

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

LA RESPUESTA INMUNE A

TRICHINELLA SPIRALIS

(RESUMEN)

de

Tesis para optar al grado de Doctor en Med. Veterinaria

SILVIA IRENE CERONE

Director: A. E. PARMA

- 1983 -

ABREVIATURAS

AcH ₁₀₀	: unidad anticuerpo hemolítico 100%
CH ₁₀₀	: unidad complemento hemolítico 100%
c.s.p.	: cantidad suficiente para
c. p. m.	: cuentas por minuto
DNP	: dinitro fenol
DO	: densidad óptica
F (ab) ₂	: fragmento bivalente con actividad anticuerpo proveniente de una molécula de IgG.
F _c	: fragmento cristalizante sin actividad anticuerpo proveniente de una molécula de IgG.
GR	: glóbulos rojos
°C	: grado centígrado
g	: gramo
IgE	: inmunoglobulina E
IgG	: inmunoglobulina G
IgM	: inmunoglobulina M
kg	: kilogramo
M	: molar
mg	: miligramo
ml	: mililitro
μl	: microlitro
μg	: microgramo
'	: minuto
N	: normal

H	: hemolisina
nm	: nanómetro
r. p. m.	: revoluciones por minuto
.x g	: aceleración de la gravedad
^{51}Cr	: $^{51}\text{Cromo}$ (radiactivo)
μCi	: micro Curie
s. c.	: subcutáneo

RESUMEN

Un lote de ratas blancas cepa Wistern se infestaron con Trichi-
nella spiralis por vfa digestiva. Elaboraron anticuerpos que persistieron hasta el fi-
nal del experimento.

Se los caracterizó como pertenecientes a la clase IgG₁ com-
probándose la existencia de dos poblaciones: una aglutinante y otra no aglutinan-
te o bloqueante de los que fueron estudiadas sus propiedades inmunoquímicas y bio-
lógicas (fijación de complemento, anafilaxia cutánea pasiva, citotoxicidad anticuer-
po dependiente).

La evolución del título de anticuerpos fue seguida por precipi-
tación, aglutinación, hemaglutinación y reacción de Coombs. Los anticuerpos aglu-
tinantes fueron capaces de aglutinar al antígeno, fijar complemento y mostraron ma-
yor capacidad para facilitar la agresión y lisis de los glóbulos rojos soporte del antí-
geno, a diferencia de los coaglutinantes. Solo los coaglutinantes se unieron a piel
heteróloga (ratón) y ambos facilitaron la citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Al mismo tiempo se exploró la respuesta inmunológica celular
mediante ensayos de blastogénesis.

En base a estos resultados es posible afirmar que la inmunidad

humoral y celular desarrollada por la triquinosis en ratas infestadas experimentalmente no alcanza a proteger al huésped antes de que se cumpla la migración larval, quedando ésta relegada a estadios posteriores de enquistamiento y muerte del parásito.

STUDY OF IMMUNITY RESPONSE TO TRICHINELLA SPIRALIS

S U M M A R Y

A group of Wistar rat were infected with Trichinella spiralis by digestive tract.

Animals synthesized antibodies which persisted until the end of experiment. Isolated and characterized they showed belong to IgG₁ subclass.

Two species of antibodies were found, agglutinating and non-agglutinating. Their immunochemical and biological properties were studied (complement fixation, passive cutaneous anaphylaxis, antibody dependent cell cytotoxicity).

Antibody titration was made by means of precipitation, agglutination, passive haemagglutination and Coombs test.

Agglutinating antibodies were able to agglutinate with specific antigen, fix complement and demonstrate a bigger capacity to facilitate the co-agglutinating aggression and lysis of target cell marked with Bozicevich antigen.

Only coagglutinating antibodies were able to elicit anaphylaxis phenomenon (PCA) in mouse.

At the same time, the immunological cell response was analysed by means of blast cell transformation.

In view to these facts we can affirm that the humoral and cell mediated immunity in rats, experimentally infected with Trichinella spiralis result deficient to protect the host before the larval migration is consummated, being that function perhaps relegated to following stages of cyts formation and parasital death.

INTRODUCCION

La Trichinella spiralis es un nematodo cuyo ciclo de vida se cumple dentro del organismo de ciertos mamíferos (1) y que permanece en el intestino delgado entre 1 y 8 semanas, donde cumple procesos de maduración y reproducción (2).

Las larvas migran hacia los músculos estriados a través de la circulación sanguínea y linfática, donde se formará su envoltura quística, con presencia de colágeno y mucopolisacáridos (3- 4); posteriormente dicho quiste se calcifica en tiempos variables según la especie (1) y la larva muere.

Este particular ciclo de reproducción y maduración hace que el parásito sobreviva y se replique en un período en que es resguardado de la acción de la inmunidad celular y humoral que desarrolla la triquinosis (5), ya que se ha demostrado que provocando una inmunización previa con antígeno larval (6) o transfiriendo inmunidad con linfocitos de ratas infestadas (7- 8), se logran interesantes porcentajes de reducción en el número de larvas enquistadas con respecto a los controles no estimulados.

Se ha establecido que las parasitosis por helmintos potencian la síntesis de inmunoglobulina E (9 -10) en un principio; luego, durante el período de migración larval, se incrementa la IgM (11), que posteriormente decae aumentando posteriormente los niveles de IgG.

Así lo demuestra Perrudet-Badoux (12), comprobando que el incremento

to de inmunoglobulinas a más del doble se debe principalmente a IgG₁ (13).

Desde 1911 (14) se han introducido varios procedimientos de diagnóstico inmunológico en triquinosis como es la fijación del complemento, la precipitación en anillo, pruebas de microprecipitación, floculación en colesterol, en bentonita, hemaglutinación indirecta, la fluorescencia, etc., lo que da la pauta de la particular dificultad que presenta esta enfermedad para su diagnóstico (15-21).

La sensibilidad de las distintas técnicas de aglutinación está bien determinada, pero en ciertas ocasiones las reacciones de aglutinación pueden dar resultados negativos y esto se debe a la existencia de anticuerpos que impiden la aglutinación porque bloquean al antígeno, y que fueron designados en un principio como "sustancias inhibidoras"; dichos anticuerpos fueron puestos de manifiesto en infecciones o gonococos, en tripanosomiasis americana (22-23) y en animales inoculados a repetición con antígenos como Salmonella typhimurium, Brucella abortus, etc. (24-25).

Estos anticuerpos, si bien no producen la precipitación por sí solos pueden coprecipitar en los complejos antígeno - anticuerpo; este hecho hizo que se los considerara univalentes, pero posteriormente se demostró (23) que su valencia es dos y que en su molécula existe un sitio de alta y otro de baja afinidad por el antígeno, a diferencia de los precipitantes en los cuales los dos sitios de combinación tienen la misma afinidad.

En referencia a sus propiedades biológicas, tanto los anticuerpos precipitantes como los coprecipitantes desencadenan anafilaxia cutánea pasiva, pero los coprecipitantes requieren dosis mayores (33), aunque en equinos estimulados contra DNP la IgG_a e IgG_b coprecipitantes son capaces de desarrollarla (27). La fijación de complemento sólo se cumple con la fracción precipitante; con respecto a la citotoxicidad anticuerpo dependiente, ambos tienen capacidad para mediarla, y la depuración sanguínea del antígeno se ve favorecida por la fracción precipitante.

- El objeto de este trabajo es tratar de dilucidar el funcionamiento y las características inmunoquímicas de anticuerpos producidos en ratas infestadas experimentalmente con Trichinella spiralis y el rol que desempeñarían en los mecanismos de iniciación y/o establecimiento de la cronicidad de la parasitosis.

MATERIALES Y METODOS

Antígeno utilizado: se empleó el extracto salino crudo, o antígeno de Bozicevich (28, preparado por sonicación de larvas obtenidas por digestión de músculo infestado, con solución de pepsina (4 gr/l) y CIH al 1% durante 15-18 horas. Las larvas sonicadas hasta la obtención de pequeños fragmentos fueron lavadas, centrifugadas a 12000 r.p.m. durante 30', colocadas a 56°C por media hora, nuevamente - centrifugadas en iguales condiciones y separada la solución antigénica que con el agregado de merthiolate 1:10000, se conserva por 3 años a 4°C.

Animales e inoculaciones: un lote de 56 ratas blancas cepa Winster de ambos sexos y distinta edad, fueron infestadas oralmente con 1.200 - 1.500 larvas provenientes de músculos de otra rata infestada cedida por el Departamento de Zoonosis Rurales de Azul. Semanalmente al principio y quincenalmente después, se sangraron dos animales por punción cardíaca, guardando sus sueros en forma separada.

Otro lote de 50 ratas se infestó con 6.000 larvas de la misma forma - que las anteriores, y a los dos meses fueron sacrificadas para emplear sus músculos en la preparación de antígeno.

Dosaje de anticuerpos: a) por hemaglutinación: se utilizó la hemaglutinación pasiva de Boyden (29, tratando previamente los glóbulos rojos de carnero con bencidina bisdiazotizada (26, para lo cual se toman 3 ml de solución antigénica de 3 mg/ml de concentración en solución salina fosfatada (ClNa 0,15 M; fosfato 0,01 M;

pH 7,2) y se añade 0,1 ml de glóbulos rojos al 50%, previamente lavados y suspendidos en el mismo diluyente; se agrega 1 ml de bencidina bis-diazotizada diluida - 1:30 y se mantiene la mezcla 15' a temperatura ambiente; se centrifuga a 1500 r.p.m. y se lavan los glóbulos dos veces con solución salina, suspendiendo en 2,5 ml de la misma. El suero a valorar se inactivó 30' a 56°C, se emplearon 50 μ l de suero en diluciones seriadas en razón dos y 25 μ l de glóbulos rojos sensibilizados; el título se expresó como la inversa de la máxima dilución aglutinante.

b) por precipitación: se realizó en capilares usando 20 μ l de diluciones seriadas en razón dos e igual volumen de solución antigénica; luego de incubar una hora a 37°C se centrifugaron los capilares cerrados en un extremo y se expresó como título la inversa de la máxima dilución precipitante, por observación con microscopio de lupa.

c) por aglutinación: en tubo, usando 0,1 ml de diluciones seriadas en razón dos e igual volumen de suspensión antigénica preparada a partir de un lavado de larvas finamente segmentadas. Se incubó durante dos horas a 37°C y se efectuaron las lecturas con luz transmitida, expresando como título la inversa de la máxima dilución aglutinante.

Dosaje de anticuerpos no aglutinantes: en aquellos tubos que no dieron aglutinación directa, se investigó la presencia de anticuerpos no aglutinantes fi jados al antígeno, mediante reacción de Coombs (30). Para ello las suspensiones fueron lavadas con solución salina estabilizada, puestas en contacto con suero de conejo anti suero total de rata e incubadas a 37°C durante 60'. El título de anticuerpos tota

les se consideró como la inversa de la máxima dilución que diera aglutinación, la diferencia entre éste y el de Ac aglutinante, permitió obtener el título de los no-aglutinantes.

Obtención del suero de Coombs: fue preparado en conejo por inoculaciones s.c. de 10 mg de antígeno mezclado con 1 ml de adyuvante de Freund completo, durante 3 semanas; diez días más tarde fueron sangradas al presentar título adecuado.

Obtención de hemolisina: se preparó por inmunización de un conejo adulto, usando como antígeno glóbulos rojos enteros de oveja y sangre total.

Obtención del complemento: se empleó una mezcla de sueros provenientes de 20 cobayos.

Titulación de la hemolisina: fue realizada por lectura de 100% de hemólisis (26).

Titulación del complemento: se realizó por medición de la DO producida por la hemoglobina liberada por el efecto citotóxico del complemento sobre glóbulos rojos, determinando cuál era la mayor dilución de suero de cobayo capaz de hemolizar la totalidad de glóbulos (26)

Fijación del complemento: fue ensayada por determinación del 100% de hemólisis. Como fuente de anticuerpo coaglutinante se utilizó el suero 069 con máxima diferencia entre reacción de Coombs y aglutinación directa, y como fuente

de anticuerpo aglutinante el suero 023 con reacción de Coombs negativa. El sistema hemolítico usado se formó con volúmenes iguales de glóbulos rojos al 5% y suero hemolítico $2 \text{ ACh}_{100}/\text{ml}$.

Las lecturas de DO se efectuaron a 530 nm, correspondiendo los tubos 7 y 8 al 0% y 100% de hemólisis, respectivamente.

Se siguió el protocolo del cuadro I.

Determinación de la clase de inmunoglobulina en que estaba la actividad anticuerpo; fue realizada por inmunolectroforesis en gel de agar, utilizando suero de conejo antisuero total de rata como reactivo precipitante (31); los productos a analizar provenían de la disociación de anticuerpos fijados a suspensiones de larvas segmentadas. La corrida se desarrolló durante 60'; tras la precipitación y lavado las bandas se colorearon con Amido Schwartz, decoloraron con metanol-acético y secaron por circulación de aire.

Separación de anticuerpos por adsorción: 5 ml de suero fueron incubados con 3 gotas de suspensión de larvas finamente segmentadas, incubadas durante 1 hora, centrifugadas a 5.000 r.p.m., se repitió esta operación 4 veces. Se procedió a la desorción de esos anticuerpos con solución amortiguadora glicina - ClH 0,1 M, pH 3, neutralizando el sobrenadante resultante con Tris 0,2 M.

Anafilaxis cutánea pasiva: se realizó en ratón, según la técnica original de Ovary (32). Se inoculó intradérmicamente en el abdomen 0,1 ml de solución

CUADRO I

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8
Ac 100 microgr / ml (ml)	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,50	-
Antígeno Bozicevich (ml)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Suero cobayo dosis efect 1 CH ₁₀₀ / 0,4 ml (ml)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Sol. Mayer (ml)	0,45	0,40	0,35	0,30	0,20	0,10	0,40	0,50
Sistema hemolítico	incubación 37°C - 60 minutos							
	1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00 1,00							
	incubación 37°C - 30 minutos							
	lectura de los resultados							

de anticuerpo aglutinante o no aglutinante de la siguiente concentración: 20, 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 y 0,05 g/ml.

Luego de un periodo de incubación de 3 horas, los ratones recibieron por vía endovenosa 1 mg de antígeno de Bozicevich en 0,5 ml con Azul de Evans. Las zonas de inoculación se observaron durante media hora a la espera de la extravasación del colorante. Finalmente los animales fueron sacrificados y la piel de la zona inoculada observada internamente.

Ensayo de transformación linfocitaria: se realizó con ratas de 15 días; 1,5 ; 3; 5; 7 y 12 meses de infestación que fueron sangradas a blanco y su sangre diluida al medio con solución fisiológica estéril. Se procedió a la separación de linfocitos por gradiente de densidad, empleando 3 ml de Ficoll - Hypaque (Ficoll al 9%: 24 partes; Hypaque al 33,9%: 10 partes; densidad 1,077) y 4 ml de la dilución de sangre evitando la mezcla; se centrifugó a 400 xg durante 40'. De la interfase rica en linfocitos se recuperaron las células con pipeta Pasteur, lavando los linfocitos con solución Gey 3 veces, ajustando la concentración a 1×10^6 linfocitos/ml. Los cultivos se realizaron en frascos Falcon con 3 ml de medio TC 199 conteniendo 3×10^6 linfocitos y 3 gotas de antígeno de Bozicevich. Al cabo de 72 horas de incubación se procedió a la coloración de las células con May - Grunwald - Giemsa, fijando primero con metanol. La observación se realizó por microscopía óptica común.

Citotoxicidad mediada por células: (34) como células efectoras se em-

plearon linfocitos humanos separados por gradiente de densidad con Ficoll - Hypaque (35) y purificados por pasaje en columna de lana de vidrio, las células obtenidas fueron lavadas con medio TC 199 suplemento con estreptomina y albúmina bovina al 5%:

Como "células blanco" se emplearon glóbulos rojos de carnero o de pollo, que fueron sensibilizados con antígeno de Bozicevich por el método de la bencidina de la misma forma que para hemaglutinación; luego 0,1 ml de 2×10^6 GR/ml fueron mezclados con 0,01 ml de solución fisiológica conteniendo $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (50-100 μCi) y manteniendo a 37°C 1 hora, lavando posteriormente con medio completo.

Desarrollo del método: los cultivos se realizaron en tubos de hemólisis, llevando a un volumen total de 1,5 ml con medio completo. Se siguió el protocolo del cuadro II.

CUADRO II

Tubo	1	2	3	4	5	6
Linfocitos ml	0,1	-	0,1	-	0,1	-
GR ⁵¹ Cr	50	50	50	50	50	50
Suero 023 μg	-	-	0,25	0,25	-	-
Suero 069 μg	0,25	0,25	-	-	-	-

Como fuente de anticuerpos se utilizaron los mismos sueros empleados en fijación de complemento. La concentración total de linfocitos, en los tubos que correspondiera, fue de 3×10^6 , y de glóbulos rojos marcados con ^{51}Cr : 2×10^5 . Los controles se realizaron sin linfocitos y con el agregado de glóbulos rojos sin marcar, para evitar la lisis espontánea por baja concentración. Se incubaron los tubos inmóviles hasta un tiempo máximo de 36 horas, comprobándose a las 24 horas de incubación resultados óptimos. Las lecturas de la radiactividad fueron hechas en contador de pozo Alfa Nuclear sobre 1 ml de sobrenadante y el sedimento, obtenidos luego de centrifugar los cultivos a 1.000 r.p.m. durante 10'.

El porcentaje de ^{51}Cr liberado fue calculado por:

$$\frac{\text{Actividad del sobrenadante} \times 1,5 \times 100}{(\text{Act. del sobrenadante} \times 1,5) + \text{act. sedimento}}$$

RESULTADOS

El antígeno de Bozicevich elaborado demostró gran especificidad para las reacciones de hemaglutinación y precipitación. El porcentaje de mortalidad en los animales infestados fue del 0% y ascendió al 13% en los hiperinfestados (para producción de antígeno).

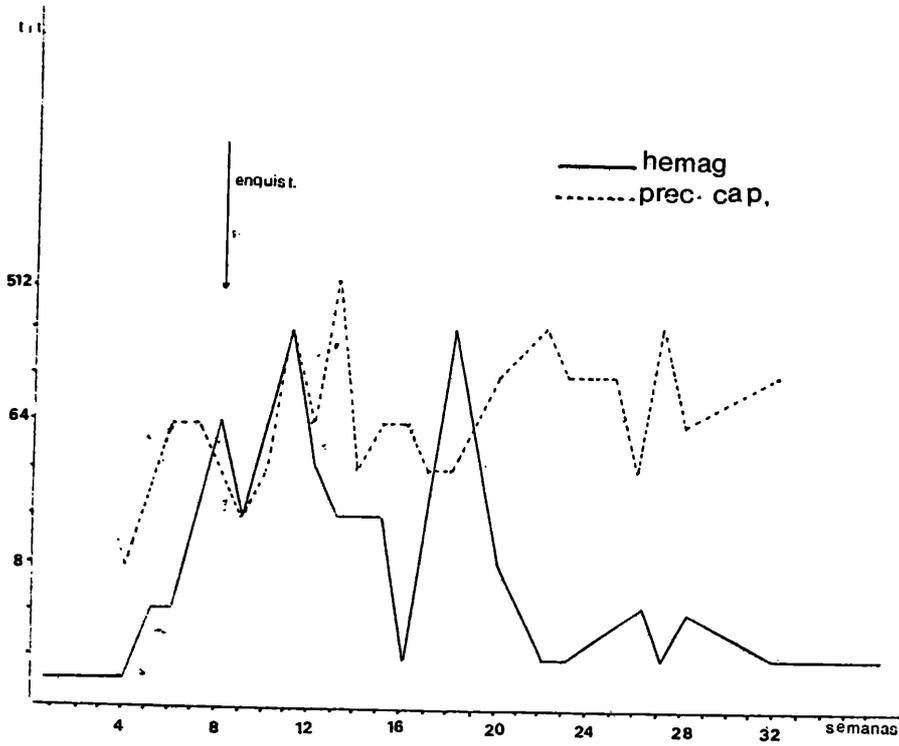
La esplenomagalia y eosinofilia de las ratas infestadas no fueron significativas, excepto durante el primer mes de experimentación.

Los títulos de anticuerpos obtenidos por técnicas de aglutinación en tubo, de precipitación en tubo o en capilares, y de hemaglutinación, permitieron detectar un ascenso de los mismos hacia los 60 días de infestación, período que coincide con el enquistamiento, manteniéndose bajos a lo largo de las siguientes 18 semanas para presentar luego un nuevo ascenso y volver a descender hacia el final del período de experimentación (figura I). Se pudo demostrar la presencia de anticuerpos no aglutinantes en títulos notablemente superiores a los obtenidos por aglutinación directa al realizar reacción de Coombs en aquellos sedimentos de los tubos correspondientes a diluciones de suero que se mostraron incapaces de originar aglutinación directa (figura II).

Con las reacciones de hemaglutinación se obtuvieron algunos falsos negativos, en animales en los que se comprobó microscópicamente su infestación.

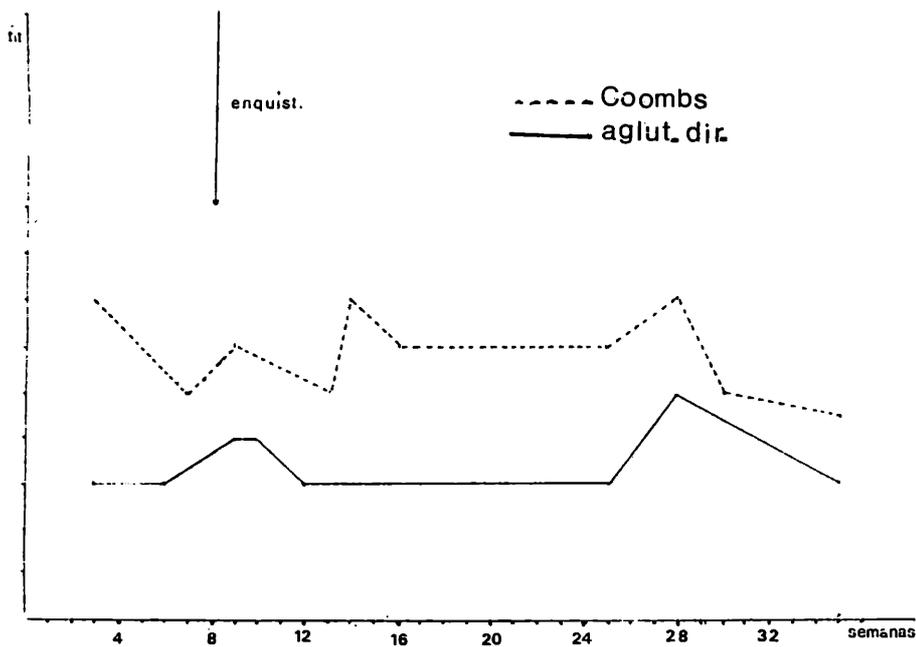
Si bien las dos poblaciones de anticuerpos, aglutinante y no aglutinan-

FIGURA I



Título de anticuerpos de ratas infestadas con Trichinella spiralis

FIGURA II



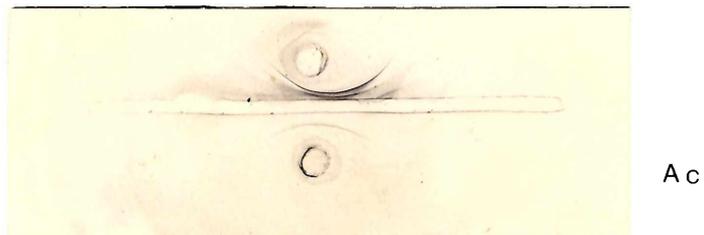
Título de anticuerpos totales y aglutinantes de ratas infestadas con Trichinella spiralis

te, no pudieron ser totalmente purificadas por adsorción, al realizar una inmunoelectroforesis en gel de agar con el objeto de identificarlas, originaron una banda de precipitación correspondiente a una IgG₁ al ser enfrentadas con un suero de conejo antisuero total de rata . (figuras III y IV).

En el análisis de la capacidad fijadora del complemento por la vía clásica, empleando como suero precipitante un suero con reacción de Coombs y como fuente de anticuerpo no precipitante un suero con máxima diferencia entre título aglutinante directo y por reacción de Coombs, se comprobó que los anticuerpos precipitantes fijaron complemento hasta una dosis de $6 \mu\text{g}$, a diferencia de los no precipitantes que no lo fijaron en las dosis ensayadas. En cuanto a la anafilaxia cutánea pasiva, anticuerpos con predominio de no-precipitantes la desencadenaron hasta una dosis de $0,05 \mu\text{g}$, resultando ineficientes a esos fines los precipitantes .

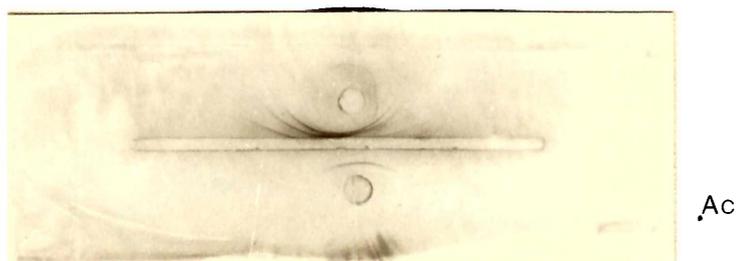
Los cambios morfológicos inducidos in vitro por la presencia de antígeno sobre linfocitos de animales sensibilizados, presentaron un máximo hacia los 7 meses de experimentación. (figura V). En cuanto a la citotoxicidad mediada por anticuerpo, tanto los anticuerpos aglutinantes como los no aglutinantes se mostraron capaces de facilitarla, con una pequeña diferencia en favor de los aglutinantes. Los resultados obtenidos fueron similares al emplear como "células blanco" glóbulos rojos de carnero o de pollo (Tabla 1 y 2). Los datos no fueron reproducibles al utilizar linfocitos bovinos como "células agresoras".

FIGURA III



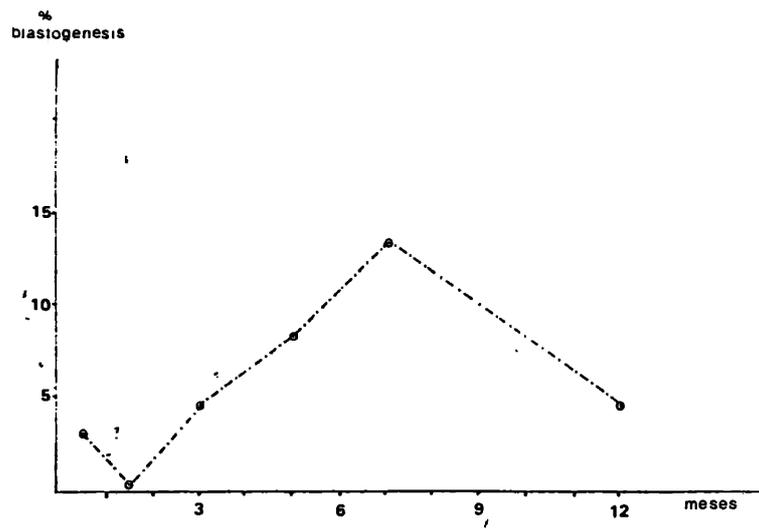
Análisis inmunolectroforético de anticuerpos aglutinantes de rata anti Trichinella spiralis y suero normal de rata frente a suero de conejo anti-suero total de rata.

FIGURA IV



Análisis inmunolectroforético de anticuerpos coaglutinantes de rata anti Trichinella spiralis y suero normal de rata frente a suero de conejo antisuero total de rata.

FIGURA V



Evolución de la respuesta In vitro a antígeno de Bozicevich de linfocitos de ratas sensibilizadas con Trichinella spiralis (blastogénesis).

T A B L A 1
Glóbulos rojos de carnero.

radiatividad sobrenadante	radiactividad sedimento	% de cuentas liberadas
624	3276	24
156	3744	6
936	3075	35
197	4024	7
208	3692	8
104	3796	4

T A B L A 2
Glóbulos rojos de pollo.

radiactividad sobrenadante	radiactividad sedimento	% de cuentas liberadas
187	2363	11
103	2446	6
340	2210	20
102	2448	6
85	2423	5
78	2430	3

DISCUSION

El propósito de este trabajo fue hacer una revisión de la respuesta inmune humoral y celular a Trichinella spiralis en animales de experimentación, considerando su evolución a lo largo del período de observación.

Para ello se logró la obtención de un antígeno que permitió realizar reacciones de aglutinación en tubo, precipitación en capilares y que fue capaz de unirse a la superficie de glóbulos rojos para poder realizar técnicas de hemaglutinación o ensayos de citotoxicidad anticuerpo dependientes así como estimular linfocitos de ratas sensibilizadas y ser útil en la fijación de complemento.

Con respecto a la evolución de los títulos de anticuerpos séricos se destaca que las reacciones de precipitación en tubo y en capilares, permiten detectarlos más tempranamente que los ensayos de hemaglutinación a pesar de saberse que es una técnica más sensible. Estos resultados se podrían explicar aceptando que por el método de marcación seguido se unían a los glóbulos rojos antígenos que aparecerían expuestos al sistema inmune más tarde durante la evolución larval; además en algunos animales se obtuvieron resultados negativos por hemaglutinación pasiva, mostrando títulos positivos con otras técnicas, lo que sugiere que resultan más apropiadas la precipitación del extracto salino crudo y la aglutinación de larvas finamente divididas.

Mediante reacción de Coombs, pudo ponerse en evidencia la

presencia de anticuerpos coaglutinantes, que si bien no pudieron ser totalmente purificados por inmunoadsorción, demostraron pertenecer a la clase IgG₁, al igual que los aglutinantes.

El comportamiento biológico de estos anticuerpos difiere considerablemente, y así se pudo comprobar al desarrollar la técnica de fijación de complemento, observando que los anticuerpos aglutinantes fijan complemento, mientras los coaglutinantes no lo hacen en las dosis empleadas, lo que concuerda con otros trabajos realizados con otros antígenos (23, 36-38).

Los anticuerpos coaglutinantes fueron capaces de desarrollar anafilaxia cutánea pasiva, a diferencia de los aglutinantes que no mostraron esa capacidad en igualdad de dosis. En cuanto a la citotoxicidad anticuerpo dependiente, ambos se mostraron capaces de facilitar la agresión y lisis de las células rojas que soportan el antígeno, con leves diferencias en favor de los aglutinantes.

Tanto los estudios de la inmunidad celular como la aparición de un título considerable de anticuerpos circulantes alrededor de los 60 días post-infestación, cuando ya el enquistamiento se hace evidente, y la presencia de anticuerpos coaglutinantes en todo el período de experimentación, sumado al distinto comportamiento biológico de los mismos, da la pauta que el desarrollo de la inmunidad humoral y celular se presenta tardíamente para proteger al huésped, ya que la etapa de la masiva migración larval se ha cumplido.

CONCLUSIONES

Ratas experimentalmente infestadas con Trichinella spiralis elaboraron anticuerpos aglutinantes y coaglutinantes, ambos pertenecientes a la clase IgG₁:

La determinación de anticuerpos séricos de animales infestados y el estudio de la transformación linfocitaria ante la presencia de antígeno (blastogénesis) permite afirmar que la inmunidad humoral y celular son significativas recién cuando la migración larval ya se ha concretado. Esto, sumado a la aparición de anticuerpos coaglutinantes que demuestran incapacidad para fijar complemento en las condiciones ensayadas y menor habilidad que los aglutinantes para desencadenar citotoxicidad anticuerpo dependiente, indica que las defensas inmunológicas establecidas en la triquinosis en ratá desempeñan un papel de escasa relevancia en la lucha contra el parásito, quedando tal vez restringidas a la etapa de aislamiento y muerte de las larvas mediante la formación del quiste.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- GOULD S.E. Trichinosis in man and animals. Charles C.Thomas. Publisher Illinois USA. Cap.III (1970).
- 2.- VILLELLA J.B. Observations on the time and number of molts in the intestinal phase of *Trichinella spiralis*. *J.Parasite*, 44: 41 (1958).
- 3.- ZARZYCHI J. Histochemical studies of capsules of trichinellae. *Wiad. Parazyt.* 9: 453-458 (1963).
- 4.- RITTERSON A.L. Nature of the cyst *Trichinella spiralis*. *J.Parasit.* 52: 157-161 (1966).
- 5.- LARSH J.E., GOULSON H.T. and WEATHERLY N.F. Study on delayed (cellular) hipersensitivity in mice infected with *Trichinella spiralis*. II Transfer of peritoneal exudate cells. *J.Parasitology* 50: 496 (1964).
- 6.-DESPOMMIER D.D., CAMPBELL M.C. and BLAIR, L.S. The in vivo and in vitro analysis of immunity to *Trichinella spiralis* in mice and rats. *Parasitology* 74: 109-119 (1977).
- 7.- CRUM E.D., DESPOMMIER D.D. and MCGREGOR D.D. Immunity to *Trichinella spiralis*. I: Tranfer of resistance by two classes of limphocytes. *Immunology* 33: 787-795 (1977).
- 8.- DESPOMMIER, D.D., MCGREGOR D.D., CRUM E.D. and CARTER P.B. Immunity to *Trichinella spiralis*. II: Expression of immunity againt adult worms. *Immunology* 33: 797- 805 (1977).

- 9.- JARRET ELLEN E. Reaginic antibodies and helminth infection. The veterinary record. 93: 480-483 (1972).
- 10.- SADUM E.H. Immunity to animal parasites. Edited by Soulsby E.J.L. Academic Press. New York (1972).
- 11.- KAGAN I.G., MADDISON S.E. and NORMAN L. The reactivity of immunoglobulins in echinococcosis and trichinosis. Amer.Journ.Trop. Med. Hyg. 17: 79-85 (1968).
- 12.- PERRUDET-BADOUX A., BINAGHI R. and BOUSSAC ARON Y. Production of different classes of immunoglobulins in rats infested with *Trichinella spiralis*. Immunochemistry 13: 443-445 (1976).
- 13.- BINAGHI R., BOUSSAC ARON Y. European Journal of Immunology 5 194 (1975).
- 14.- STROBEL H. Die serodiagnostik der Trichinosis. Munchem.Med.Wschr. 58: 672-674 (1911).
- 15.- BACHMAN G.H. The precipitin test in experimental trichiniasis. J.Prev.Med. 2: 35-48 (1928).
- 16.- BAUSS E.A. The in vitro effect of immune serum upon *Trichinella spiralis* larvae. Amer.J.Hyg. 32: 80-83 (1940).
- 17.- OLIVER GONZALEZ, J. The in vitro action of immune serum on the larvae and adults of *Trichinella spiralis*. J.Infect.Dis. 67: 292-300 (1940).
- 18.- SUESSEN-RUPH H. and KLINE B.S. A simple rapid flocculation slide test for trichinosis in man and in swine. Amer.J.Clin.Path.14: 471-484(1944)

- 19.- BOZICEVICH J., TOBIE J.E., THOMAS E.H. and WARD S.B. A rapid flo-
culation test for the diagnosis of trichinosis. Public Health Rep.
66: 806-814 (1951).
- 20.- KAGAN I.G. and BARGAI V. Studies on the serology of trichinosis
with hemagglutination, agar diffusion test and precipitin ring tests.
J.Parasitology 42: 237-245 (1956).
- 21.- SADUM E.H. Recent advances on the serological diagnosis of trichine-
llosis in Kozar. Trichinellosis, proceeding of the first International
conference on Trichinellosis, 266-274 (1962).
- 22.- McCUTCHAN D., KATSENSTEIN D., NORQUIST D., CHIKAM G., WUNDERLICH
AND BRAUDE A. Role of blocking antibody in disseminated gonococcal
infection. J.Immunol. 121: 1884- (1978).
- 23.- MARGNI R.A., CORDAL M.E. y col. Non-precipitating antibodies isolat-
ed by immuno-adsorption. Immunochem. 14: 299(1977).
- 24.- PARMA A.E., CERONE S.I., ERPELDING A. and MARGNI R.A. La respuesta
immune en conejos inoculados con Salmonella typhimurium. Rev.Arg.
Microb. 12: (3) (1980).
- 25.- SANTISTEBAN C.G. y PARMA A.E. Anticuerpos aglutinantes y no agluti-
nantes elaborados por bovinos inoculados a repetición con Brucella
abortus cepa 19. (Env.a Rev.Med.Veterinaria) (1983).
- 26.- MARGNI R.A. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. Segunda Edi-
ción. Ed.Médica Panamericana. 1977. Bs.As.

- 27.- CORDAL M. and MARGNI R.A. Isolation, purification and biological properties of horse precipitating and non precipitating antibodies. *Immunochemistry*, 11: 765-770 (1974).
- 28.- BOZICEVICH, J. Studies on trichinosis. XII The preparation and use of an improved trichina antigen. *Public Health Rep.* 53: 2130-2138 (1938)
- 29.- BOYDEN S.V. The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.*, 93: 107-120 (1951).
- 30.- COOMBS R.R., MPURANT A.E. and RACE R.R. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Brit. J. Exp. Pathol.* 26: 255-266 (1945).
- 31.- SCHEIDEGER J.J. Une micro-methode de l'immuno-electrophorèse. *Int. Arch. Allergy*, 7: 103 (1955).
- 32.- OVARY Z. Cutaneous anaphylaxis in the rat. *Int. Arch. Allergy* 3: 293 (1952).
- 33.- MARGNI R.A. and BINAGHI R. Purification and properties of non-precipitating rabbit antibodies. *Immunology*, 22: 557 (1972).
- 34.- MANNI J.A., BRACCO M. y PATRUCCO A. Citotoxicidad de linfocitos humanos inducida por anticuerpos: respuesta en pacientes con lupus eritematoso sistémico y efecto del tratamiento inmunodepresor. *Medicina* 34: (3) 185-192 (1974).
- 35.- BOYUN Separation of leucocytes from blood bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21: suppl. 97, 77-89 (1968).

- 36.- MARGNI R.A. and HAJOS S. Biological and physicochemical properties of purified anti-DNP guinea pig non precipitating antibodies. Immunol., 24: 435 (1973a).
- 37.- PARMA A.E., SANTISTEBAN C.G. and MARGNI R.A. Analysis and in vivo assay of cattle anti-Brucella abortus agglutinating and non agglutinating antibodies. (Env.a Veter.Microbiology) (1983).
- 38.- MARGNI R.A., PARMA A.E., CERONE S.I., ERPELDING A. and PERDIGON G. Agglutinating and non-agglutinating antibodies in rabbits inoculated with a particulated antigen (Salmonella typhimurium) Immunology, 48: 351-356 (1983).

Artículo 11: La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas en una tesis.