

18

Universidad Nacional Autónoma de México

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA**



**RELACIONES ANTIGENICAS ENTRE DOS PARASITOS
DE OVINOS: Fasciola hepatica
y Cysticercus tenuicollis**

**T E S I S
Que para obtener el título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A**

ERNESTO ATEMPA LOPEZ

Asesor: M.V.Z. Héctor Quiroz Romero

México, D. F.

1979

8188



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. MATERIAL Y METODOS	8
IV. RESULTADOS	15
V. DISCUSION	19
VI. CONCLUSIONES	22
VII. BIBLIOGRAFIA	23

I. RESUMEN

Se realizó un trabajo para observar posibles relaciones antigénicas entre dos parásitos de ovinos, usando para ello tres antígenos: somático de Fasciola hepática, - líquido y somático de Cysticercus tenuicollis. Se inmunizaron conejos con esos antígenos y se confrontaron con los - antisueros obtenidos, más un cuarto suero (control negativo), usando las siguientes pruebas inmunológicas:

- 1.- Inmunodifusión en agar (ID).
- 2.- Contraelectroforesis (CIE).
- 3.- Hemaglutinación pasiva (HAI).

Las pruebas de ID y CIE no revelaron reacciones cruzadas entre los antígenos de ambos parásitos.

En cambio, usando la prueba de HAI, se obtuvieron resultados positivos entre los dos parásitos; es discutida la veracidad de estos resultados.

Los dos antígenos de Cysticercus tenuicollis dieron resultados positivos con las tres pruebas.

II. INTRODUCCION

Entre las parasitosis que afectan a los rumiantes, quizá la fasciolosis, no obstante que ha merecido constantes estudios para su control, es de las enfermedades que mayores pérdidas económicas ocasiona en la ganadería de varios países, entre los cuales puede contarse el nuestro.

Los hospedadores más frecuentes de Fasciola hepática dentro de los animales domésticos son los rumiantes, y de éstos parece ser que el ovino es el que se ve mayormente afectado. Hasta la fecha el control de esta enfermedad se ha basado, como en otras parasitosis, en cortar el ciclo de vida del parásito y en el tratamiento quimioterapéutico del parásito adulto. Sin embargo en años recientes ha tomado importancia el estudio inmunológico de las infecciones parasitarias, encontrándose que es posible hacer diagnósticos más precisos (3, 11, 12, 18, 23). También se habla ampliamente en la literatura sobre relaciones antigénicas entre distintos parásitos (3, 4, 7, 9, 18, 19).

Para el caso concreto de la fasciolosis, existen diversos reportes sobre aspectos inmunológicos, entre otros:

Corba y Spaldonová (6) reportaron que ratas con una infección experimental y luego tratadas con drogas fas-

ciolicidas, desarrollan una resistencia a una infección de confrontación después de 8 a 10 semanas.

Hughes y col. (14) observaron inmunidad en ratas cuando a éstas les han sido trasplantadas fasciolas adultas provenientes de ovinos, y posteriormente (de 2 a 6 semanas) impiden el desarrollo a un nuevo trasplante.

Corba y col. (5) transfirieron células linfoides de ratas infectadas con Fasciola hepática a un par de becerros y ratas sanas, observando que les conferían un alto grado de protección contra una infección primaria.

Sinclair (22) realizó un intento de transferencia de inmunidad usando homogeneizados de bazo y nódulos linfáticos obtenidos de ovinos infectados y administrándolos a ovinos sanos; no reporta diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles en cuanto a peso del hígado, conteo de eosinófilos y hematocrito; sin embargo, en otro trabajo, el mismo autor (23) admite que sí se produce una resistencia cuando grupos de ovejas expuestas a una infección preliminar, después de 9 semanas reciben infecciones de confrontación, y entonces retardan el desarrollo de tremátodos y la migración de éstos por los conductos biliares es impedida.

La evidencia de que se desarrolla un estado de -

inmunidad, es comprobable por el hecho de que unas semanas después de la infección experimental es posible detectar anticuerpos en el suero de los animales, tal como Lang(17) lo manifiesta en un trabajo, donde sugiere que los antígenos responsables de la inmunidad, son liberados por el parásito entre los días 8 a 17 después de la infección inicial, y dicha inmunidad es palpable entre los 25 y 40 días.

Abascal (1) aisló tres fracciones protéicas de un antígeno crudo de Fasciola hepática y realizando pruebas de identidad con sueros hiperinmunes de conejos por las técnicas de doble inmunodifusión e inmunoelectroforesis, no establece analogías con antígenos de líquido hídrico, Cysticercus tenuicollis, Cysticercus cellulosae y dos ascáridos.

Gundlach (13) aisló 41 antígenos de Fasciola hepática: antígenos somáticos (tripsinizados o digeridos), antígenos metabólicos, fracciones lipídicas, fracciones proteínicas y fracciones polisacáridas altamente purificadas; y usando diferentes pruebas: fijación de complemento, hemaglutinación pasiva, precipitación en anillo, difusión en agar e inmunoelectroforesis, observó que los mejores antígenos resultaron ser los metabólicos y una fracción polisacárida ácida.

Diversos trabajos se han publicado para estudiar relaciones antigénicas entre parásitos, y los resultados -- son variados:

Martin (18) reporta que la dificultad para esta-- blecer el diagnóstico preciso de la cisticercosis ovina, re-- side en el hecho de que existen reacciones cruzadas con --- otros parásitos como Fasciola y Moniezia.

Fernández, Gómez y col. (11, 12) han reportado la existencia de anticuerpos detectables usando las pruebas de hemaglutinación pasiva y de la bentonita para el diagnósti-- co en ovejas y cabras con Cysticercus tenuicollis, utilizan-- do como antígeno líquido y extracto de esa fase larvaria; - los mismos autores reportan reacciones cruzadas en número - mínimo con Echinococcus sp.

Calamel y Soule (3) observaron que huevos embrio-- nados de Taenia saginata fueron incapaces de infectar al ga-- nado cuando se le administraron 70 antígenos de tres cisti-- cercos: Cysticercus bovis, Cysticercus pisiformis y Cysti-- cercus tenuicollis; los cuales reaccionaron en forma cruza-- da, pero el mismo autor no reporta relaciones antigénicas - de esas fases larvarias con tremátodos, usando la prueba de inmunofluorescencia.

Molina (19) trabajó con tres parásitos: Ascaridia

galli, Ascaridia columbae y céstodos del género Raillietina, y obtuvo reacciones cruzadas entre los nemátodos, pero no entre éstos y los céstodos. Contreras (7), realizó lo mismo usando como antígenos cuatro partes anatómicas diferentes de Ascaris equorum: líquido celómico, intestino, cutícula y huevos; encontrando relación antigénica entre todos a excepción de los huevos. Cruz (9) realizó un trabajo de relación antigénica con cinco parásitos de ovinos: Fasciola hepática, Moniezia expansa, Moniezia benedeni, Thy--sanosoma actinoides y Haemonchus contortus, y sus resultados fueron negativos mediante la prueba de Ouchterlony, -- y positivos con la prueba de precipitación capilar. En los otros dos trabajos también se usaron esas dos pruebas.

La justificación del presente trabajo tiene como base un reporte reciente hecho por Campbell y col. (4) -- quienes han podido establecer que ovinos infectados con -- Cysticercus tenuicollis, generan a las 12 semanas un nivel de resistencia (que puede oscilar entre un 95%) contra una infección de confrontación con metacercarias de Fasciola hepática; los resultados comprobadas por conteo de huevos en heces y tremátodos recobrados de los conductos biliares.

Los objetivos fundamentales del presente trabajo

son:

1.- Determinar si existe relación antigénica entre dos parásitos: Fasciola hepática y Cysticercus tenuicollis.

2.- Determinar cual de las técnicas empleadas: - inmunodifusión en agar (ID), contraelectroforesis -- (CIE) y hemaglutinación pasiva (HAI), proporciona mejores resultados para establecer dichas relaciones.

III. MATERIAL Y METODOS

Se prepararon antígenos a partir de parásitos -- adultos obtenidos de animales sacrificados en el rastro. - Con esos antígenos se inocularon conejos adultos para la - producción de los sueros hiperinmunes, y una vez obtenidos éstos, se realizaron las pruebas inmunológicas: ID, CIE y - HAI.

A.- Preparación de antígenos

a) Para la preparación de los antígenos somáti-- cos, se realizó la técnica descrita por Cruz (9) modifica-- da.

En el rastro:

1.- Se obtuvieron los parásitos de los animales-- recién sacrificados, se depositaron en solución salina fi-- siológica estéril (SSFE) y se colocaron en refrigeración.

En el laboratorio:

2.- Se lavaron tantas veces como fue necesario - para quitarles exceso de sangre y otras proteínas ajenas.

3.- Se resuspendieron en SSFE y se dejaron en -- refrigeración durante 24 horas.

4.- Se lavaron nuevamente, se secaron y se pesaron.

5.- Se añadió SSFE para quedar a una concentración final de 1:10.

6.- Se maceraron en el mortero.

7.- El macerado se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 minutos.

8.- Al sobrenadante se le agregó merthiolate - - (1:1000) y el sedimento se desechó.

9.- Se envasó en frascos de 10 ml. y se puso en congelación a -20°C .

10.- Se procedió a determinar el contenido de -- proteína por el método de Kjeldahl.

b) para la preparación del antígeno líquido de - Cysticercus tenuicollis, se usó la técnica descrita por -- Fernández y col. (11).

B.- Inoculación de los animales experimentales

Para la producción de los sueros hiperinmunes se utilizaron 8 conejos adultos con un peso promedio de 4 Kg. y se dividieron en 4 lotes de 2 animales cada uno:

Lote 1.- Se inculó con antígeno somático de F.-

hepática.

Lote 2.- Se inoculó con el antígeno somático de C. tenuicollis.

Lote 3.- Se inoculó con el líquido de C. tenuicollis.

Lote 4.- Sin inocular; lote testigo.

Esquema de inoculación: 8 inoculaciones con intervalos de 3 días entre cada una, la última fue añadida con adyuvante de Freund para estimular una mejor respuesta inmunológica.

Vía de inoculación: subcutánea, usando la piel del dorso de los animales. Cantidad inoculada: 1.5 ml. en cada sesión.

C.- Obtención y preparación de antisueros

Después de la última inoculación se dejó descansar a los animales 15 días, y se procedió a sangrarlos por punción cardíaca. La sangre se dejó en la estufa aproximadamente media hora para una mejor retracción del coágulo.

Se colectó el suero, se centrifugó para quitar pequeñas cantidades de eritrocitos, y se puso en congelación a -20°C .

D.- Pruebas inmunológicas

Se realizaron tres pruebas: ID, CIE y HAI.

1.- Prueba de ID, cuya técnica fue tomada del manual publicado por Center for Disease Control (21). Se - - ilustra en figura 1.

2.- Prueba de CIE, también la técnica fue tomada de la misma referencia (21). Se ilustra en la figura 2.

3.- Prueba de HAI: para esta prueba la metodología se dividió en varios pasos:

a) Formalización de los eritrocitos, descrita por Kwapinski (16); cuya finalidad es evitar la hemólisis - además de una conservación prolongada en comparación con - los glóbulos rojos trabajados en forma natural (2).

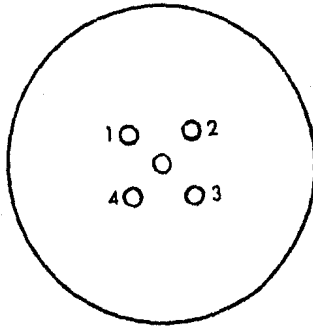
b) Tanización de los eritrocitos formalinizados, descrita por Kabat y Mayer (15) para modificar la superficie de los glóbulos rojos.

c) Sensibilización de los eritrocitos (21), que consiste en la adición de los antígenos sobre la superficie modificada de los glóbulos rojos.

d) Procedimiento para la técnica en tubo (macroglutinación) (20, 21). Se ilustra en el cuadro 1.

Figura 1

Prueba de inmunodifusión en agar



A.- Antígenos:

Caja a.- F. hepáticaCaja b.- somático de C. tenuicollisCaja c.- líquido de C. tenuicollis

Antisueros:

1.- F. hepática2.- somático de C. tenuicollis3.- líquido de C. tenuicollis

4.- suero normal

Figura 2

Prueba de contrainmunolectroforesis

AO	O ₁
BO	O ₁
CO	O ₁
AO	O ₂
BO	O ₂
CO	O ₂
AO	O ₃
BO	O ₃
CO	O ₃
AO	O ₄
BO	O ₄
CO	O ₄

Antígenos:

- A.- somático de F. hepática
- B.- somático de C. tenuicollis
- C.- líquido de C. tenuicollis

Antisueros:

- 1.- somático de F. hepática
- 2.- somático de C. tenuicollis
- 3.- líquido de C. tenuicollis
- 4.- suero normal

Cuadro 1
Prueba de hemaglutinación pasiva

A	DILUCIONES DE LOS ANTISUEROS EN LOS TUBOS.			Suero normal
	<u>F. hepatica</u> somático	<u>C. tenuicollis</u> somático	líquido	
<u>F. hepatica</u> somático	1:10	1:10	1:10	1:10
	1:20	1:20	1:20	1:20
	1:40	1:40	1:40	1:40
<u>Cysticercus tenuicollis</u> somático	1:10	1:10	1:10	1:10
	1:20	1:20	1:20	1:20
	1:40	1:40	1:40	1:40
<u>Cysticercus tenuicollis</u> líquido	1:10	1:10	1:10	1:10
	1:20	1:20	1:20	1:20
	1:40	1:40	1:40	1:40

A. - Solución 2.5% de eritrocitos sensibilizados con los tres antígenos.
Invariablemente se añadió 0.1 ml a todos los tubos.

IV. RESULTADOS

Cuadro 2

Contenido de proteína de los tres antígenos, realizado por el método de Kjeldahl

ANTIGENOS	% P. C.
Somático de <u>F. hepatica</u>	0.787
Somático de <u>C. tenuicollis</u>	0.266
Líquido de <u>C. tenuicollis</u>	0.437

Pruebas inmunológicas:

Cuadro 3

Resultados de las pruebas correspondientes a inmunodifusión en agar y en inmunolectroforesis.

ANTIGENOS	ANTISUEROS			SUERO NORMAL
	<u>F. hepatica</u> somático	<u>Cysticercus tenuicollis</u> somático líquido		
<u>F. hepatica</u> somático	+	-	-	-
<u>C. tenuicollis</u> somático	-	+	+	-
<u>C. tenuicollis</u> líquido	-	+	+	-

Figura 3

En el centro: antígeno de F. hepática

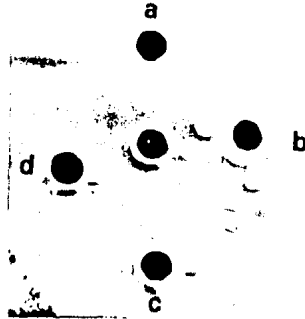


Figura 4

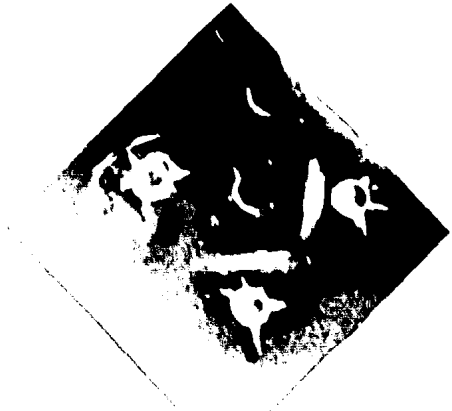
En el centro: antígenos de C. tenuicollis

(somático)



Figura 5

(líquido)



Antisueros:

a.- somático de F. hepática

b.- somático de C. tenuicollis

c.- líquido de C. tenuicollis

d.- suero normal

Figura 6

Resultados de la prueba de contrainmunolectroforesis

AO) O₁BO O₁CO O₁AO O₂BO) O₂CO) O₂AO O₃BO) O₃CO) O₃AO O₄BO O₄CO O₄

Antígenos:

A.- somático de F. hepáticaB.- somático de C. tenuicollisC.- líquido de C. tenuicollis

Antisueros:

1.- somático de F. hepática2.- somático de C. tenuicollis3.- líquido de C. tenuicollis

4.- suero normal

Cuadro 4

Resultados de la prueba de hemaglutinación pasiva

ANTIGENOS	ANTISUEROS			SUERO NORMAL
	<u>E. hepatico</u> somático	<u>Cysticercus tenuicollis</u> somático líquido		
<u>E. hepatico</u> somático	+	+	+	-
<u>C. tenuicollis</u> somático	+	+	+	-
<u>C. tenuicollis</u> líquido	+	+	+	-

V. D I S C U S I O N

La prueba de HAI, cuyos resultados fueron diferentes a los de las otras dos pruebas, permite establecer algunos comentarios, sobre todo porque dicha prueba tiene algunos márgenes de error que ya han sido mencionados en la literatura: parece ser que los eritrocitos pueden aglutinarse en forma espontánea; o bien cuando el ácido tánico está en contacto durante un período relativamente largo -- con los glóbulos rojos, éstos aglutinan aún sin el contacto de algún suero (2). En este trabajo se notó este fenómeno, e incluso hubo casos en los que los eritrocitos aglutinaron con la adición del ácido tánico, sin la presencia -- del antígeno en su superficie. Fue necesario repetir la -- prueba hasta estar seguro que los eritrocitos se encontraban en buen estado antes de hacer las confrontaciones con los antisueros.

Sin embargo por otro lado, existe un hecho, y es que la prueba de HAI es altamente sensible, y suele captar y dar como positivos sueros con cantidades mínimas de anticuerpos, tales como 0.01 microgramos de anticuerpo por c.c. (10), y en condiciones ideales, hasta con cantidades menores, como 0.001 microgramos de anticuerpo por c.c. (8),-

lo que conduce a pensar que es factible que entre los antigenos de F. hepática y C. tenuicollis sí existan relaciones antigénicas, pero los grupos químicos funcionales a ambos antígenos se encuentren en mínima cantidad, y el poder para estimular la producción de anticuerpos sea pobre y -- por eso solo se pongan en evidencia en pruebas de alta sensibilidad, como es el caso de HAI, que comparada con el poder de sensibilización que tiene la prueba de precipitación en gel agar, que es de 60 microgramos de anticuerpo -- por c.c. -- como mínimo -- (10), hay marcada diferencia. Finalmente es necesario aclarar que para esta prueba (HAI) es -- necesario eliminar contaminantes antigénicos, los cuales -- son detectados por la sensibilidad de la prueba y puede -- dar resultados falsos positivos (10).

Los porcentajes de proteína de los antígenos de F. hepática y líquido de C. tenuicollis fueron adecuados, -- y las reacciones en las pruebas de ID y CIE mostraron resultados satisfactorios. El antígeno somático de C. tenuicollis estuvo bajo en su contenido de proteína, sin embargo sí estimuló la producción de anticuerpos, aunque en la prueba del CIE fue necesario diluir y encontrar la zona de equivalencia entre el antígeno y los antisueros, para encontrar una línea tenue de precipitación. El bajo contenido de proteína retardó la migración electroforética de es-

te antígeno a través del campo, y por lo tanto también se retrasó en su unión con el antisuero correspondiente.

Por lo antes expuesto, cabe señalar que en las pruebas inmunológicas tendientes a observar relaciones antigénicas, es recomendable trabajar con antígenos cuya cantidad de proteína sea igual (11), para tener la seguridad de que las reacciones deberán reportar resultados semejantes en cuanto a tiempo e intensidad.

VI. CONCLUSIONES

1.- Las pruebas de ID y CIE no evidenciaron ninguna relación antigénica entre el antígeno de F. hepática y los dos antígenos de C. tenuicollis.

2.- La prueba de HAI reveló que los eritrocitos-cubiertos con los tres antígenos, fueron aglutinados tanto por los sueros hiperinmunes homólogos, como por los heterólogos, con lo cual es posible que exista relación antigénica entre los antígenos de los dos parásitos.

4.- Los dos antígenos de C. tenuicollis reaccionaron positivamente con las tres pruebas.

5.- De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos concluir que de las tres técnicas inmunológicas realizadas en este trabajo, la mejor para establecer las relaciones antigénicas entre F. hepática y C. tenuicollis, fue la prueba de HAI.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abascal, T. G.: Estudio inmunológico de fracciones antigénicas de Fasciola hepática. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 1970.
- 2.- Barret, J. T.: Inmunología. Edit. Interamericana. México, D.F. 1972.
- 3.- Calamel, M. et Soule, C.: Choix et préparation d'un antigène pour le diagnostic de la cysticercoose bovine par immunofluorescence. Rev. Méd. Vét., 123: 1105--1114 (1972).
- 4.- Campbell, N. J., Kelly, J. D., Townsend, R. B. and Dincen, J. K.: The stimulation of resistance in sheep to Fasciola hepática by infection with Cysticercus tenuicollis. Int. J. Parasit., 7 : 347-351 (1977).
- 5.- Corba, J., Armour, J., Roberts, R. and Orquhart, G.: Transfer of immunity to Fasciola hepática infection by lymphoid cells. Res. Vet. Sci., 12 : 292 - 295 (1971).
- 6.- Corba, J. and Spaldonová, R.: Development of host resistance to Fasciola hepática after the elimination-

of primary infection. *Folia Parasitologica*, 22 : 133-139 - (1975).

7.- Contreras, A. R.: Reacciones inmunológicas - cruzadas de cuatro antígenos de Ascaris equorum. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional -- Autónoma de México, D.F. 1970.

8.- Córdoba, A.F. y Estrada, P. S.: Fundamentos de Inmunología e Inmunoquímica. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. OEA. 1977.

9.- Cruz, E. J.: Reacciones inmunológicas cruzadas de cinco parásitos de ovinos. Tesis de Licenciatura. - Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 1973.

10.- Davis, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., - Ginsberg, H. S. y Wood, W. B.: Tratado de Microbiología. - Salvat Edit. España. 1972.

11.- Fernández, A., Gómez, G. y González, C.: El uso de partículas inertes en el diagnóstico de la cisticercosis ovina. I. Prueba de la bentonita. *Revta. Iber. Parasit.*, 29 : 35-43 (1969).

12.- Gómez, G., Fernández, A. y González, C.:
El uso de las partículas inertes en el diagnóstico de la -
cisticercosis ovina. II. Prueba de Hemaglutinación indirec
ta. Revta. Iber. Parasit., 30 : 57-62 (1970).

13.- Gundlach, J. L.: Studies on the serologic
activity of Fasciola hepática antigens. Acta Parasit. Po-
lon., 19 : 9-47 (1971).

14.- Hughes, D. L., Harness, E. and Doy, T.G.: -
Loss of ability to kill Fasciola hepática in sensitized
rats. Nature, 267 : 517-518 (1977).

15.- Kabat, E. A. and Mayer, M. M.: Experimental
Immunochemistry. Charles C. Thomas Publisher. U.S.A. 1961.

16.- Kwapinski, J. B.: Methods of Serological Re-
search. John Wiley and Sons Inc. U.S. 1965.

17.- Lang, B. Z.: Acquired immunity to Fasciola
hepática in the laboratory white mouse. Am. J. Trop. Med.
Hyg., 17 : 561-567 (1968)

18.- Martín C.: La cisticercose bovine au Tchad.
Essai de diagnostic sérologique. Rev. Elev. Méd. Vét. P.
Trop., 25 : 73-77 (1972).

19.- Molina, N. C.: Reacciones inmunológicas cru

zadas de ascáridos y cóstodos de aves. Tesis de Licenciatura. Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 1971.

20.- Noel, R. R. and Bigazzi, P. E.: Methods in Immunodiagnosis. John Wiley and Sons Inc. U.S. 1973.

21.- Serodiagnosis of Parasitic Diseases (Part I) Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Center for Disease Control. Atlanta, Georgia, U.S. 1977.

22.- Sinclair, K. B.: Resistance to Fasciola hepatica in sheep: attempts to transfer resistance with lymph node and spleen homogenates. Br. Vet. J., 127 :408-414. (1971).

23.- Sinclair, K. B.: Resistance of Sheep to Fasciola hepatica: studies on the development and pathogenicity of challenge infections. Br. Vet. J., 129 : 235-250 (1973).