylcarbamazine: clinical severity as a function of infection intensity. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:529-536.
2. Ulrich M, Pinaridi ME, Convit J. Immunological reactions in onchocerciasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970;64:111-115.
3. Mueller JC, Mitchell DW, García Monza GF, Aguilar FJ, Scholtens RG. Evaluation of a skin test for onchocerciasis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 1973;22:337-342.
4. Schiller EL, D'Antonio R, Figueroa-Marroquín H. Intradermal reactivity of excretory and secretory products of onchocercal microfilariae. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:1215-1219.
5. Ngu JL, Ndumbe PM, Titanji V, Leke RA. A diagnostic skin test for *Onchocerca volvulus* infection. *Tropenmed Parasitol* 1981;32:165-170.
6. Weiss N, Hussain R, Ottesen EA. IgE antibodies are more species specific than IgG antibodies in human onchocerciasis and lymphatic filariasis. *Immunology* 1982;45:129-137.
7. Forsyth KP, Copeman DB, Anders RF, Mitchell GF. The major radioiodinated cuticular antigens of *Onchocerca gibsoni* microfilariae are neither species nor onchocerca specific. *Acta Trop (Basel)* 1981;38:348-452.
8. Kaushal NA, Hussain R, Ottesen EA. Excretory and somatic antigens in the diagnosis of human filariasis. *Clin Exp Immunol* 1984;56:567-576.
9. Lobos E, Weiss N. Identification of non-cross-reacting antigens of *Onchocerca volvulus* with lymphatic filariasis serum pools. *Parasitology* 1986;93:389-399.
10. Selkirk ME, Denham DA, Partono F, Sutanto I, Maizels RM. Molecular characterization of antigens of lymphatic filarial parasite. *Parasitology* 1986;91:S15-S38.
11. Ogilvie Bm. Reagin-like antibodies in animals immune to helminth parasites. *Nature* 1964;204:91-92.
12. Johansson SGO, Melbint T, Vahlquist B. Immunoglobulin levels in Ethiopian preschool children with special reference to high concentrations of immunoglobulin E (IgND). *Lancet* 1986;1:1118-1121.
13. Sadun EH, Mota I, Gore RW. Demonstration of homocytotropic antibodies in mice and rabbits infected with *Trichinella spiralis*. *J Parasitol* 1986;54:814-821.
14. Jarret EEE, Miller HRP. Production and activities of IgE in helminth infection. *Prog Allergy* 1982;31:178-233.
15. Dobson C, Morseth DJ, Soulsby E. Immunoglobulin E-type antibodies induced by *Ascaris suum* infections in guinea pigs. *J Immunol* 1971;106:128-133.
16. Cabreara Z, Cooper MD, Parkhouse RME. Differential recognition patterns of human immunoglobulin classes to antigens of *Onchocerca gibsoni*. *Tropenmed Parasitol* 1986;37:113-116.
17. Lobos E, Weiss N. Immunochemical comparison between worm extracts of *Onchocerca volvulus* from savanna and rain forest. *Tropenmed Parasitol* 1985;7:333-347.

18. Schulz-Key H, Albiez EJ, Büter DW. Isolation of living adult *Onchocerca volvulus* from nodules. *Tropenmed Parasitol* 1977;28:428-430.
19. Lowry OH, Rosebrough AL, Farr RJ, Randall J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
20. Zatterstrom O, Johansson SGO. IgE concentrations measured by PRIST in serum of healthy adults and in patients with respiratory allergy. *Allergy* 1981;36:537-547.
21. Kuno-Sakai H. Total serum IgE and specific IgE antibodies in children with bronchial asthma. *Ann Allergy* 1986;56:488-491.
22. Hogarth-Scott RS, Johansson SGO, Benich H. Antibodies to toxacara in the sera of visceral larva migrans patients: The significance of raised levels of IgE. *Clin Exp Immunol* 1969;5:619-625.
23. Kojima S, Yokogawa M, Tada T. Raised levels of IgE in human helminthiasis. *Am J Trop Med Hyg* 1972;21:913.
24. Howba V, Rowe DS. A comparison of African and European serum levels of immunoglobulin E. *Bull WHO* 1973;49:539-545.
25. Büter DW, Laer GV, Mannweiler E, Bütner M. Clinical, parasitological and serological studies on onchocerciasis in the Yemen Arab Republic. *Tropenmed Parasitol* 1982;33:201-212.
26. Ishizaka K. IgE binding factors and regulations of the IgE antibody response. En: Paul WE, Fathman, CG, Germain R, Metzger H (eds). *Annu Rev Immunol* 1988;6:513-534.