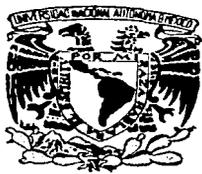


201 89



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**RESPUESTA INMUNE A DOS ANTÍGENOS DE
FASCIOLA HEPÁTICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A :

MARIA NATIVIDAD NAVARRETE DELGADILLO



México, D. F.

**EXÁMENES
PROFESIONALES**

1987



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 está 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
Introducción	1
Objetivos	14
Material	16
Métodos	25
Resultados	48
Discusión	82
Conclusiones	87
Bibliografía	89

INTRODUCCION

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria que afecta a una gran cantidad de animales, entre ellos al ganado ovino y bovino, así como al hombre. Es producida por Fasciola hepatica. Su distribución es cosmopolita y endémica, principalmente en países criadores de ganado. La parasitosis se adquiere por la ingestión de la metacercaria, fase que se encuentra enquistada en vegetales acuáticos. En el Continente Americano el principal mecanismo para adquirir la parasitosis es mediante el consumo de berro, Masturtium officinale; el ganado se infecta al ingerir cualquier tipo de planta acuática, que crezca en lagos, estanques, canales o lechos de ríos de lento cauce que contengan metacercarias, por esta razón el ganado es considerado como el principal reservorio de esta parasitosis.

Fasciola hepatica, se caracteriza por la presencia en su desarrollo de diferentes estadios, tanto en los caracoles que actúan como huéspedes intermediarios como en el ganado y en el hombre. Figura 1.

Las metacercarias ingeridas, se desenquistán en el duodeno, atraviesan la pared intestinal, pasan a cavidad peritoneal, se dirigen a glándula hepática, pa

san la Cápsula de Glisson, penetran el parénquima hepático y llegan a los conductos biliares donde se fijan y crecen hasta alcanzar la etapa adulta, iniciándose el ciclo nuevamente con la puesta de huevos.

P A T O L O G I A

En el hombre se reconocen dos períodos de esta parasitosis. En el invasivo, los parásitos juveniles migran desde el intestino hasta la glándula hepática, ocasionando pequeños focos necróticos o microabcesos de contornos irregulares con una marcada eosinofilia e infiltración leucocitaria; si el número de parásitos es elevado, la reacción inflamatoria a nivel intestinal sera más acentuada.

En el segundo período, los parásitos ya se han establecido en el hígado. Las infiltraciones leucocitarias que se originaron en el período invasivo, son reemplazadas por alteraciones de tipo fibroso, con la descamación de los conductos biliares, metaplasia del epitelio y la formación de adenomas.

Por otro lado el depósito de huevos frecuentemente origina en los tejidos múltiples focos de inflamación y esclerosis. El daño hepático es intenso por lo que

incluso hay crecimiento del mismo.

La sintomatología dependerá de la intensidad de la infección, del período de la parasitosis y de las complicaciones, como puede ser la presencia de bacterias que ven favorecido su establecimiento en el hígado, tal como Clostridium oedematians.

Diversos estudios histológicos (15 y 53) sugieren que los parásitos inmaduros se alimentan de células hepáticas y conforme crecen, su alimentación aumenta por lo que se ve reducida la función hepática. Esto se manifiesta al alterarse las pruebas de funcionamiento hepático, como es la excreción de sustancias extrañas, en el que se usa bromosulfaleína o verde de indocianida (4, 11, 22, 53 y 65). También se detecta marcada hiperbilirrubinemia y elevada concentración de transaminasa glutámico oxalacética. La síntesis de proteínas está ligeramente disminuida y existe un contenido de hemoglobina bajo, condicionada en parte por la hemorragia que causan los parásitos (15). En 1965 Daes realizó un estudio con ³²P para determinar el consumo de sangre por parte del parásito obteniendo que cada parásito adulto consume 0.2 a 0.3 ml de sangre al día lo que es suficiente para ocasionar anemia aparente de tipo normocítica normocrómica.

Se ha demostrado que dos meses después de que la metacercaria ha sido ingerida, en el plasma se encuentra hipalbuminemia e hipergammablobulinemia. A partir del cuarto mes de la infección, se encuentra fibrosis crónica perihepática, diarrea más o menos persistente e intensa, cólico hepático y descamación del epitelio de los conductos biliares, lo que provoca obstrucción de los mismos (15 y 53). Posteriormente se presentan complicaciones, como atrofia de las células hepáticas y vasos portales, cirrosis hepática y de vasos portales, esplenomegalia e infiltraciones bacterianas secundarias.

I M P O R T A N C I A E C O N O M I C A

La infección producida por Fasciola hepatica es de suma importancia para los países ganaderos, por las grandes pérdidas que ocasionan en los productos cárnicos, lácteos y lanares. (24).

La prevalencia en México de ganado parasitado es alta y a continuación se ofrecen algunos datos: En el Rastro de Ferrería de la Ciudad de México de 1965 a 1968 se decomisaron 52,404 vísceras sometidas a examen (8.2 % del total de vísceras sometidas a examen). En el Rastro Municipal de Tulancingo Hgo. de 1975 a 1980 se decomisaron 42,341 vísceras sometidas a examen (Haro A. I-

rene 1981, cita personal).

Mazzoti y cols. en 1965 estudiaron la fasciolosis del ganado en el país, y encontraron que el Estado de Veracruz el 92.5 % de los animales estaban parasitados y que solamente en dos localidades: Saltillo y Mérida no se presentaba esta parasitosis.

En estudios más recientes Bonilla (1974), Martínez (1972), Regalado Ortiz (1980), han reportado que no existe la parasitosis en los estados de Baja California Norte, Colima, Yucatán, Quintana Roo y Nayarit (citas personales).

Se han hecho algunos estudios en varias regiones de la República Mexicana, para determinar a los caracoles que sirven de hospedadores intermediarios de Fasciola hepatica, habiendose encontrado los géneros Lymnaea, Physa y Helisoma, con las especies L. attenuata, L. galva cubense, H. tenuis y Physa spp. Encontrandose que Lymnaea galva cubense es la especie más susceptible ya que en varios estudios se ha demostrado que esta infectado en forma natural hasta en un 100 % (23 y 33).

A N T I G E N O S

Existen en la literatura reportes acerca del estudio de los antígenos de Fasciola hepatica, que utilizan al parásito completo, estadios larvarios, huevecillos, productos de excreción y secreción y en otros casos de extractos fraccionados a partir de un antígeno total. En la mayoría de los casos las fracciones que se han utilizado son de bajo peso molecular, poco reactivas y por lo tanto no útiles para el diagnóstico de esta parasitosis; en el caso de los antígenos totales, en algunos casos se reportan reacciones cruzadas con otros parásitos.

Con el propósito de hacer más adecuado el diagnóstico de la fasciolosis, se han diseñado un sinnúmero de técnicas, que buscan más sensibilidad y especificidad en los resultados. En la actualidad el inmunodiagnóstico de fasciolosis se basa en las siguientes técnicas: fijación del complemento, doble difusión en gel de agar, contraelectroforesis, inmunoelectroforesis, hemaglutinación indirecta ó bien la introducción de variantes a las técnicas ya mencionadas. Sin embargo no han resultado tan sensibles y específicos porque en la mayoría de los trabajos han utilizado antígeno crudo de Fasciola hepatica.

Por esta razón es necesario investigar la obtención de antígenos que puedan aumentar la sensibilidad y especificidad de tales técnica para lograr una mejor herramienta en el diagnóstico de la fasciolosis.

En México, uno de los primeros reportes - acerca de la utilización de un antígeno crudo en el diagnóstico de fasciolosis humana mediante las técnicas de intradermoreacción y cutireacción fueron los de Mazzoti (48 y 49), además el antígeno que él utilizó no presentó reacción cruzada con pacientes oncocercosos. Este autor propone la intradermoreacción como una prueba de rutina en el ganado.

Tay y cols. 1959 (33), diagnosticaron fasciolosis a nivel familiar empleando la técnica de inmunodifusión. Se uso para ello como antígeno, un extracto total del parásito, confirmando el diagnóstico con coproparasitoscópico de sedimentación simple.

Biagi (7), además de emplear la intradermoreacción como un método de diagnóstico para esta parasitosis, correlaciona resultados para confirmar la sensibilidad de su reacción con coproparasitoscópico por sedimentación y reacción de fijación del complemento; proponiendo que además de las pruebas inmunológicas para la confirma-

ción de la parasitosis es necesario investigar la presencia de huevos.

En 1953 Urquhart y cols. (64) utilizaron antígeno crudo de Fasciola hepatica para inocular conejos y encontraron que a partir de la segunda semana de inoculación es posible detectar anticuerpos. Inmunizaron además un lote de conejos con antígeno de Fasciola hepatica, desafiándolo posteriormente con metacercarias, con el objeto de observar el efecto de la respuesta inmune con respecto a una reinfección. Al sacrificar a los animales se detectó que los parásitos no habían tenido un desarrollo adecuado, pero que el número de los mismos no disminuyó.

Hayes y cols. (28), siguieron un modelo de experimentación con el fin de demostrar que la inmunidad adquirida durante la primera infección es importante en la reinfección aunque los daños ocasionados a nivel hepático por el parásito son potencialmente iguales a los de la primera infección.

Hughes y Harnnes (36) demostraron que la inmunidad natural es un mecanismo de defensa en la infección de Fasciola hepatica; ya que los anticuerpos circulantes pueden inmovilizar o impedir que los parásitos juveniles se desarrollen. En la segunda parte de su trabajo

utilizaron un extracto de células peritoneales de conejo previamente sensibilizados con antígeno de Fasciola hepática. Las células se implantaron en conejos a los que posteriormente desafiaron con metacercarias. La necropsia demostró que los parásitos no se desarrollaron adecuadamente perdiendo la habilidad de adherencia y además en los úteros no se les encontró huevos, como en los controles. Lo que significa que la protección inmunológica adquirida en forma pasiva (transferida) podría emplearse como un control epidemiológico en el ganado.

Hayes y cols. (30), también estudiaron el efecto de una primera infección con respecto a una segunda infección en ratas, concluyendo que la inmunidad adquirida inicialmente afecta el desarrollo de los parásitos, en el desafío secundario.

El mismo autor (31), estudió el efecto del suero inmune contra Fasciola hepática en diferentes etapas de la infección, notando que los parásitos juveniles son los más afectados ya que al realizar la necropsia de animales sometidos a la infección, mostraron un desarrollo anormal.

Lang (43), estudió el efecto que causa Fasciola hepática de 12, 14, 18 y 24 días de evolución al

ser inoculados en ratones, concluyendo que los parásitos jóvenes (de 12 días o menos) son los responsables de la respuesta inmune por estar más tiempo en contacto con el huésped (hasta 32 días), antes de que este llegue a establecerse en su habítad normal. Los parásitos de 14 días o más de evolución muestran una respuesta inmune disminuída ya que el tiempo de contacto es menor.

Harnes y cols. (27), observaron que la respuesta pre-hepática en ratas, ya que al necropsiarlas después de haber sido desafiadas con metacercarias, detectaron parásitos muertos o degenerados. Concluyeron que el moco intestinal es una barrera biológica en las ratas que les confiere resistencia evitando que los parásitos puedan establecerse en los conductos biliares.

Lang (44), reporta resultados comparativos entre el efecto del suero inmune hacia Fasciola hepática y el suero normal, con respecto a la viabilidad de los parásitos jóvenes de Fasciola hepática. Encontrando que los parásitos sensibilizados tendían a no migrar al hígado.

Hayes y cols. (30) trataron de demostrar en ratas, si la protección que adquiere un organismo en la infección primaria, sirve como una barrera protectora

en una reinfección, encontrando que la mayor protección se alcanza cuando los parásitos no se establecen en hígado.

Pautrizel y cols. (56), usaron un extracto antigénico deslipidizado de Fasciola hepatica para efectuar reacciones intradérmicas, en pacientes con parasitosis diversas, encontrando el 3.3 % de casos positivos (de un total de 46 pacientes), confirmando posteriormente el diagnóstico por coproparasitoscópicos y reacciones de precipitación (doble difusión en gel y contraelectroforesis). Concluyendo que el antígeno deslipidizado de Fasciola hepatica no presentaba reacción cruzada, ya que entre los pacientes que estudiaron se encontraban casos positivos a Schistosoma mangoni, Ascaris lumbricoides, Quiste hidatídico y Taenia sp.

Biguet y cols. (6), compararon por inmunoelectroforesis diferentes antígenos parasitarios (Cysticercus cellulosae, Ascaris lumbricoides, Paragonimus westermani con los de Fasciola hepatica obtenidos de cutícula, total, de excreciones y secreciones. Concluyeron que el antígeno de excreciones y secreciones es altamente específico por no presentar reacciones cruzadas y por lo tanto es útil en el diagnóstico de esta distomatosis.

Hyller (34), utiliza la contraelectroforesis como una prueba rápida (30 a 90 minutos), para el diagnóstico de fasciolosis humana, comparandola con doble difusión en gel. Concluyendo que la primera es una técnica rápida y sensible y que se puede utilizar como una prueba de gabinete en el estudio de esta parasitosis.

Capron y cols. (10), estudiaron la eficiencia de la inmunolectroforesis como un método de diagnóstico en casos de fasciolosis, comparando resultados con doble difusión en gel, reacción de fijación del complemento y coproparasitoscópicos, para tal efecto estudiaron a 60 pacientes que presentaban diferentes parasitosis que podían dar lugar a reacciones cruzadas. De ellos obtuvieron 14 casos positivos, dando en algunos casos hasta ocho bandas de precipitación. Concluyendo que la inmunolectroforesis es una prueba sensible y no costosa para demostrar anticuerpos contra Fasciola hepatica en enfermos con esta parasitosis y que el antígeno que ellos utilizaron no presentaba reacción cruzada.

Korach y Benex (39, 40 y 41) caracterizaron antígenos de Fasciola hepatica con propiedades lipoproteicas, estudiaron su composición química y sensibilidad inmunológica. Pero por su baja reactividad resultaba poco útil en el diagnóstico de fasciolosis.

Más adelante cuando realizaron el fraccionamiento de un antígeno deslipidizado de Fasciola hepatica obtuvieron cuatro fracciones, a las cuales se les determinó contenido proteico y carbohidratos, y por doble difusión en gel y reacción de fijación del complemento, encontraron que la fracción dos era la más reactiva, ya que daba un título de 1:64 y dos bandas de precipitación.

Cuperlovió y cols. (12), obtuvieron un antígeno secretorio de Fasciola hepatica, lo purificaron y fraccionaron con Sephadex G-100. Obtuvieron dos fracciones activas a las cuales se les determinó contenido proteico. Posteriormente al antígeno secretor lo marcaron con Selenio-metionina sometiendo al proceso de fraccionamiento. Al estudiar la actividad antigénica por doble difusión en gel comprobaron que la fracción dos era la más reactiva.

Hillyer y cols. (35), purificaron un antígeno de Fasciola hepatica con el objeto de eliminar reacciones cruzadas con sueros inmunes a otros parásitos. El fraccionamiento con Sephadex G-200 produjo cuatro picos, de éstos el pico dos era el más reactivo, aunque el 3 y 4 reaccionaban con suero inmune en proporción menor. Además la fracción dos no presentó reacción cruzada con sueros inmunes a Entamoeba histolytica, Trichinella spiralis y Schistosoma mansoni.

O B J E T I V O S

- A.- Obtención de antígeno de Fasciola hepática por el método de Sacarosa-acetona.
- B.- Obtención de una fracción antigénica a partir de antígeno completo, mediante fraccionamiento en columna.
- C.- Probar su reactividad antigénica y especificidad en diferentes técnicas serológicas, comparando los resultados con el antígeno completo.
- D.- Tratar de eliminar reacciones cruzadas con otros antígenos de helmintos, al usar el antígeno fraccionado.
- E.- Estandarizar las diferentes técnicas empleadas (hemaglutinación, inmunolectrotroforesis, contraimmunoelectroforesis e inmunodifusión).
- F.- Establecer si la fracción antigénica obtenida nos sirve para el diagnóstico de esta parasitosis.
- G.- De las técnicas empleadas ver cual es la que nos sirve como prueba de gabinete pa

ra esta parasitosis.

M A T E R I A L

Centrifuga refrigerada, modelo ~~FR~~-2 International.

Bomba de vacío.

Balanza analítica.

Baño maría.

Centrifuga clínica.

Esterilizador. Inter. Equip. Co.

Espectrofotometro.

Liofilizadora.

Potenciometro.

Rotor. Eber Ranch Co.

Cámara de electroforésis. Chemetron-Tank.

Base de agitador magnético.

Baño helado.

Cámara húmeda.

Agitador magnético.

Fuente de poder L. K. B.

Agitador de vidrio de 30.0 cm de longitud.

Botellas de centrifuga de 250 ml .

Cajas petri.

Columna de Fraccionamiento. Pharmacia Fine Chemicals.

Cubas de plástico. Chemetron-Tank mod. 220.

Embudo de separación.

Gargolas.

Engargoladora manual.

Frascos de tapón esmerilado, boca ancha de 1,000 ml.

Homogeneizador. Virtis 23.

Jeringas desechables de 3, 5, 10 y 50 ml .

Matraz erlenmeyer de 250, 500 y 1,000 ml .

Matraz aforado volumétrico de 100, 250, 500 y 1,000 ml .

Microdilutores de 0.050 ml Cooke Engineering Co.

Mechero Bunsen.

Micropipetas de 0.025 y 0.050 ml Cooke Engineering.

Mortero.

Papel filtro Whatman No. 2 y 5 .

Pipetas serológicas de 0.1, 1, 5, y 10 ml.

Sacabocados.

Transiluminador. Hyland.

Tubos capilares.

Tubos de centrifuga de 15, 50 y 100 ml .

Tubo de membrana de diálisis.

Tubos Waserman.

Vasos de precipitados de 25, 50, 100 y 250 ml .

Vasos Coplin.

R E A C T I V O S

Acetona.

Acido acético glacial.

Acido tánico.

Acido clorhídrico.

Adyuvante completo de Freund.

Adyuvante incompleto de Freund.

Albúmina sérica bovina.

Negro de amido 100 B.

Agarosa.

Azida de sodio.

Buffer de referencia pH 4 y 7 .

Carbonato de sodio anhidro.

Citrato de sodio.

Cloruro de sodio.

Veronal.

Estreptomocina.

Fosfato de sodio dibásico.

Fosfato de potasio dibásico.

Glicerina.

Antrona recristalizada.

Glucosa anhidra.

Hidróxido de sodio.

Ión agar.

Penicilina.

Reactivo de Polin.

Sacarosa.

Sephadex G-100.

Sulfato de cobre.

Tartrato doble de sodio y potasio.

Rojo de tiacina.

M A T E R I A L B I O L O G I C O

Conejos New Zeland.

Antígeno de Ascaris lumbricoides.

Antígeno de Cysticercus cellulosae completo.

Antígeno de Cysticercus cellulosae incompleto.

Antígeno de Cysticercus cellulosae excreciones y secreciones.

Antígeno de Cysticercus cellulosae fluido vesicular.

Antígeno de Fasciola hepatica completo.

Antígeno de Fasciola hepatica fraccionado.

Antígeno de Leishmania donovani.

Antígeno de Paragonimus mexicanus.

Antígeno de Trichinella spiralis.

Antígeno de Toxocara canis.

Sueros controles positivos a todos los antígenos anteriores.

Sueros humanos con diagnóstico de Fasciolosis.

Sueros humanos positivos a: Cisticercosis.

Quiste hidatídico.

Ascariasis.

Triquinosis.

Tripanosomiasis.

Amibiasis.

PREPARACION DE REACTIVOS

Buffer salino de fosfatos

(P. B. S.)

Soluciones madre

Fosfato de sodio dibásico 0.15 M

Na_2HPO_4 21.3 g .

Agua destilada c.b.p..... 1,000 ml .

Fosfato de potasio monobásico 0.15 M.

KH_2PO_4 20.4 g .

Agua destilada c.b.p..... 1,000 ml .

Cloruro de sodio 0.15 M.

NaCl 8.8 g .

Agua destilada c.b.p..... 1,000 ml .

Solución salina isotónica

NaCl 8.5 g .

Agua destilada c.b.p..... 1,000 ml .

Buffer salino de fosfatos a diferentes

pH

Reactivo	6.4 ml	7.2 ml
KH_2PO_4	32.3	24.0
Na_2HPO_4	67.7	76.0
NaCl	100.0	100.0

Estreptomycin 10 mg / ml

Estreptomycin 0.01 g .

Agua destilada 10.0 ml .

Penicilina 10 U. I. / ml

Penicilina 0.043 g .

Agua destilada 10.0 ml .

Sacarosa

Sacarosa q.p. 71.60 g .

Agua destilada c.b.p. 1,000 ml .

Solución de albúmina sérica bovina

100 μg / ml

Albúmina sérica 10.0 mg .

Agua destilada c.b.p. 100.0 ml .

Solución de carbonato de sodio al 2.0 %

Carbonato de sodio 20.0 g .
Hidróxido de sodio 1,000 ml .

Solución de sulfato de cobre al 1.0 %

Sulfato de cobre 10.0 g .
Agua destilada c.b.p..... 1,000 ml .

Solución de hidróxido de sodio 0.1 N

Hidróxido de sodio 4.0 g .
Agua destilada c.b.p..... 1,000 ml .

Reactivo de Folin 1 N.

Reactivo de Folin 2 N 10.0 ml .
Agua destilada 10.0 ml .

Solución de tartrato de sodio y potasio

2.0 %

Tartrato de sodio y potasio 20.0 g .
Agua destilada c.b.p..... 1,000 ml .

Solución I

Sulfato de cobre al 1.0 % 0.1 ml .
Tartrato de sodio y potasio al 1.0 % ... 0.1 ml .
Carbonato de sodio al 2.0 % 10.0 ml .

Solución de antrona al 0.2 %

Antrona recristalizada 0.2 g .
Acido sulfúrico q.p. 100.0 ml .

Solución estandar de glucosa 100 μ g / ml

Glucosa anhidra q.p..... 10.0 mg .
Agua destilada c.b.p..... 100.0 ml .

A partir de esta solución se preparan los estandares a diferentes concentraciones.

Agarosa al 1.0 %

Agarosa 1.0 g .
Agua destilada 50.0 ml .
Veronal 50.0 ml .
Azida de sodio 0.10 g.

Se disuelve la agarosa con el agua, calentando hasta que la solución este cristalina, agregar el veronal y azida de sodio.

Solución de Negro de amido

Negro de amido 0.5 g.
Acetato de sodio 4.0 g .
Acido acético 1.0 ml .
Agua destilada 10.0 ml.

Acido acético al 1.0 %

Acido acético glacial 1.0 ml.
Agua destilada 100.0 ml.

Glicerina acidulada

Glicerina 1.0 ml .
Acido acético glacial 1.0 ml .
Agua destila c.b.p..... 100.0 ml .

Sorensen's

Na_2HPO_4 160.0 ml .
 KH_2PO_4 52.0 ml .
Tomar de la solución anterior 200 ml y mezclarla con 3,800
mililitros de solución salina isotónica.

Solución de anticoagulante

Citrato de sodio 3.8 g .
Agua destilada c.b.p. 100.0 ml .

Solución madre de ácido tánico

Acido tánico 0.10 g .
P. B. S. pH 7.2 10.0 ml .

Solución de ácido tánico 1:20,000

Solución madre 2.0 ml .
P. B. S. pH 7.2 38.0 ml .

Solución de suero normal de conejo al 1.0 %

Suero normal de conejo 1.0 ml .
P. B. S. pH 7.2 99.0 ml .

M E T O D O S

Obtención del antígeno somático crudo de Fasciola hepatica
Método sacarosa-acetona. Beltrán y cols. 1974 (Comunicación personal).

Los parásitos obtenidos de hígados de bovinos en el Rastro Municipal de Tulancingo Hgo., se tratan de la siguiente manera:

- 1.- Disecación de conductos biliares de hígados y aislamiento de los parásitos adultos.
- 2.- Lavado repetido con solución salina isotónica estéril.
- 3.- Dejar reposar una hora con mezcla de antibióticos, penicilina y estreptomicina.
- 4.- Eliminar los antibióticos por lavados sucesivos con solución salina isotónica estéril.
- 5.- Liofilizar los parásitos, pesarlos y triturarlos en un mortero estéril.
- 6.- Al polvo obtenido agregarle una pequeña cantidad de sacarosa 0.24 M., pasarlo al homogeneizador y adicionarle el resto de sacarosa en una proporción de un

gramo por 80.0 ml . (p / v) .

- 7.- Con una aguja de calibre 16 y 9.5 cm de longitud depositar lentamente el homogenado en el fondo de los frascos de boca ancha que contiene la acetona, tapar y agitar vigorosamente durante 1 minuto.
- 8.- Dejar reposar 15 minutos en baño helado.
- 9.- Aspirar el sobrenadante de acetona y resuspender en igual volumen de acetona.
- 10.- Agitar energicamente durante 15 minutos y dejar reposar en baño helado una hora.
- 11.- Por aspiración con bomba de vacío, retirar la mayor cantidad de acetona; en 200 mililitros de acetona limpia, resuspender el sedimento obtenido, agregando primeramente un pequeño volumen con el fin de desprender las partículas adheridas al fondo y en las paredes de los frascos.
- 12.- Homogenizar inmediatamente y pasarlos a botellas de centrifuga de 250 ml .
- 13.- Centrifugar a 3,000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- 14.- Descartar el sobrenadante, colocar los

frascos con el sedimento en baño helado.
Liofilizar.

- 15.- Pesar el polvo obtenido y resuspender en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 estéril y fría en proporción de un gramo en 40 ml de buffer de fosfatos (p / v).
- 16.- Pasar el matraz con solución a un baño helado ó en cuarto frío y mantenerlo en agitación constante durante 16 horas.
- 17.- Repetir la centrifugación como se indica en el paso 13, pero por una hora.
- 18.- Bajo condiciones de esterilidad, separar el sobrenadante.
- 19.- Determinar del sobrenadante: proteínas por el método de Lowry (47).
- 20.- Determinar del sobrenadante: carbohidratos por el método de Antrona (19).
- 21.- Envasar y etiquetar los frascos, en alicuotas de 3.0 ml con una concentración de 3.0 mg / ml y 1.12 a 0.5 mg / ml de proteínas y carbohidratos respectivamente.
- 22.- Liofilizar una parte y la otra conser-

varia en congelación.

DETERMINACION DE PROTEINAS DEL ANTIGENO DE FASCIOLA HEPATICA.

Lowry 1951 (47).

- 1.- Numerar los tubos del uno al ocho.
- 2.- Del tubo uno al cinco agregar 1.0 ml de la solución estandar a diferentes concentraciones (100, 75, 50, 25, 12.5 Mg / ml).
- 3.- Al tubo número seis agregarle 1.0 ml de agua destilada. (blanco).
- 4.- A los dos tubos restantes agregarles 1.0 ml del antígeno a diferentes concentraciones (diluciones 1:10 y 1:100).
- 5.- Añadir a todos los tubos 3.0 ml de la solución I. Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente 10 minutos.
- 6.- Agregar a cada uno de los tubos 0.3 ml del Reactivo de Folin.
- 7.- Agitar y dejar en reposo durante 30 minutos.
- 8.- Efectuar la lectura en el espectrofotómetro, a 500 nm.
- 9.- Gráficar la concentración contra densi-

dad óptica de los estandares e interpo-
lar la densidad óptica de los problemas
en la curva patrón, para conocer la con
centración de proteínas del antígeno so
mático de Fasciola hepatica.

DETERMINACION DE CARBOHIDRATOS DEL ANTIGENO DE FASCIOLA HEPATICA

Método de la Antrona (19). Drewood 1946.

- 1.- Marcar los tubos del uno al ocho.
- 2.- Colocar a cada uno de los tubos 2.0 ml
del reactivo de antrona y pasarlos a
baño helado.
- 3.- A los tubos del uno al cinco agregar
1.0 ml de las soluciones estandares a
diferentes concentraciones (100, 75,
50, 25 y 12.5 μg / ml).
- 4.- Al tubo seis agregar 1.0 ml de agua des
tilada (blanco).
- 5.- A los tubos restantes agregar 1.0 ml
del antígeno a diferentes concentracio-
nes (diluciones 1:10 y 1:100).
- 6.- Agitar vigorosamente cada uno de los tu
bos sin sacarlos del baño helado.
- 7.- Tapar los tubos con papel aluminio, co-

locarlos en baño maría a ebullición, durante 16 minutos exactamente.

- 8.- Pasar los tubos a baño helado.
- 9.- Leer en espectrofotometro a 625 nm.
- 10.- Gráficar densidad óptica contra concentración.
- 11.- Interpolar la lectura de los problemas en la curva patrón para conocer su concentración.

**FRACCIONAMIENTO DEL ANTIGENO DE FASCIOLA HEPATICA EN SEPHA
DEX G - 100.**

- 1.- Pesar 8.0 g de Sephadex.
- 2.- Hidratarlo en 130 ml de P. B. S. pH 7.2.
- 3.- Dejarlo reposar 72 horas a temperatura ambiente.
- 4.- Llenar la columna con eluyente (P. B. S. pH 7.2).
- 5.- Colocar en la parte superior de la columna un embudo de separación y sellarle para evitar la entrada de aire y fugas del líquido eluyente.
- 6.- Decantar el exceso de eluyente que contiene el Sephadex.

- 7.- Agregar el Sephadex al embudo de separación para llenar la columna.
- 8.- Dejar reposar la columna durante 24 horas.
- 9.- Retirar el exceso de Sephadex de la columna.
- 10.- Estandarizar el goteo en función del tiempo a 40 gotas por 3 minutos.
- 11.- Dejar reposar la columna durante 30 minutos.
- 12.- Cerrar el flujo.
- 13.- Agregar 1.0 ml. de la muestra a fraccionar, procurando no alterar la estabilidad del gel.
- 14.- Eluir la muestra con P. B. S. pH 7.2.
- 15.- Colectar 2.0 ml por tubo la muestra fraccionada.
- 16.- Hacer la lectura a 280 nm.
- 17.- A las fracciones con mayor lectura determinarles contenido proteico por el método de Lowry.
- 18.- Guardar las fracciones en refrigeración.

FRACCIONAMIENTO DEL ANTIGENO

La finalidad de la cromatografía de exclusión molecular es la separación de sustancia de acuerdo a su peso molecular. El estudio de enzimas, polisacárido, proteínas, ácidos nucleicos, se debe a Porath y Flodin (1959), quienes introdujeron la cromatografía de filtración a través de un gel.

El Sephadex se prepara a partir de residuos de glucosa en epíclorhidrina, es altamente expansivo en agua y soluciones electrolíticas.

En el transcurso del proceso de elución se puede hacer una curva de fraccionamiento y poder someter a cada una de las fracciones recolectadas a un estudio posterior.

En este trabajo se uso una columna de la marca Pharmacia Fine Chemicals, con una longitud de 30 centímetros, 1.2 centímetros de diámetro y 40 mililitros de volumen.

Las fracciones colectadas se guardaron en refrigeración, para determinarles contenido de proteínas y carbohidratos, a las que presentaban mayor contenido proteico, se estudio su reactividad antigénica en reacciones de precipitación y hemaglutinación respectivamente.

REACCIONES DE PRECIPITACION

Los antígenos son sustancias de peso molecular elevado, estructura compleja, soluble o particulados. Cuando se utiliza antígeno soluble para inocular animales de laboratorio se induce en ellos la formación de anticuerpos, mismos que al interaccionar con el antígeno inductor da lugar a reacciones de precipitación.

DOBLE DIFUSION EN GEL DE AGAR

La reacción consiste fundamentalmente en colocar el sistema antígeno-anticuerpo por separado en un soporte de agar solidificado, con la finalidad de que cada sistema difunda, los cuales al encontrarse y unirse dan lugar a bandas de precipitación visibles. Generalmente se utiliza portaobjetos, siendo el sustrato empleado agarosa, la cual es horadada como se indica en la figura 2.

Después de dejarlos difundir 24 a 48 horas la observación de las bandas se hace por medio de luz indirecta. Para una mejor observación se tinte la placa con Negro de amido.

DESARROLLO DE LA PRUEBA

- 1.- Con un hisopo barnizar las laminillas

con agarosa al 2.0 %. Dejarlas solidificar a temperatura ambiente.

- 2.- Colocar las laminillas sobre una superficie horizontal nivelada.
- 3.- Agregar con una pipeta 3.0 ml de agarosa al 1.0 %, repartiendola uniformemente en la laminilla.
- 4.- Con sacabocados y plantilla especial realizar las perforaciones.
- 5.- Utilizando un capilar, colocar en la poza central el antígeno, llenándola al ras.
- 6.- Con capilares diferentes, se llenan las pozas de la periferia con los sueros - problema y controles positivo y negativo.
- 7.- Colocar la placa en cámara húmeda durante 24 a 48 horas.
- 8.- Observar las bandas con luz indirecta. Registrar los resultados.
- 9.- Teñir las placas.

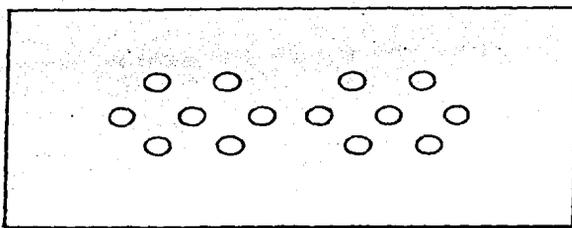


Figura 2

INMUNOELECTROFORESIS (IEF)

En esta técnica se aprovecha la movilidad que presentan las sustancias, cuando son sometidas a un campo eléctrico. Las proteínas contienen radicales que al ser disociados dan iones negativos como el grupo carboxilo ($-COO^-$) y positivos como el grupo amino ($-NH_3^+$) los que dependiendo del medio en que se encuentran, y al ser sometidos al campo eléctrico, se movilizan a diferentes planos, siendo este el primer paso que se efectúa en la inmunoelectroforesis. El paso siguiente es agregar el otro componente que forma el sistema para que difunda a través del gel. (medio de soporte), y que al encontrarse con el componente que indujo su producción formarán bandas de precipitación. La reacción se efectúa en la -

placa de agar, en la cual se hacen dos pozos centrales y una canal horizontal que abarca practicamente casi toda la longitud de la placa. Figura 3

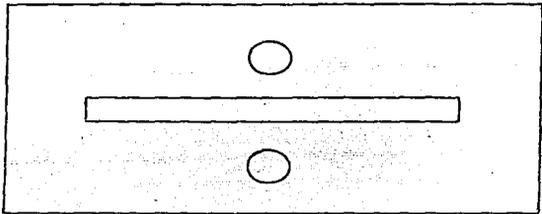


Figura 3

Desarrollo de la técnica

- 1.- Usando un hisopo barnizar las laminillas con agarosa al 2.0 %. Dejar solidificar a temperatura ambiente.
- 2.- Colocar las laminillas sobre una superficie horizontal nivelada.
- 3.- Agregar 3.0 ml de agarosa al 1.0 % repartiendola uniformemente en la laminilla.
- 4.- Dejar solidificar a temperatura ambiente.

- 5.- Perforar las laminillas, con un sacabocado retirar el gel de las pozas centrales y con un cortador especial marcar el canal central.
- 6.- Colocar en una de las pozas el suero problema y en la otra el control positivo, agregar una pequeña gota de bromofenol, como indicador del corrimiento.
- 7.- Depositar la laminilla en la cuba para electroforesis, colocando adecuadamente los puentes de papel filtro.
- 8.- Conectar la fuente de poder durante 90 minutos (ó 120 minutos).
- 9.- Retirar la laminilla de la cámara de electroforesis y colocarla en una superficie horizontal.
- 10.- Retirar el canal horizontal el gel.
- 11.- Con un capilar, agregar el antígeno que se usa, teniendo especial cuidado de que este no rebase la superficie.
- 12.- Dejar difundir de 24 a 48 horas.
- 13.- Leer las laminillas con luz indirecta.

Registrar los resultados.

14.- Tefir las placas.

CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF)

En esta técnica se toman en cuenta las propiedades del buffer, del gel, de los reactivos y de un campo eléctrico; ya que debido al fenómeno electroosmótico los antígenos proteícos difunden hacia el ánodo y los anticuerpos hacia el cátodo, de tal manera que cuando ambos se encuentran producen bandas de precipitación. Los resultados son rápidos, pues la lectura se realiza generalmente en 90 minutos.

Es un método apropiado para la determinación semicuantitativa de proteínas presentes en el plasma o en algunos fluidos del organismo. La placa se horada como se indica en la figura 4.

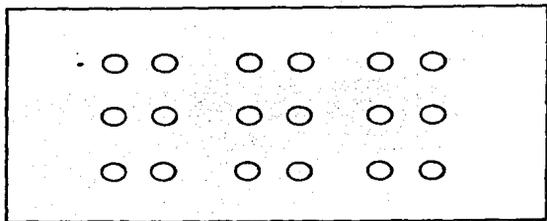


Figura 4

Desarrollo de la técnica.

- 1.- Preparar las placas, igual que para DID e IEF.
- 2.- Perforar con un sacabocados las placas de agar utilizando la plantilla especial.
- 3.- Colocar los sueros en las pozas correspondientes a la fila A₁ y el antígeno en la fila B₁.
- 4.- Agregar los controles en las pozas de la hilera
- 5.- Colocar las placas en el aparato de electroforesis, revisar que el amortiguador no este cristalizado y que si cubra los electrodos.
- 6.- Hacer el corrimiento con voltaje de 130 a 160 mV.
- 7.- Dejar correr durante 60 minutos.
- 8.- Observar las bandas de precipitación entre los espacios de las pozas A/B.

CONTROLES

- 1.- Controles positivos. Antígeno de Fas
ciola hepatica y su suero homólogo.

- 2.- Control negativo. Antígeno de Fascio la hepática y suero normal de conejo.
- 3.- Se puede usar como control de los antígenos y sueros homologos que ya se mencionaron.

TINCIÓN DE PLACAS

Aún cuando las líneas de precipitación que se forman son visibles a simple vista, para una mejor observación es conveniente teñirlas, esto se logra con colorantes como el Negro de amido, Rojo de tiazina o Rojo de Ponccau.

Desarrollo de la técnica

- 1.- Colocar la placa en un recipiente con agua destilada y dejarlas 24 horas.
- 2.- Secarlas a temperatura ambiente, cubriendolas con papel filtro Whatman No. 5.
- 3.- Lavarlas con solución de Sorensen's durante 48 horas.
- 4.- Pueden pasarse las placas a un recipiente con citrato trisódico al 5.0 % durante tres horas.

- 5.- Dejar dos días más en agua destilada, cambiándola dos o tres veces al día.
- 6.- Colocar la placa en un recipiente con colorante de Negro de amido durante cinco minutos (si se utiliza Rojo de tiazina o Ponccou, dejar 15 minutos).
- 7.- Sacar las placas del recipiente.
- 8.- Lavar con ácido acético al 1.0 % hasta que desaparezca el exceso de colorante.
- 9.- Fijar las placas con solución de glicerina al 1.0 %.
- 10.- Secar a temperatura ambiente.
- 11.- Guardar en cajas para su mejor conservación.

REACCION DE AGLUTINACION

La reacción de aglutinación tiene una gran aplicación en clínica especialmente en el diagnóstico de enfermedades parasitarias. Ya que se pueden detectar pequeñas cantidades de anticuerpos circulantes en el suero.

Cuando se tiene ya sea el antígeno o los anticuerpos en solución y se requiere efectuar la reac-

ción de aglutinación, se puede recurrir al artificio de la adsorción de los mismos a la superficie ya sea de eritrocitos o en caso necesario de uso de partículas inertes como látex, bentonita, poliacrilamina, ó bien leucocitos, bacterias, rickettsias u hongos.

Neter en 1946 observó que los eritrocitos sin tratamiento alguno, adsorbían alguna proteínas y polisacáridos. Más tarde Boyden (1951, 9 y 32). demostró que después de tratar a los eritrocitos con ácido tánico además de unir a su superficie polisacáridos, adsorbían a su membrana lipoproteínas, lipopolisacáridos y algunas otras moléculas produciendo un aumento en la aglutinabilidad de los mismos.

Como se ha mencionado hay una gran variedad de partículas que se emplean como soporte ya sea de antígeno o de anticuerpos, pero los más empleados en la práctica clínica son los glóbulos rojos humanos del grupo " 0 ", o de carnero, los cuales se tratan previamente con formaldehído, ácido tánico, glutaraldehído y otras sustancias químicas.

En la hemaglutinación indirecta, es utilizada la técnica de Boyden modificada (9) la cual consta de pasos fundamentales.

- 1.- En el primer paso se eliminan proteínas séricas que podrían interferir en el desarrollo de la técnica.
- 2.- Se utiliza el tanado de eritrocitos con el fin de alterar y aumentar la receptabilidad de la membrana celular, y así poder unir a ella antígenos variados.
- 3.- La sensibilización de los eritrocitos ya tanados con el antígeno correspondiente; ya que el tanado facilita que éste se una por medio de enlaces covalentes inespecíficos.

TANADO DE ERITROCITOS

- 1.- Los glóbulos rojos suspendidos en anticoagulante se lavan tres veces con P.B.S. pH 7.2, centrifugándolos a 3,000 r.p.m. durante siete minutos eliminándose proteínas séricas que puedan interferir la reacción siguiente.
- 2.- Medir y ajustar el paquete a una suspensión de 2.5 % en P.B.S. pH 7.2.

- 3.- Medir el volumen de eritrocitos, añadir el mismo volumen de ácido tánico 1:20,000.
- 4.- Incubar a 37°C. durante 10 minutos.
- 5.- Centrifugar a 3,000 r.p.m.
- 6.- Decantar y medir el paquete, ajustar los a una suspensión al 2.5 % con P.B.S. pH 6.4.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE ANTIGENO

- 1.- Preparación de diferentes diluciones de antígeno con P.B.S. pH 6.4.
1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 con antígeno fraccionado de Fasciola hepatica.
1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 con los demás antígenos.
- 2.- Sensibilizar los glóbulos rojos ya tratados con las diluciones de antígeno, agregando el mismo volumen de ambos en pH 6.4.
- 3.- Incubar la mezcla en baño maría durante 15 minutos a 37°C.
- 4.- Agregar suero normal de conejo al 1.0%

en P.B.S. pH 7.2.

- 5.- Retirar las células del baño maría, centrifugar a 3,000 r.p.m. durante cinco minutos.
- 6.- Lavar dos veces más con suero normal de conejo.
- 7.- Ajustar el paquete de células a una concentración del 1.5 % en P.B.S. pH 7.2.
- 8.- Los eritrocitos sensibilizados con antígeno de Fasciola hepatica completo y fraccionado, así como con los demás antígenos, son los que se utilizan en la técnica de microhemaglutinación.
- 9.- Colocar en la placa de microhemaglutinación 0.050 ml de suero normal de conejo al 1.0 %, en cada una de las pozas.
- 10.- Con microdilutor (previamente calibrado), agregar 0.050 ml de suero control positivo.
- 11.- Mezclar vigorosamente y preparar las doce diluciones, transfiriendo 0.050 mililitros a cada una de las pozas.

- 12.- Agregar las diluciones de los eritrocitos a la placa con un micropipeta de 0.025 ml.
- 13.- Colocar las placas en un rotor durante tres minutos.
- 14.- Dejar las placas a temperatura ambiente por tres horas hasta que los eritrocitos se observen completamente sedimentados (control negativo).
- 15.- La dilución más baja del antígeno que de el título más alto con el suero control positivo se considera como la dilución o concentración óptima de antígeno.

TITULACION DE LOS SUEROS

- 1.- Inactivar los sueros problema a 56°C durante 30 minutos.
- 2.- Agregar con una micropipeta 0.050 ml de suero normal de conejo al 1.0 % en P.B.S. pH 7.2, a todas las pozas.
- 3.- Agregar con un microdilutor 0.050 ml de los sueros problema, en la primera poza de cada línea de la placa, mez

clar perfectamente y transferir a la siguiente 0.050 ml y así sucesivamente hasta la última poza, de la cual se eliminan los 0.050 ml finales.

- 4.- Agregar con una micropipeta 0.025 ml de eritrocitos sensibilizados con los respectivos antígenos.
- 5.- Colocar la placa en un rotor durante cinco minutos.
- 6.- Dejar las placas reposar tres horas a temperatura ambiente.
- 7.- Realizar la lectura correspondiente.

CONTROLES DE LA PLACA

Suero normal de conejo el 1.0 % 0.050 ml.	Diluciones del suero normal de conejo con el suero control negativo.	Eritrocitos sensibilizados	negativo
Suero normal de conejo al 1.0 % 0.050 ml.	Diluciones del suero control positivo.	Eritrocitos sensibilizados.	positivo
Suero normal de conejo al 1.0 % 0.050 ml.	Diluciones del suero control positivo.	Eritrocitos tanados	negativo

R E S U L T A D O S

Después de obtener el antígeno completo de Fasciola hepatica, se procedió a la estandarización de la columna de cromatografía. Se realizaron diez fraccionamientos de prueba, variándose en cada uno de ellos el volumen de elución, la concentración y volumen de antígeno así como el volumen de Sephadex G-100 utilizado para empacar la columna; Quedando estandarizada como sigue:

Volumen de elución	100.0 ml
Volumen de antígeno	1.0 ml
Concentración de antígeno	
Proteínas	3.02 mg/ml
Carbohidratos	1.02 mg/ml
Concentración de Sephadex	4.02 g

Se realizaron otros fraccionamientos, con el objeto de corroborar si los datos obtenidos eran los adecuados. Después de efectuar el fraccionamiento del antígeno, se leyó cada fracción a 280 nm. Las fracciones que contenían la mayor absorvancia se le determinó contnenido de proteínas por el método de Lowry (47). Se realizó un total de 120 fraccionamientos para tener un lote adecuado del antígeno fraccionado.

La gráfica 1 muestra las fracciones obtenidas del antígeno completo de Fasciola hepatica, siendo las de mayor contenido proteico la 9, 10 y 11.

Se inoculó un lote de conejos con antígeno completo de Fasciola hepatica para tener suero control positivo y poder tener así un marco de referencia para comparar las fracciones 9, 10 y 11. Cuadro 1

Seleccionandose la fracción No. 9 como antígeno fraccionado. Después de observar los resultados.

Se efectuaron pruebas de inmunodifusión, contrainmunolectroforesis, inmunolectroforesis y hemaglutinación en los siguientes sistemas:

Sistema a.- Antígeno fraccionado con suero contra antígeno no crudo de Fasciola hepatica. Figuras 7, 8 y 10.

Sistema b.- Antígeno completo de Fasciola hepatica con suero contra antígeno fraccionado de Fasciola hepatica. Figuras 7 y 9.

Sistema c.- Antígeno completo de Fasciola hepatica con su suero homologo. Figuras 5, 6, 8 y 10.

Con los datos obtenidos, una vez estandarizadas las técnicas ya mencionadas, se procedió a analizar

posibilidad de encontrar reacciones cruzadas que pudieran en un momento dado presentarse con los antígenos completo y fraccionado de Fasciola hepatica, con sueros positivos a otras parasitosis. Para tal efecto se recurrió al Banco de Antígenos y Sueros del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Medicina, del cual se seleccionaron 100 sueros positivos a varias parasitosis y 42 sueros positivos a Fasciola hepatica.

En el cuadro 2 se muestra la cuantificación de anticuerpos en los conejos inmunizados con: Lote A homogenado de parásitos adultos de Fasciola hepatica. Lote B con antígeno fraccionado de Fasciola hepatica. El sangrado periódico mostró que el título mayor de anticuerpos se alcanza tres días después de la cuarta inoculación con 1:4096 y 1:1024 para los lotes A y B respectivamente. En este momento se sangraron los conejos a blanco para tener suero hiperinmune.

En el cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos al utilizar los sistemas A, B y C.

En el cuadro 4 se compara la sensibilidad del antígeno fraccionado con el antígeno completo de Fasciola hepatica que tradicionalmente se emplea en el diagnóstico de la fasciolosis usando 42 sueros positivos a

Fasciola hepatica.

En los cuadros siguientes se presentan los resultados obtenidos con los diferentes antígenos y sueros positivos a otras parasitosis, usando antígeno fraccionado y completo de Fasciola hepatica.

En el cuadro 5 se observa la relación de 100 sueros positivos a diferentes antígenos parasitarios empleados para estudiar la especificidad de los antígenos de Fasciola hepatica.

En el cuadro 6 se comparan los resultados del antígeno de Fasciola hepatica en diferentes pruebas contra diez sueros controles positivos usados en el Laboratorio de Inmunoparasitología, con título conocido en hemaglutinación, para los diferentes parásitos. Observándose que solo con Cysticercus cellulosae completo da un título en hemaglutinación 1:64, y se presenta una banda de precipitación; este título es bajo en comparación con el suero específico, pero las pruebas de precipitación resultaron positivas, lo que indica que hay una reacción cruzada en este sistema.

En el cuadro 7 se observa la comparación de resultados del antígeno fraccionado de Fasciola hepatica en diferentes pruebas con los diez sueros positivos a distintos parásitos, haciéndose notar que los títulos

en hemaglutinación fueron bajos; y en las pruebas de precipitación los resultados fueron negativos.

En el cuadro 8 se analizan los resultados obtenidos con 36 sueros de pacientes positivos a Cysticercus cellulosae en hemaglutinación (tomografía positiva) y probados con antígeno somático completo de Fasciola hepatica en hemaglutinación y pruebas de precipitación, observándose que en hemaglutinación y pruebas de precipitación hay 13 sueros con título de 1:128 que dan positivos en las pruebas de precipitación.

En el cuadro 9 se observan los resultados obtenidos al probar 36 sueros de pacientes positivos a Cysticercus cellulosae con antígeno fraccionado de Fasciola hepatica en pruebas de precipitación y aglutinación, las cuales son negativas.

En los cuadros siguientes se muestran los resultados con los demás sueros positivos a otras parasitosis los cuales son negativos o tienen títulos muy bajos, los cuales son considerados negativos.

CUADRO 1

RESULTADO DE HEMAGLUTINACION Y PRUEBAS DE PRECIPITACION
DE LAS FRACCIONES 9, 10 y 11 CONTRA SUERO HIPERINMUNE A
FASCIOLA HEPATICA

FRACCION	HEMAGLUTINACION		NUMERO DE BANDAS		
	TITULO AG	TITULO AC	DD	IEP	CIEP
9	32	1024	2	2	2
10	16	512	1	1	1
11	8	256	1 _{&}	1 _{&}	1 _{&}

& Recíproco del título.

& Una banda débil positiva.

Cuadro 2

**CUANTIFICACION DE ANTICUERPOS POR HEMAGLUTINACION INDIRECTA
DE LOS CONEJOS INMUNIZADOS CON HOMOGENADO DE PARASITOS ADUL
TOS Y ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA**

Número de ino culación.	Días de ti tulación de Ac.	<u>Hemaglutinación</u>	
		Lote A &	Lote B &
1a.	1	-	-
2a.	8	8	4
	10	16	8
	11	32	16
3a.	15	256	64
	16	512	128
4a.	22	1024	256
	24	2048	512
	25	4096	1024
	27	4096	1024

Lote A.- Homogenado de parásitos adultos de Fasciola hepatica

Lote B.- Antígeno fraccionado de Fasciola hepatica

& .- Recíproco del título.

CUADRO 3

RESULTADO DE LOS TRES SISTEMAS EMPLEADOS PARA CONOCER LA REACTIVIDAD DE LOS ANTIGENOS Y SUEROS CONTROLES POSITIVOS

Sistema	Titulo en hema glutinación. &	Precipitación No. de bandas		
		DD	IEF	CIEF
a	1024	2	2	2
b	1024	2	2	2
c	4096	8	8	8

& Recíproco del título.

CUADRO 4

COMPARACION DE LA SENSIBILIDAD DEL ANTIGENO COMPLETO Y -
FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA EN HEMAGLUTINACION IN -
DIRECTA UTILIZANDO 42 SUEROS POSITIVOS A FASCIOLA HEPÁTICA

Hemaglutinación &	Número de sueros	
	Ag. completo	Ag. fraccionado
16	-	5
32	8	6
64	6	6
128	5	9
256	5	6
512	9	5
1024	9	5

& Recíproco del título.

CUADRO 5

RELACION DE SUEROS DE PACIENTES POSITIVOS A DIFERENTES ANTIGENOS PARASITARIOS

<u>Antígeno</u>	<u>Número de sueros</u>
<u>Cysticercus cellulosae</u>	36
<u>Trichinella spiralis</u>	19
<u>Ascaris lumbricoides</u>	28
<u>Toxacara canis</u>	10
<u>Quiste hidatídico</u>	1
<u>Entamoeba histolytica</u>	2
<u>Trypanosoma cruzi</u>	4
	<hr/>
	100

CUADRO 6

COMPARACION DE RESULTADOS DEL ANTIGENO SOMATICO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA EN DIFERENTES PRUEBAS CONTRA LOS 10 SUEROS CONTROLES POSITIVOS A DISTINTOS PARASITOS Y TITULO CONOCIDO EN HEMAGLUTINACION

Sueros positivos a	Titulo especifico en HIA. &	Antigeno completo de <u>Fasciola hepatica</u>			
		Hg ^A	DD	IEF	GIEF
<u>Cysticercus cellu losae</u> completo	4096	64	1 ⁺	1 ⁺	1 ⁺
<u>Cysticercus cellu losae</u> incompleto	4096	8	-	-	-
<u>Cysticercus cellu losae</u> excreciones y secreciones	1024	-	-	-	-
<u>Cysticercus cellu losae</u> fluido vesicular.	2048	4	-	-	-
<u>Ascaris lumbricoides</u>	1024	4	-	-	-
<u>Trichinella spiralis</u>	2048	2	-	-	-
<u>Toxocara canis</u>	2048	4	-	-	-
<u>Paragonimus mexicanus</u>	1024	8	-	-	-
<u>Trypanosoma cruzi</u>	2048	-	-	-	-
<u>Leishmania donovani</u>	2048	-	-	-	-

& Reciproco del titulo.

+ una banda en todos los casos.

CUADRO 7

COMPARACION DE RESULTADOS DEL ANTIGENO FRACCIONADO DE FAS
CIOLA HEPATICA EN DIFERENTES PRUEBAS CONTRA 10 SUEROS CON
TROLES POSITIVOS A DISTINTOS PARASITOS Y TITULO CONOCIDO
EN HEMAGLUTINACION

Sueros positi vos a	Titulo especifico en Hg ^{&}	Antígeno fraccionado			
		Hg ₂	DD	IEF	CIKF
<u>Cysticercus cellu losae completo</u>	4096	4	-	-	-
<u>Cysticercus cellu losae incompleto</u>	4096	2	-	-	-
<u>Cysticercus cellu losae excreciones y secreciones</u>	1024	-	-	-	-
<u>Cysticercus cellu losae fluido vesicular</u>	2048	4	-	-	-
<u>Ascaris lumbricoides</u>	1024	2	-	-	-
<u>Leishmania donovani</u>	2048	-	-	-	-
<u>Toxocara canis</u>	2048	-	-	-	-
<u>Paragonimus mexica- nus</u>	1024	-	-	-	-
<u>Trypanosoma cruzi</u>	2048	-	-	-	-
<u>Trichinella spiralis</u>	2048	-	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 8

RESULTADO DE LOS 36 SUEROS POSITIVOS A CYSTICERCUS CELLULO
SAB PROBADOS CON ANTIGENO SOMATICO COMPLETO DE FASCIOLA H
PATICA UTILIZANDO DIFERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEP	CIEP
2	4	-	-	-
3	8	-	-	-
8	16	-	-	-
5	32	-	-	-
5	64	-	-	-
13	128	+10/13	+7/13	+7 /13

& Recíproco del título.

+ en todos los casos una banda de precipitación.

CUADRO 9

RESULTADO DE LOS 36 SUEROS POSITIVOS A CYSTICERCUS CELLULOSE PROBADOS CON ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA UTILIZANDO DIFERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEF	CIEF
6	-	-	-	-
5	2	-	-	-
2	4	-	-	-
2	8	-	-	-
21	16	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 10

RELACION DE LOS 19 SUEROS POSITIVOS A TRICHINELLA SPIRALIS
PROBADOS CON ANTIGENO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA UTILI-
ZANDO DIFERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEP	CIEP
3	2	-	-	-
5	4	-	-	-
11	8	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 11

RELACION DE LOS 19 SUEROS POSITIVOS A TRICHINELLA SPIRALIS
PROBADOS CON ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA UTI-
LIZANDO DIFERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. Bandas		
		DD	IEP	CIEP
5	2	-	-	-
14	4	-	-	-

& Recíproco del título.

- 63 -
 CUADRO 12

**RELACION DE LOS 28 SUEROS POSITIVOS A ASCARIS LUMBRICOIDES
 PROBADOS CON ANTIGENO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA UTILI-
 ZANDO DIFERENTES TECNICAS**

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEP	GIEP
16	2	-	-	-
5	4	-	-	-
7	8	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 13

**RELACION DE LOS 28 SUEROS POSITIVOS A ASCARIS LUMBRICOIDES
 PROBADOS CON ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA UTI-
 LIZANDO DIFERENTES TECNICAS**

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEP	GIEP
19	2	-	-	-
8	4	-	-	-
1	8	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 14

RELACION DE 10 SUEROS POSITIVOS A TOXOCARA CANIS CON ANTI
GENO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA UTILIZANDO DIFERENTES
TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEP	CIEP
7	4	-	-	-
3	8	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 15

RELACION DE 10 SUEROS POSITIVOS A TOXOCARA CANIS CON ANTI
GENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA UTILIZANDO DIFERENTES
TES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEP	CIEP
8	2	-	-	-
2	4	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 16

RELACION DE UN SUERO POSITIVO AQUISTE HIDATIDICO PROBADO
CON ANTIGENO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA UTILIZANDO DI
FERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEF	CIEF
1	2	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 17

RELACION DE UN SUERO POSITIVO A QUISTE HIDATIDICO PROBADO
CON ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA UTILIZANDO
DIFERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	Precipitación No. bandas		
		DD	IEF	CIEF
1	-	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 18

RELACION DE DOS SUEROS POSITIVOS A ENTAMORBA HISTOLYTICA
PROBADOS CON ANTIGENO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA UTI
LIZANDO DIFERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	<u>Precipitación No. bandas</u>		
		DD	IEP	CIKF
2	4	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 19

RELACION DE DOS SUEROS POSITIVOS A ENTAMORBA HISTOLYTICA
PROBADOS CON ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA
UTILIZANDO DIFERENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	<u>Precipitación No. bandas</u>		
		DD	IEP	CIKF
2	-	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 20

RELACION DE 4 SUEROS POSITIVOS A TRYPANOSOMA CRUZI PROBADOS
CON ANTIGENO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA UTILIZANDO DIFE
RENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	<u>Precipitación No. bandas</u>		
		DD	IEF	CIEF
2	-	-	-	-
2	2	-	-	-

& Recíproco del título.

CUADRO 21

RELACION DE 4 SUEROS POSITIVOS A TRYPANOSOMA CRUZI PROBADOS
CON ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA UTILIZANDO DI
RENTES TECNICAS

Número de sueros	Hemaglutinación &	<u>Precipitación No. bandas</u>		
		DD	IEF	CIEF
4	-	-	-	-

& Recíproco del título.

CICLO BIOLÓGICO de

Fasciola hepatica

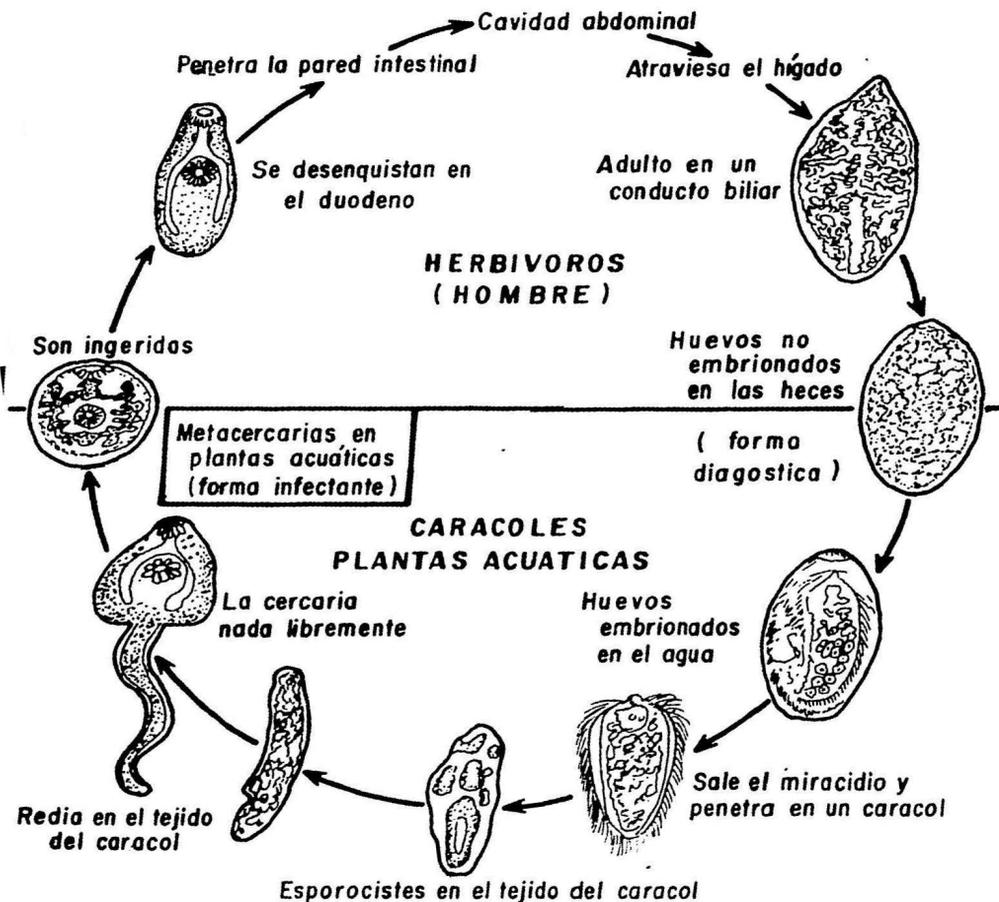


Figura 1

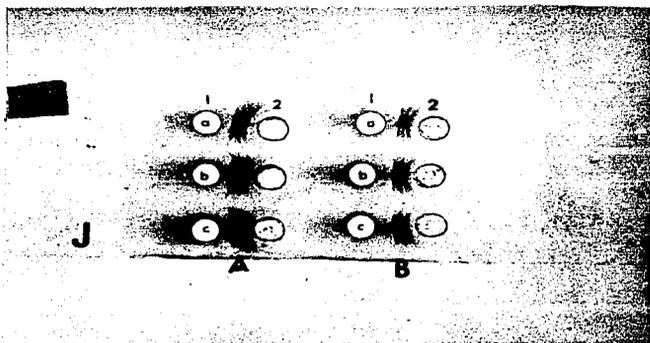


Figura 5
Contrainmuno-electroforesis la cual se
montó con antígeno completo de Fascio
la hepatica contra suero homólogo

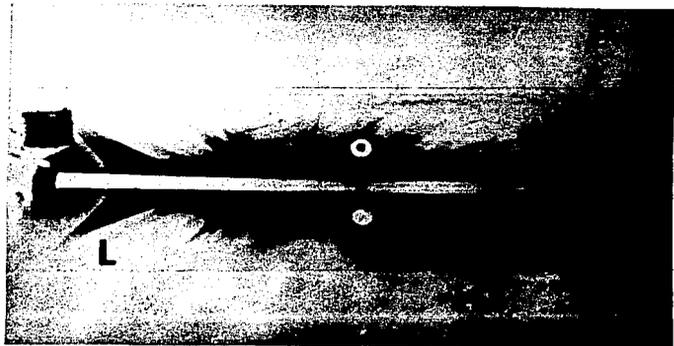


Figura 6

Inmunoelectroforesis en la cual se probó el antígeno completo de Fasciola hepatica, así como el suero hiperinmune correspondiente.

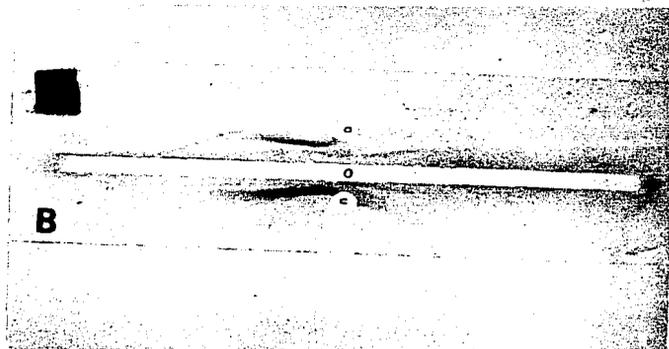


Figura 7

Inmunoelectroforesis que se montó con -
Antígeno fraccionado de Fasciola hepatica
ca con sueros controles positivos a Antí
geno fraccionado y completo de Fasciola
hepatica.

O.- Antígeno fraccionado de Fasciola hepatica

a.- Suero control positivo a Antígeno fraccio
nado de Fasciola hepatica.

c.- Suero control positivo a antígeno comple
to de Fasciola hepatica.

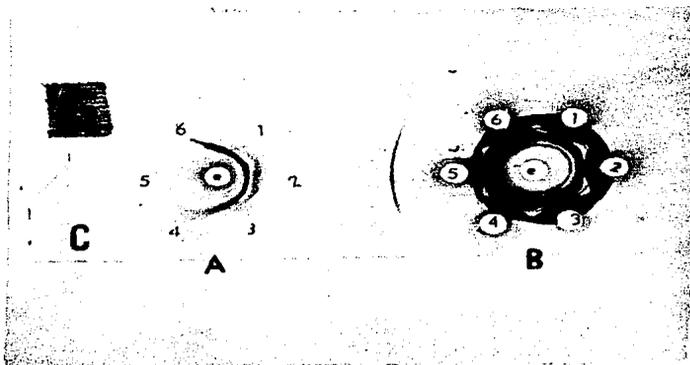


Figura 8

Immunodifusión en la que se utilizó antígeno completo y fraccionado de Fasciola hepática, con suero control positivo contra antígeno completo de Fasciola hepática

Sistema A.- Antígeno fraccionado y suero homólogo.

Sistema B.- Antígeno completo y suero homólogo.

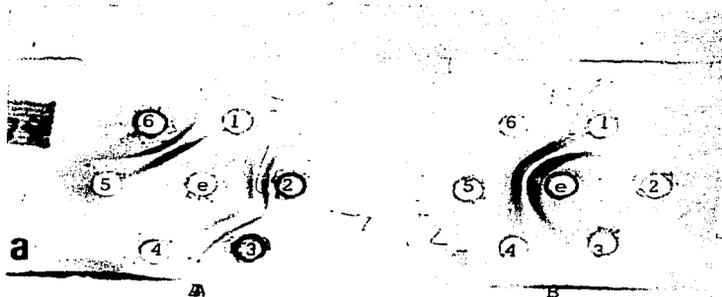


Figura 9

Inmunodifusión en la que se utilizó la mezcla de las fracciones No. 9 que se utilizará como antígeno fraccionado de Fasciola hepatica.

Sistema A.- Poza 2-3 Fracción No. 9
Poza 6 Antígeno completo de Fasciola hepatica
Poza e Suero homólogo a Antígeno fraccionado de Fasciola hepatica

Sistema B.- Poza 5-6 Fracción No. 9
Poza e Suero homólogo a antígeno completo de Fasciola hepatica.

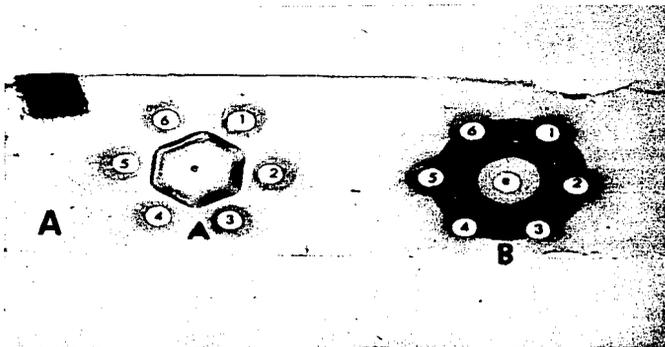


Figura 10

Immunodifusión que se montó con antígeno fraccionado y completo de Fasciola hepática con sus respectivos sueros homólogos.

Sistema A.- Antígeno fraccionado y suero homólogo.

Sistema B.- Antígeno completo y suero homólogo.

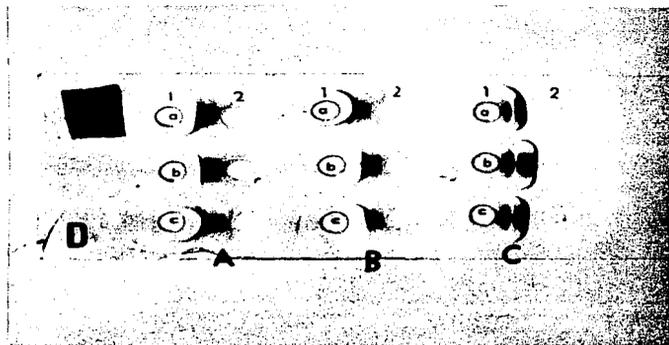


Figura 11

Contrainmuno-electroforesis que se montó utilizando antígeno completo de Fasciola hepatica, así como seis sueros humanos a los cuales se les detectó esta parasitosis.

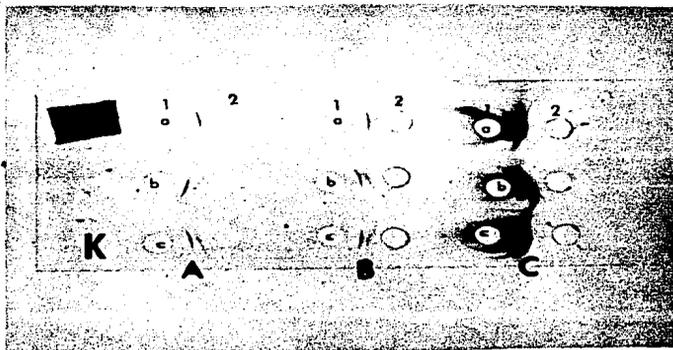


Figura 12

Contrainmunolectroforesis que se montó utilizando antígeno fraccionado de Fasciola hepatica, así como seis sueros humanos a los cuales se les detectó la parasitosis.

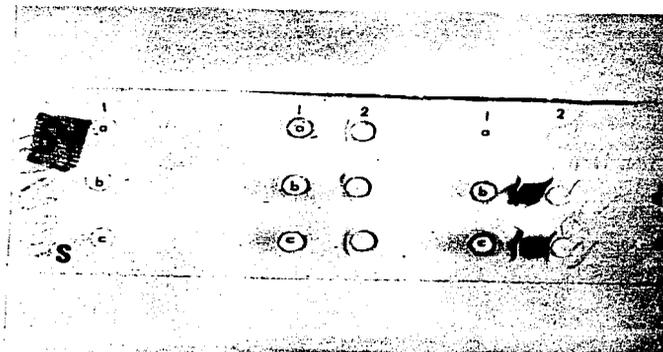


Figura 13

**Centrainmuno-electroforesis en la cual se prueba antígeno completo y fraccio-
nado de Fasciola hepatica contra sueros de pacientes con cisticercosis.**

Sistema A.- Antígeno fraccionado y sueros de pacientes con cisticercosis.

Sistema B.- Antígeno completo y sueros de pacientes con cisticercosis.

Sistema C.- Controles de la placa.

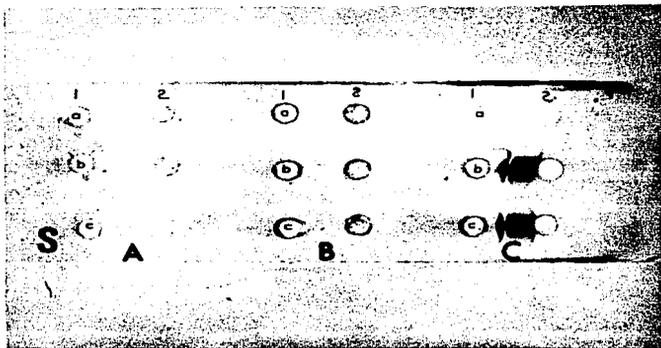
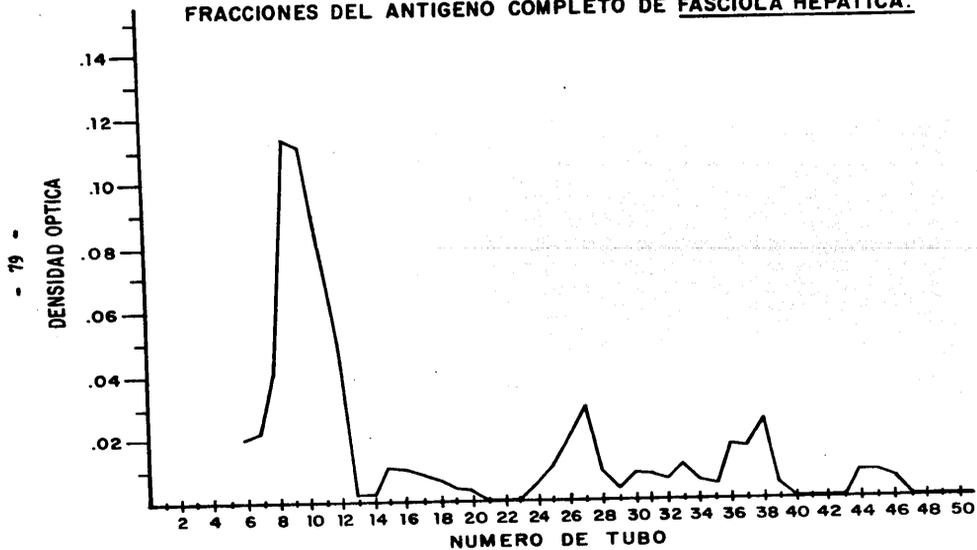


Figura 14
Contrainmunelectroforesis que se mon-
tó utilizando antígeno fraccionado con
sueros de pacientes con cisticercosis.
Sistema A y B.- Sueros de pacientes con
cisticercosis y antígeno frac-
cionado de Fasciola hepatica.
Sistema C.- Controles de la placa.

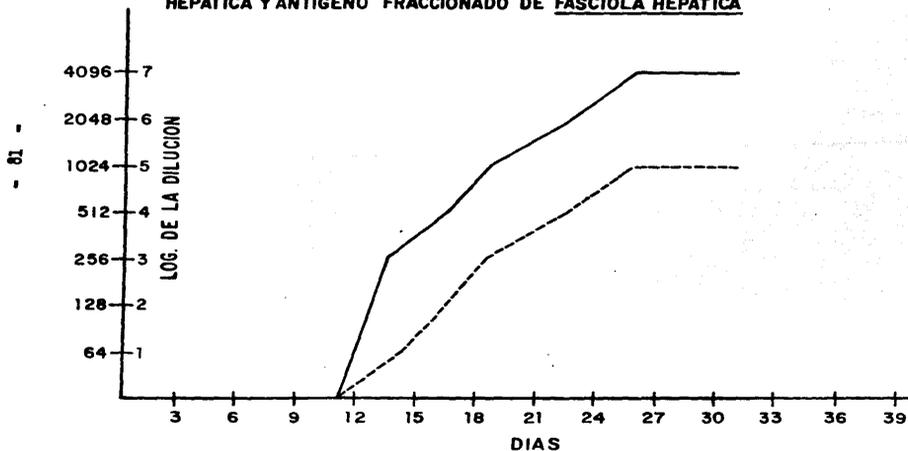
GRAFICA 1

DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO DE LAS DIFERENTES
FRACCIONES DEL ANTIGENO COMPLETO DE FASCIOLA HEPATICA.



GRAFICA 2

**CURVA DE PRODUCCION DE ANTICUERPOS EN LOS CONEJOS
INMUNIZADOS CON HOMOGENADO DE ADULTOS DE FASCIOLA
HEPATICA Y ANTIGENO FRACCIONADO DE FASCIOLA HEPATICA**



D I S C U S I O N

Por lo que se refiere al fraccionamiento tal y como se muestra en la grafica 1, en la que se observa una serie de picos, indica cada uno de ellos diferentes concentraciones de proteínas. De este fraccionamiento se seleccionó la fracción que tenía el mayor contenido de proteínas (0.280 mg/ml), siendo esta la número

Se sensibilizaron dos lotes de conejos, uno con homogenado de parásitos adultos de Fasciola hepatica y el otro con el antígeno fraccionado de Fasciola hepatica (fracción 9), con el fin de obtener sueros controles positivos que sirvieran para realizar con ellos realizar las pruebas ya mencionadas.

Como se observa en la gráfica 2 y cuadro 2 el antígeno fraccionado dió un título de 1:1024 y el completo de 1:4096, en ambos casos el título de anticuerpos se detectó 25 días después de la primera inmunización.

Al efectuar las pruebas de inmunodifusión, inmunolectroforesis, contrainmunolectroforesis y hemaglutinación indirecta, con el antígeno completo de Fasciola hepatica y su suero homólogo, se observan ocho bandas de precipitación, figuras 5 y 6.

De igual manera al combinar ambos sistemas ó sea antígeno fraccionado de Fasciola hepatica con suero control positivo de antígeno completo de Fasciola hepatica, se detectan dos bandas de precipitación, figura 8. Al invertir los sistemas, empleando antígeno completo de Fasciola hepatica con suero control positivo a antígeno fraccionado de Fasciola hepatica, se detectaron de igual manera dos bandas de precipitación, figura 9. Al probar antígeno fraccionado con su suero homólogo se detectan dos bandas de precipitación, figura 10. Esto era de esperarse ya que si se hace reaccionar antígeno completo de Fasciola hepatica más suero control positivo de antígeno fraccionado, estos anticuerpos van a reaccionar contra un número menor de determinantes antigénicos y específicamente selectivos. En el caso contrario del antígeno fraccionado con el suero control positivo a antígeno completo de Fasciola hepatica los determinantes antigénicos que el suero reconoce son menores y a esto se debe la escasa reactividad del mismo.

Esto nos dió la pauta para que la fracción 2 se siguiera empleando en la segunda parte de este trabajo que consistió en efectuar reacciones con 100 sueros positivos a diferentes parásitos y 42 sueros positivos con

fasciolosis, que se seleccionaron del Banco de Sueros, el estudio se hizo comparativamente con el antígeno completo y fraccionado de Fasciola hepatica.

Respecto al estudio que se hicieron con sueros almacenados en el Banco de Sueros del Laboratorio de Inmunoparasitología, hay que tomar en cuenta que la mayor parte de los mismos provenían de pacientes a los que se les diagnóstico la parasitosis, los cuales estaban congelados o en algunos casos liofilizados. Estos sueros antes de utilizarlos se retitularon en hemaglutinación y en técnicas de precipitación, donde se presentan de 2 a 4 bandas de precipitación. Cuadro 5 .

Hay que señalar que se probaron sueros de pacientes con diagnóstico temprano de fasciolosis (Instituto Nacional de Pediatría, Instituto Nacional de Enfermedades Tropicales y Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional). Los resultados (cuadro 4) muestran la cantidad de sueros positivos con antígeno completo y fraccionado de Fasciola hepatica y el número de bandas varió de 2 a 8 bandas de precipitación (figuras 11 y 12).

Existe bibliografía en la que se reporta que el uso de antígeno completo presenta reacción cruzada

con otros helmintos (35 y 39), por lo que en este trabajo tratamos de verificar este problema; probando en primer lugar los diferentes antígenos parasitarios que preparan en el Laboratorio de Inmunoparasitología, con sus respectivos sueros homólogos para poder confirmar la reactividad de ambos, ya que se utilizarán más adelante como controles en las técnicas ya mencionadas.

En el cuadro 6, figura 13 se observa que el suero contra antígeno de Cysticercus cellulosae completo es el único que presenta reacción cruzada con el antígeno de Fasciola hepatica completo, esto era de esperarse ya que el uso de antígenos crudos origina este tipo de reacciones.

En el cuadro 8 se muestran los resultados de los 36 sueros positivos a Cysticercus cellulosae que también dan reacción cruzada. Observándose que sólo se presenta con sueros cuyo título es mayor de 1:64 en hemaglutinación. Con el antígeno fraccionado no se presenta esta situación. Cuadro 9.

Con demás sueros positivos a tres parásitos no se obtuvo resultado positivo alguno, con ambos antígenos de Fasciola hepatica. Cuadros 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21 .

Estos resultados eran de esperarse, ya que al someterse un antígeno completo a fraccionar, se eliminan de él constituyentes químicos, como lípidos, lipoproetinas, que pudieran ser afines y semejantes a otros helmintos, por lo que el uso de antígenos fraccionados las eliminan.

C O N C L U S I O N E S

Considerando que está estudio se efectuó en forma comparativa y que en la mayoría de los experi-mentos se establecieron llevando una relación antígeno-completo-antígeno fraccionado se concluyó:

- 1.- Que la fracción 9 obtenida a partir del antígeno completo, es una fracción específica para interaccionar con su suero homólogo, así como con el suero homólogo del antígeno completo.
- 2.- Que en ambos antígenos, el título ma-yor de anticuerpos se obtuvo a los 25 días después de la primera inoc-ulación: sosteniéndose así 11 días - más, para después disminuir.
- 3.- Que es más fácil efectuar la técnica de contrainmunolectroforesis, con la que se obtienen resultados quali-tativos en una hora por lo que se recomienda para el diagnóstico de es-ta parasitosis.

4.- No se puede correlacionar el título de anticuerpos que se detectan atrás de la hemaglutinación con res - pecto a la sintomatología ya que el número de casos que se manejaron, no son suficientes para hacer dicha correlación.

5.- Que el uso de esta fracción, ^telimina cualquier tipo de reacción cruza da con los helmintos aquí utiliza - dos, por lo que nos da una mayor es pecificidad.

6.- Que el uso de antígenos completos ya no debe seguir empleandose en el - diagnóstico de parasitosis por que da lugar a reacciones cruzadas.

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

- 1.- Alter, H. J., Holland, P. V.: Counterlectrophoresis for detection of hepatitis-associated antigen. Methodology and comparison with gel diffusion and complement fixation. J. Lab. Clin. Med. 77: 1 000 - 1 100. 1971
- 2.- Anderson, J. C., Hughes, D. L. and Harnnes, E.: The immune response of rats to subcutaneous implantation with Fasciola hepatica. Br. Vet. J. 131: 509 - 518. 1975.
- 3.- Barret, J.: Immunologia. 2a. Ed. Inter. México. 99 - 133. 1972.
- 4.- Beldin, L. D.: Text-book of Parasitology. 3a. Ed. Meredith Pub. Co. New York. 650 - 670. 1975.
- 5.- Bénex, J.: Fractionnement d'un antigène délipidé de Fasciola hepatica. Ann. Inst. Pauster. 113: 815 - 822. 1967.
- 6.- Biguet, J., Capron, A., Tran van ky, P.: Les antigenes de Fasciola hepatica. Ann. Parasi. Hum. Comp. 37: 221 - 231. 1962.

- 7.- Biagi, F. P., Soto, R.: Dos casos de fasciolosis en su periodo inicial, como problema de diagnóstico. Rev. Inv. Clin. Med Tom. 37: 533 - 544. 1959.
- 8.- Brindle, Y.: Investigation of antibodies against Fasciola hepatica in mouse alcea-american. Cand. J. Microbiol. 24: 788 - 78 1978.
- 9.- Boyden, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Exp. Med. 93: 107 - 120. 1951.
- 10.- Capron, A., Biguet, J., Tran van ky, P., Rosé, G.: Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique de la distomatose humaine a Fasciola hepatica. La Presse Médicale 72: 3103 - 3107. 1964.
- 11.- Cheng, C. T.: Parasitologia general. 1a. Ed. AC. Barcelona. 370 - 463. 1978.
- 12.- Cuperlović, K., Movsesijan, M.: Isolation and labeling during the infection. J. Parasitol. 58: 1209 - 1210. 1972.

- 13.- Cruz, J. A.: Value and limits of immuno - diagnostic methods in veterinary helmin - thiasis. Rev. Iber. Parasitol. 31: 94 - 113. 1971.
- 14.- Dawes, B.: A study of miracidium of Fasciola hepatica and account of mode of penetration of the sporocyst into Lymnaea truncatula. J. Helminth Suplem 1960. 76 - 79.
- 15.- Daes, D.: Hyperplasia of the bils duct in fascioliasis and its relation to the problem of nutrition in the liver fluke, Fasciola hepatica. J. Parasitol. 53: 123-- 133. 1963.
- 16.- Deelder, A. M., Floem, J. S.: An immuno - fluorescence reaction for Fasciola hepatica using the defined antigen substrate-spheres (D.A.S.S.) system. Exp. Parasitol. 37: 173 - 178. 1975.
- 17.- Delaat, N. A.: Primer of serology. 1a. Ed. Harper and Row. Pub. New York. 1976.
- 18.- Díaz, C. R., Pérez. P. C.: Investigación simultanea de diversos antígenos y anticuerpos por inmunoelectroforesis cruzada. Rev.

- Mex. Pat. Clin. 26: 27 - 30. 1974.
- 19.- Drewood, R.: Sugar measurement with antri
hone reactive. Ind. Eng. Chem. Anal. 18:
499 - 510. 1946.
- 20.- Fisher, L.: Introducción a la cromatogra-
fia en gel. 3a. Ed. Manual moderno. Méxi-
co. 1975.
- 21.- Fudenberg, H. H., Well, J. V.: Manual de
Inmunología Clínica. 2a. Ed. Manual Moder-
no. México. 378 - 415. 1980.
- 22.- Goldsmith, R. S., Kagan, I. G.: Estudios
seroepidemiológicos realizados en Oaxaca
México. Bol. Ofic. Sal. Pub. Pan. 71: 500
518. 1971.
- 23.- Gómez, A. T., Pérez, R. R.: Fasciolosis
in México. Present status and intermedia-
ry host. Rev. Lat. Am. Microbiol. 20: 121
127. 1979.
- 24.- González, H. A.: Evaluación de las pérdi-
das económicas ocasionadas por el decomi-
so parcial o total de hígados de res, para
sitados con Fasciola hepatica. Tesis. Fac.
Med. Vet. Zoot. U.N.A.M.. 1969.

- 25.- Good, R. A., Fisher, D. W.: Immunobiología. Conceptos básicos y aplicaciones clínicas. 1a. Ed. Espax. Barcelona. 67 - 86. 1975.
- 26.- Hall, R. F., Lang, B. Z.: The development of a experimental vaccine against Fasciola hepatica en cattle. Proc. Annu, Meet. U. S. Anim. Health. Assoc. 82: 56 - 66. 1978.
- 27.- Harnness, E., Hughes, D. I. and Doy, G.: The demonstration of pre-hepatic immune response to Fasciola hepatica in mouse. Int. J. Parasitol. 6: 15 - 17. 1976.
- 28.- Hayes, T. J., Mitrović, M., Bailer, K.: Immunity in rats to superinfection with Fasciola hepatica. J. Parasitol. 58: 1 103 1 105. 1972.
- 29.- Hayes, T. J., Mitrović, M. Bailer, J.: Immunity to Fasciola hepatica in rats; the effect different levels of primary exposure on superinfection. J. Parasitol. 59: 810 - 812. 1973.
- 30.- Hayes, T. J., Mitrović, M. Bailer, J.: Studies on the serum transfer of immunity to Fasciola hepatica in rats. J. Parasitol 60:

930 - 934. 1974.

- 31.- Hayes, T. J., Mitrović, M., Bailer, J.:
The early expression of protective immunity to Fasciola hepatica, in rats. J. Parasitol. 63: 584 - 587. 1977.
- 32.- Herbert, W. J.: Passive hemagglutination with special reference to the tanned cell technique. Hand book of experimental Immunology. Black Well Sci. Publ. 20.1 - 20.9. 1973.
- 33.- Hernández-Chiffas, J. C., Tay Z. J., Biagi, F. F.: Epidemia familiar de fasciolosis en la Ciudad de México. Rev. Med. 9: 529 531. 1959.
- 34.- Hillyer, G. V.: Immunodiagnosis of human fascioliasis. J. Parasitol. 62: 1 011 - 1 113. 1976.
- 35.- Hillyer, G. V., Santiago, W. N.: Partial purification of Fasciola hepatica antigen for the immunodiagnosis of fasciolosis in rats. J. Parasitol. 65: 430 - 433. 1977.
- 36.- Hughes, D. L., Harnes, E.: Attempts to demonstrate a host antigen effect by the experimental transfer of adult Fasciola hepatica into recipient animals immunised against

- the donor. Rev. Vet. Sci. 14: 151 - 154. 1973.
- 37.- Kagan, I. G., Goodchol, G. G.: Paper electrophoresis of sera man experimental animals infected with various helminthes. J. Parasitol. 42: 373 - 377. 1960.
- 38.- Kagan, I. G.: Serodiagnosis of parasitic diseases. Laboratory Manual II. 1974.
- 39.- Korach, M. S., Benéx, J.: A lipoprotein antigen in Fasciola hepatica. II. Immunological and immunochemical properties. Exp. Parasitol. 19: 199 - 205. 1966.
- 40.- Korach, M. S., Benéx, J.: A lipoprotein antigen in Fasciola hepatica. I. Isolation, physical and chemicals data. Exp. Parasitol. 19: 193 - 198. 1966.
- 41.- Korach, M. S., Benéx, J., Belmont, J. N.: Isolament d'un antigen lipoidique complet de Fasciola hepatica. Acad. Sci. 265: 570 572. 1967.
- 42.- Korach, M. S., Mangolo, R., Tailliez, R.: Isolement d'un antigene especifique de la grande douve du foie Fasciola hepatica. Acad. Sci. 265: 466 - 469. 1967.

- 43.- Lang, B. Z.: Host-parasite relationships of Fasciola hepatica in the white mouse. V. Age of flukes responsible for the induction of acquired immunity. J. Parasitol. 60: 90 - 92. 1974.
- 44.- Lang, B. Z.: Host-parasite relationships of Fasciola hepatica in the white mouse. VI. Studies on the effects of immune and normal sera on the viability of young worms transferred to normal recipients. J. Parasitol. 60: 925 - 929. 1974.
- 45.- Lee, D. L.: The structure and composition of helminth cuticle. Advanc, Parasitol. 4: 187 - 202. 1966.
- 46.- López, E. E., Ramírez, R. C.: Fasciolasis in Puerto Rico. Report of a case. Bol. Assoc. Med. 70: 181 - 184. 1978.
- 47.- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275. 1951.
- 48.- Mazotti, L.: La aplicación de la intra i: dermoreacción en casos de infección por Fasciola hepatica. Rev. Inst. Salub. Enf. Trop. 9: 257 - 261. 1948.

- 50.- Memorias. Curso de actualización en Inmunoparasitología veterinaria. Fac. Med. Vet. Zoot. U.N.A.M.. 1980.
- 51.- Monthong, J. F.: A non-barbital buffer for immunoelectrophoresis and zone electrophoresis in agarosa-gel. Clin. Chem. 24: 1 825 - 1 827. 1979.
- 52.- Movsesijan, M., Borojevic, D.: Antigen analysis of Fasciola hepatica extraction and fractionation. Int. Ato. Ener. Age. Vienna. Isotopes and radiation in Parasitology. III. 11 - 12. 1973.
- 53.- Nansen. P. Pathophysiological, findings in fascioliasis. Nord. Vet. Med. 26 (sup. 1): 13 - 15. 1974.
- 54.- Nieto, V. A., Silva, J. L.: Human infection by Fasciola hepatica in Brazil. Report of a new case and analysis of problem. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo: 19: 275 - 277. 1977.
- 55.- Noble, N. A.: Parasitología general. 3a. Ed. Inter. México. 295 - 320. 1965.
- 56.- Pautrizel. R., Bailenger, J.: Etudie de la especidite d'un antigeneque de Fascio

- la hepatica dans les test d'allergie cuta-
nee. Rev. Immun. 26: 167 - 174. 1962.
- 57.- Pelley, R. P.: Demonstration of common an-
tigen between Schistosoma mansoni and Fas-
ciola hepatica. Am. J. Trop. Med. Hyg. 27:
1 192 - 1 194. 1978.
- 58.- Quimica Hoeschst de México. Hojas de La-
boratorio para el diagnóstico médico. 1975
- 59.- Quintero, G. E.: Estudio epidemiológico
sobre fasciolosis y otras parasitosis en
Almoloya del Río Edo. de México. Tesis.
Fac. Cien. U.N.A.M. 1976.
- 60.- Rajasekariah, G. R.: Acquired immunity to
the trematode Fasciola hepatica in rats.
Aust. J. Exp. Bio. Med. Sci. 56: 747-
756. 1978.
- 61.- Russell, W., Quentin, N. M., Peusall, N.;
Immunology. 2a. Ed. Inter. México. 30 -
195. 1969.
- 62.- Sasaki, N. J.: Fluorescent antibody of s
studies on the distribution of antigen
in Fasciola sp. with specific antisera
against antigen of agar-gel. J. Parasitol
6: 227 - 233. 1979.

- 63.- Sydney, C., Sandum, E.H.: Immunology of parasitic infection. Back Well Sci. Pub. 1a Ed. Londres. 320 - 327. 1976.
- 64.- Urquhart, G. M., Mulligan, W., Jennino, F. W.: Artificial immunity to Fasciola hepatica in rabbits. I. Some studies with protein antigen of Fasciola hepatica. J. Inf. Dis. 94: 126 - 133. 1953.
- 65.- Atlas of medical Parasitology. Zamman, Vigar. Lea and Fetiter. 1a. Ed. U.S.A. 85 - 99. 1976.