

11661

1

24



**Universidad Nacional Autónoma de México**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN

**ANALISIS INMUNOLOGICO DE LOS  
ANTIGENOS DE  
Fasciola hepatica**

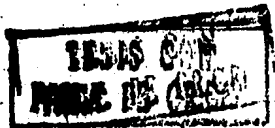
**T E S I S**

Que para obtener el Grado de:  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

Presenta:

**MARIA ANGELA RUIZ NAVARRETE MUÑOZ**

México, D. F.



1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## C O N T E N I D O

Introducción.....	10
1. Generalidades.....	13
1.1. Generalidades acerca de <u>Fasciola hepatica</u> L., 1758.....	14
1.1.1. Notas históricas y geográficas.....	14
1.1.2. Morfología.....	15
1.1.3. Ciclo vital.....	15
1.1.4. Desarrollo de <u>Fasciola hepatica</u> en el hués- ped definitivo.....	19
1.1.5. Signos clínicos, patología y patogenia.....	24
1.1.6. Importancia económica y control.....	28
1.2. Antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> .....	30
1.2.1. Antígenos parasitarios.....	30
1.2.2. Antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> .....	33
1.2.3. Propiedades antigénicas de los estadios su- cesivos de <u>Fasciola hepatica</u> .....	33
1.2.3.1. El huevo y el miracidio.....	33
1.2.3.2. Propiedades antigénicas de las for- mas juveniles.....	34
a) Formas juveniles recién desenquistadas....	34
b) <u>Fasciola hepatica</u> inmadura.....	39
c) Antígeno metabólico inmaduro.....	40

1.2.3.3. <u>Fasciola hepatica</u> adulta.....	42
a) Antígeno somático (AS).....	42
b) Fraccionamiento del AS adulto.....	44
c) Antígenos metabólicos (AM).....	52
1.2.4. Antígenos de reacción cruzada.....	56
1.3. Los antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> en la inducción de resistencia y verificación de la inmunidad..	62
1.3.1. Inducción de resistencia a <u>Fasciola hepatica</u> en el huésped, con antígenos de los estadios sucesivos del parásito.....	62
1.3.1.1. Estimulación de resistencia por huevecillos.....	62
1.3.1.2. Estimulación de resistencia por formas juveniles.....	63
a) Metacercarias irradiadas.....	63
b) Formas juveniles recién desenquistadas.....	65
1.3.1.3. Estimulación de resistencia por parasitos inmaduros.....	68
a) Estimulación de resistencia con AM del gusano inmaduro.....	69
1.3.1.4. Estimulación de resistencia por parásitos adultos.....	70
a) Estimulación de resistencia con antígenos del gusano adulto.....	72

1.3.1.5. Resistencia cruzada entre <u>Fasciola hepatica</u> y otros helmintos.....	73
1.3.2. Los antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> en la verificación de la inmunidad: Inmunodiagnóstico y dinámica de la respuesta inmune.....	75
1.3.2.1. Inmunodiagnóstico.....	75
1.3.2.2. Dinámica de la respuesta inmune.....	82
2. Objetivos.....	89
3. Material y Métodos.....	91
3.1.1. Soluciones.....	94
3.1.2. Antígeno somático (AS).....	95
3.1.3. Antígeno excretorio-secretorio o metabólico (AM).....	96
3.2. Determinación de protefina.....	97
3.3. Preparación de antisuero anti AM y anti AS.....	97
3.4. Animales.....	97
3.5. Exámen coproparasitoscópico.....	98
3.6. Serología.....	98
3.6.1. Difusión doble (DD).....	98
3.6.2. Contraimmunoelectroforesis (CIE).....	98
3.6.3. Hemoaglutinación pasiva (HP).....	99
3.6.4. Inmunoensayo en capa delgada (ICD).....	99
3.6.5. Inmunolectroforesis (IEF).....	99
3.7. Inmunolectroforesis cruzada (IEC).....	100

3.7.1. Electroinmunodifusión (EID).....	100
3.7.2. Inmunolectroforesis cruzada.....	103
3.8. Preparación de geles y muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).....	104
3.8.1. Soluciones.....	104
3.8.2. Montaje del aparato y preparación de geles..	107
3.8.3. Preparación de muestras.....	110
3.8.4. Corrida.....	111
3.9. Tinción de geles de poliacrilamida.....	112
3.9.1. Con Azul de Coomasie.....	112
3.9.2. Con nitrato de plata.....	112
3.10. Preparación del conjugado peroxidasa-IgG de conejo anti-IgG de ovino.....	114
3.10.1. Preparación de anticuerpos.....	115
3.10.2. Determinación de la actividad de peroxidasa	116
3.10.3. Preparación del conjugado con peroxidasa...	118
3.10.4. Titulación del conjugado por la técnica de Dot-ELISA.....	119
3.11. Inmunolectrotransferencia.....	122
3.11.1. Materiales.....	122
3.11.2. Procedimiento para transferir proteínas al papel de nitrocelulosa.....	123
3.11.3. Detección inmunológica de las proteínas transferidas.....	126
3.11.4. Tinción para papel de nitrocelulosa.....	127

4. Resultados.....	129
4.1. Caracterización antigénica del AS y AM de <u>Fasciola hepatica</u> .....	130
4.2. Desarrollo de la respuesta inmune en ovinos hacia el AS y AM de <u>Fasciola hepatica</u> , medida por diferentes pruebas serológicas.....	143
4.3. Reconocimiento de antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> por el ovino durante una infección experimental.....	150
5. Discusión. ....	168
5.1. Caracterización antigénica del AS y AM de <u>Fasciola hepatica</u> adulta.....	169
5.2. Desarrollo de la respuesta inmune hacia los antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> adulta.....	172
5.3. Reconocimiento de antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> adulta por el ovino, durante la infección experimental.....	174
6. Literatura citada.....	184
7. Resumen.....	201

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Pruebas diagnósticas en la fasciolosis.....	76
Figura 1. Esquema morfológico de <u>Fasciola hepatica</u> adulta.....	16
Figura 2. Ciclo vital de <u>Fasciola hepatica</u> .....	17
Figura 3. Modificaciones de las estructuras celulares y de algunos antígenos del tegumento de la <u>Fasciola hepatica</u> durante su desarrollo en el huésped.....	21
Figura 4. Formación del emparedado para la transferencia a nitrocelulosa.....	125
Figura 5. Inmunolectroforesis de los antígenos somático (AS) y metabólico (AM) de <u>Fasciola hepatica</u> .....	131
Figura 6. Electroinmunodifusión de Laurell.....	132
Figura 7. Inmunolectroforesis cruzada del AS y AM de <u>Fasciola hepatica</u> con antisueros ovinos.....	134
Figura 8. Inmunolectroforesis cruzada con los antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> y antisueros de ovinos (Esquema).....	135
Figura 9. Curva estándar para determinación de peso molecular del AS por electroforesis en gel de poliacrilamida.....	136
Figura 10. Curva estándar para determinación de peso molecular del AM por electroforesis en gel de poliacrilamida.....	137
Figura 11. Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida obtenidos con los antígenos (AS y AM) de <u>Fas-</u>	



<u>ciola hepatica</u> .....	138
Figura 12. Espectro antigénico del AS determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida.....	140
Figura 13. Espectro antigénico del AM determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida.....	141
Figura 14. Bandas reconocidas por ovinos hiperinmunes anti-AS y anti-AM en la prueba de inmunoelectrotransferencia.....	142
Figura 15. Variación de los porcentajes de ovinos positivos a <u>Fasciola hepatica</u> con el tiempo de infección por distintas pruebas de diagnóstico con el antígeno somático (AS).....	144
Figura 16. Variación de los porcentajes de ovinos positivos a <u>Fasciola hepatica</u> con el tiempo de infección por distintas pruebas de diagnóstico usando el antígeno metabólico (AM).....	146
Figura 17. Variación de los títulos de anticuerpos en la prueba de hemoaglutinación pasiva en ovinos infectados experimentalmente con <u>Fasciola hepatica</u> utilizando antígeno somático (AS) y metabólico (AM).....	148
Figura 18. Variación de los títulos de anticuerpos en la prueba de inmunoensayo en capa delgada en ovinos infectados experimentalmente con <u>Fasciola hepatica</u> utilizando antígeno somático (AS) y metabólico (AM)...	149
Figura 19. Promedio del número de líneas de precipitación observadas por inmunoelectroforesis en suero de ovinos infectados experimentalmente con <u>Fasciola hepatica</u> .....	151

Figura 20. Aparición de líneas de precipitación hacia el AS o AM durante una infección experimental por <u>Fasciola hepatica</u> (animal 51).....	152
Figura 21. Aparición de líneas de precipitación hacia el AS o AM durante la infección experimental por <u>F. hepatica</u> en ovinos (animal 32).....	153
Figura 22. Dinámica de reconocimiento de antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> en ovinos por inmunoelectrotransferencia. 1 Total de bandas.....	154
Figura 23. Dinámica de reconocimiento de antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> en ovinos por inmunoelectrotransferencia. 2. Bandas con peso molecular de 90 000 d.....	156
Figura 24. Dinámica de reconocimiento de antígenos de <u>Fasciola hepatica</u> en ovinos por inmunoelectrotransferencia. 3. Bandas con peso molecular entre 46 y 90 Kd.....	157
Figura 25. Dinámica de reconocimiento del AS de <u>Fasciola hepatica</u> en ovinos por inmunoelectrotransferencia. 4. Bandas con peso molecular entre 21 y 46.....	159
Figura 26. Dinámica de reconocimiento del AM de <u>Fasciola hepatica</u> en ovinos por inmunoelectrotransferencia. 5. Bandas con peso molecular entre 21 y 46 Kd...	160
Figura 27. Dinámica de reconocimiento del AS de <u>Fasciola hepatica</u> en ovinos por inmunoelectrotransferencia. 6. Bandas con peso molecular menor de 21 Kd.....	161

Figura 28. Dinámica del reconocimiento del AM de <u>Fasciola hepatica</u> en ovinos por inmunolectrotransferencia. 7. Bandas con peso molecular menor de 21 Kd.....	162
Figura 29. Resultados de la prueba de inmunolectrotransferencia con el antígeno somático (AS).....	164
Figura 30. Resultados de la prueba de inmunolectrotransferencia con el antígeno metabólico (AM).....	166

**Introducción**

Las enfermedades parasitarias afectan a millones de personas y de animales en el mundo, causando en el primer caso, la muerte y el debilitamiento de muchos individuos anualmente, o bien provocando grandes pérdidas económicas por la disminución en la producción de ganado de carne.

Todas las infecciones parasitarias inducen una respuesta inmune en el huésped, que depende en muchas ocasiones de la relación huésped-parásito, la cual es considerada como un vínculo dinámico pues cada una de las partes implicadas en ella es influida por las actividades de la otra. El parásito interfiere con la fisiología del huésped, produciendo la enfermedad. Por su parte el huésped utiliza los mecanismos de la respuesta inmune tanto humoral como celular, para combatir al parásito. El parásito tiene entonces que ser capaz de resistir estas reacciones defensivas del huésped para sobrevivir, por lo cual desarrolla constantemente mecanismos para relacionarse mejor con su huésped.

En los últimos años se ha despertado un gran interés por conocer la respuesta inmune en las enfermedades parasitarias y una de las áreas de mayor importancia consiste en el desarrollo de técnicas que permitan una buena

extracción de antígenos, su purificación y estandarización, para que puedan ser utilizados en pruebas serológicas que coadyuven el diagnóstico de las parasitosis o bien a la detección indirecta del parásito o de sus productos.

En el presente trabajo se pretende realizar una caracterización de los componentes antigénicos de dos antígenos provenientes de Fasciola hepatica adulta, un antígeno somático (AS) y un antígeno de excreciones y secreciones o metabólico (AM), que han sido utilizados en pruebas de diagnóstico. Por otro lado, se intenta identificar a los componentes antigénicos que son reconocidos por ovinos infectados experimentalmente, así como detectar como van apareciendo los componentes antigénicos en el curso de la infección experimental, por medio de la técnica de inmunoelectrotransferencia.

## 1. Generalidades

## 1.1. Generalidades acerca de Fasciola hepatica L., 1758

### 1.1.1. Notas históricas y geográficas.

La descripción de este parásito fue la primera que se hizo de un tremátodo por de Brie, en 1379. Gabucinus lo identificó en el hígado de borregos y cabras en 1547. Pallas describió el primer caso en humanos en 1600 (Náquir-Vildoso y Marcial Rojas, 1971). Su ciclo vital completo fue también el primero que se dilucidó de un tremátodo di genético por Leuckart en 1882 y Thomas en 1883 (Faust et al., 1961).

Es de distribución cosmopolita y prevalece en los países criadores de ovejas, afecta también a bovinos, ca prinos, cerdos, equinos, conejos, venados, castor, elefan te y canguro y otros animales silvestres, así como al hom bre (Owen, 1977; Quiroz, 1984). En América se encuentra en los Estados Unidos, México, Costa Rica, Cuba, Puerto Rico, Colombia, Venezuela, Uruguay, Argentina, Chile y Perú. La infección en humanos se ha encontrado en diferen tes países y se han presentado epidemias en Francia, Ingla terra, Alemania y Cuba (Náquira Vildoso y Marcial Rojas, 1971).



### 1.1.2. Morfología

El parásito adulto mide de 18 a 30 mm. de longitud, por 4 a 14 mm. de ancho. El cuerpo es aplanado, dorsoventralmente en forma foliácea. En el extremo anterior hay una proyección cónica claramente visible, el extremo posterior es redondeado (Faust et al., 1961). Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas, posee una ventosa oral en el extremo superior y una ventral a la altura de lo que podrían llamarse hombros (Fig. 1). El tubo digestivo se bifurca a poca distancia de la ventosa oral, formando ramas primarias y secundarias que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo. Es hermafrodita. Debajo de la ventosa oral se abre el poro genital. Los huevecillos miden de 130 a 150 por 63 a 90 micras, son operculados con cáscara teñida por pigmentos biliares de tonos amarillos (Quiroz, 1984).

### 1.1.3. Ciclo Vital

En el huevecillo de los tremátodos se desarrolla una larva, el miracidio, que puede vivir únicamente en el agua. En la mayoría de los casos el miracidio sale del huevo cuando éste llega al agua, abriendo el opérculo presente en la cáscara (Majovko y Makarov, 1981). El miracidio

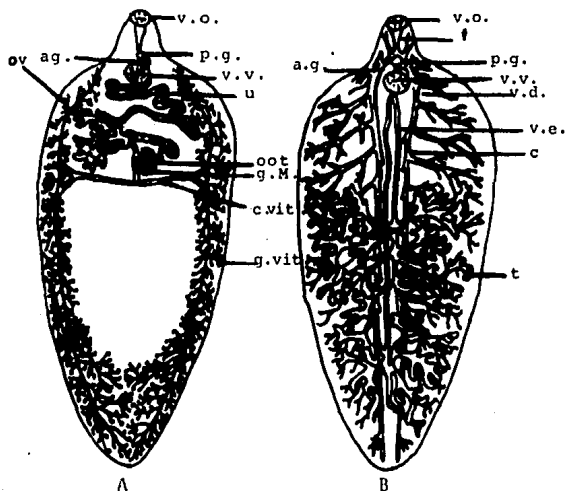
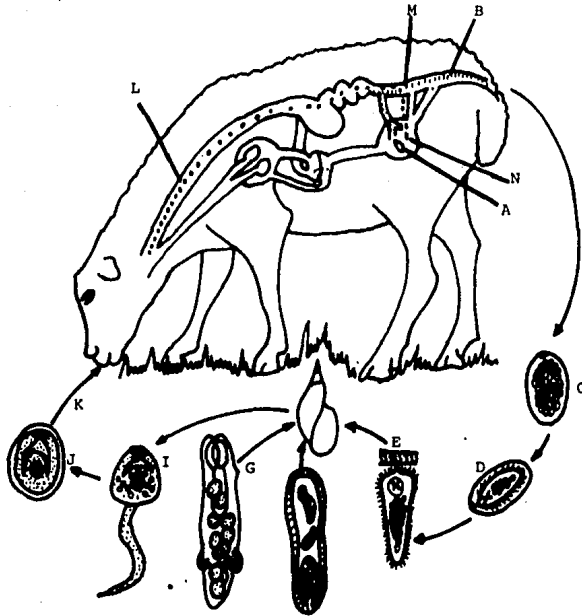


Figura 1. Esquema morfológico de Fasciola hepatica adulta. A. Organos reproductores femeninos, vista ventral; B. órganos reproductores masculinos y aparato digestivo, vista ventral.

c., ciegos; a. g., atrio genital; g.M., glándula de Mehlis; oot., ootipo; v.o., ventosa oral; ov., ovario; f., faringe, t., testículos, u., útero; g.vit., glándula vitelina; c.vit., conducto vitelino.

Tomado de Brown, 1977.

Figura 2

Ciclo vital de Fasciola hepatica

A: F. hepatica adulta en conducto biliar; B: Huevecillo en heces; C: Huevecillo en medio hídrico; D: Huevecillo embriornado; E: Miracidio; F: Esporoquiste; G: Redia; H: Caracol huésped intermediario; I: Cercaria; J: Metacercaria; K: Infección por vía oral; L: Metacercaria en tracto digestivo; M: Forma juvenil recién desenquistada; N: Forma juvenil migrante.

tiene una vida corta (6 horas a 25°C) y busca activamente a su huésped en un breve período de tiempo (Smith y Grenfell, 1984). A veces, únicamente sale después de que el huésped intermediario, que es un molusco, ingiere el huésped vecillo. En México se ha informado que los huéspedes intermediarios son caracoles del género Lymnaea, de las especies L. bulimoides, L. cubensis y L. humilis (Gómez Agu delo et al., 1978; Landeros et al., 1981).

La larva o miracidio, esta cubierta de cilios y en sus cavidades se encuentran masas germinativas. En el cuerpo del caracol, se desprende de la envoltura ciliada y se transforma en esporoquiste que crece, y de las masas germinativas que lo llenan surgen las redias y a partir de ellas se desarrolla una segunda generación de redias, que dan lugar a las cercarias. Estas se asemejan al trematodo adulto, pero poseen desarrollo incompleto del aparato sexual y presentan cola. Las cercarias abandonan a las redias a través de su abertura tocológica y al caracol por su aparato respiratorio (Majovko y Makarov, 1981) (Fig. 2). Las cercarias nadan libremente en el agua, después se enquistan y se adhieren a las plantas que posteriormente ingiere el huésped definitivo.

En el intestino de los grandes mamíferos se disuelve la

membrana quística externa y queda libre el tremátodo joven (forma juvenil recién desenquistada), que penetra activamente a través de la pared duodenal, migra por la cavidad peritoneal (este proceso se efectúa en el transcurso de 2 a 28 horas) y posteriormente penetra al parénquima hepático, por el que vaga de 6 a 8 semanas, para finalmente asentarse en los conductos biliares. Aquí madura y pone huevecillos que salen con las heces a la tierra y el agua donde recomienza el ciclo (Quiroz, 1984).

#### 1.1.4. Desarrollo de Fasciola hepatica en el huésped definitivo.

Durante la migración en el huésped definitivo el tremátodo experimenta cambios morfológicos y fisiológicos. Entre los cambios más importantes en la relación huésped-parásito, están las alteraciones en el glucocálix o tegumento externo, que es sintetizado por las células tegumentales. El tegumento de la forma juvenil recién desenquistada, está provisto de espinas afiladas simples, pero más tarde durante la migración, estas espinas se hacen aplanadas y multipuntiagudas (Køie et al., 1977). El tegumento está compuesto por una superficie sincitial anucleada, unida tanto apical como basalmente, por medio de túbulos a células tegumentales subyacentes (Bennett y Threadgold, 1973; Hanna 1980 a).

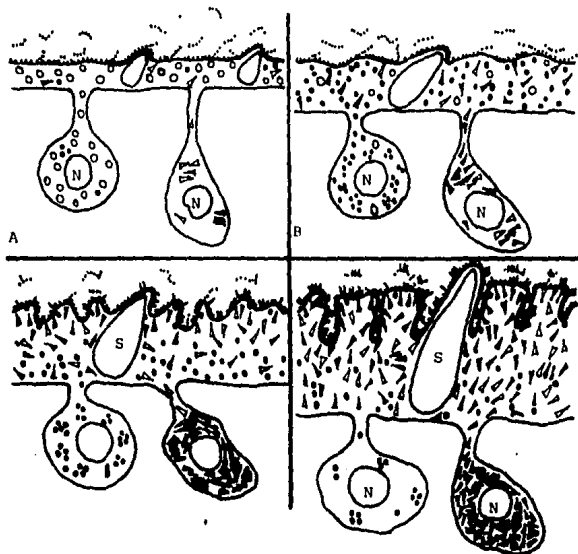
Aparentemente las formas juveniles recién desenquistadas tienen un solo tipo de células tegumentales (Bennett y Threadgold, 1973, 1975; Hanna, 1980 b), que se denominan células T0. Estas células secretan un gránulo llamado gránulo T0, que es sintetizado en el sistema retículo endoplásmico rugoso-Golgi, de características morfológicas distintas a las células tipo 1 de los parásitos inmaduros y tipo 2 de las formas maduras (Fig. 3).

Durante la migración al hígado, las células T0 se transforman en células tipo 1, que comienzan a secretar gránulos T1. La cicloheximida inhibe la producción de los cuerpos secretorios T1 por el complejo Golgi de las células tegumentales (Hanna y Threadgold, 1976), pero no tiene efecto en el transporte y descarga intracelular de los cuerpos secretorios. Los inhibidores metabólicos como el dinitrofenol (DNP) y yodoacetato bloquean los tres procesos, lo que indica que todos son dependientes de la energía.

Las células tipo 2 del adulto provienen de células embrionarias diferentes, presentes en el parénquima desde el segundo o tercer día postinfección, pero liberan sus gránulos T2 hacia la superficie, hasta que el gusano penetra al conducto biliar (Bennett y Threadgold, 1975). Los

Figura 3

Modificaciones de las estructuras celulares y de algunos antígenos del tegumento de la Fasciola hepatica durante su desarrollo en el huésped.



○ Cuerpos  $T_0$

▬ Antígeno de superficie  $T_{0/1}$

▬ Antígeno de superficie  $T_2$

● Cuerpos  $T_1$

▬ Cuerpos  $T_2$

N: Núcleo de la célula tegumental

S: Espina

A: Parásito de 1 semana entrando al parénquima hepático.

B: Parásito de 3 semanas migrando en el parénquima hepático.

C: Parásito de 5 semanas entrando a los conductos biliares.

D: Parásito de 12 semanas, establecido en los conductos biliares.

gránulos T0 y T1 son antigénicamente similares entre sí, pero son diferentes a los gránulos T2 del adulto (Hanna, 1979; 1980 b).

Junto con el cambio en la composición del glucocálix externo, se presenta también durante la migración del gusano, una variación en el tiempo de recambio de la membrana. Las células tegumentales producen un nuevo glucocálix encima del primero, quedando éste oculto. Se ha postulado que la rápida desaparición del glucocálix que se advierte en las formas inmaduras, representa un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped (Bennett, 1978; Bennett et al., 1980; Hanna, 1979, 1980 a,b). El ocultamiento se acelera en presencia de anticuerpos específicos, (Hanna, 1980 a).

Una vez alcanzada la madurez, la transición en la composición del glucocálix de gránulos T1 a T2, se sigue por una disminución en la velocidad de recambio de membrana. Este hecho se atribuye a que los conductos biliares ofrecen un ambiente inmunológicamente seguro al gusano adulto (Hanna, 1979 a,b,c).

Toledo Roa (1985), purificó y caracterizó químicamente el glucocálix de F. hepatica. Entre los carbohidratos analizados se encontraron abundantemente ácidos urónicos y ácido siálico, así como hexosaminas, glucosa y fucosa.



La composición de carbohidratos del glucocálix fue diferente al del parásito completo. Rogan y Threadgold (1984) observaron al incubar gusanos adultos en presencia de conavalina A, alteraciones en la morfología tegumental; aparentemente esta lectina se une al tegumento por medio de residuos de manosa; glucosamina o glucosa. Los mismos efectos, aunque menos acentuados, se produjeron con la aglutinina del germen de trigo. Alteraciones del tegumento muy similares ocurren al unirse los anticuerpos.

El sistema digestivo del gusano, se desarrolla considerablemente durante la migración y la maduración. Las células del tracto intestinal de las formas juveniles recién desenquistadas poseen originalmente una función secretora y son morfológicamente distintas de las del adulto (Bennett y Threadgold, 1973; Bennett, 1975; Hanna, 1975). Las secreciones de las formas juveniles se cree que son, en su mayoría hidrolíticas y se emplean tanto para desenquistar el gusano, como durante el desplazamiento del parásito dentro del huésped. En el adulto, los microvellos son de forma regular y muy grandes, a diferencia de los escasos, pequeños e irregulares de las formas juveniles.

Cuando el gusano migrante penetra a la cápsula hepática, las células intestinales adquieren la morfología del

adulto y asumen su papel en la absorción y secreción (Bennett, 1975). Los jóvenes poseen un sistema excretorio adulto desde las 12 horas postinfección (Bennett, 1977). En el adulto se encuentran muchas micelas lipídicas; estas micelas son escasas y son el único producto de excreción en la forma juvenil (Bennett y Threadgold, 1973).

El sistema reproductor sufre también cambios en el proceso de maduración (Dawes, 1962, citado por Reddington, 1984). Al infectar ratones, a partir del primer día postinfección (p.i.), en el parásito comienzan a desarrollar se los testículos. Los ovarios comienzan a adquirir forma al octavo día p.i. y se van ramificando, hasta que se llenan de folículos vitelinos no completamente maduros, al día 28. Al día 37 p.i., se ven huevecillos en el útero del tremátodo y comienzan a aparecer huevecillos en las heces del ratón.

#### 1.1.5. Signos clínicos, patología y patogenia.

Los signos clínicos son variables y dependen de varios factores. Se puede considerar por una parte, la especie animal, por ejemplo, los ovinos parecen mostrar una sintomatología más marcada que los bovinos y éstos más que equinos o cerdos.

Se presentan tres diferentes síndromes clínicos de la fascioliasis en ovinos: el agudo, el subagudo y el crónico (Boray 1976; Van Tiggele, 1978).

En las infecciones agudas se puede presentar muerte súbita o somnolencia y debilidad, disnea, ascitis, dolor abdominal, palidez de mucosas, anemia normocítica y normocrómica, hipoalbuminemia, no hay reticulocitosis, ni huevecillos en las heces y se presenta un hígado agrandado y hemorrágico con 800-2500 gusanos, de los que más del 60% están en el estadio inmaduro. La duración de la enfermedad es de 1-2 días.

La infección subaguda se caracteriza por pérdida de peso, edema submandibular, ascitis, palidez de mucosas, anemia hipocrómica macrocítica, hipoalbuminemia, reticulocitosis, salida de huevos en las heces y un hígado agrandado y hemorrágico con 500-1500 gusanos, de los cuales aproximadamente la mitad se encuentran en el estadio adulto. Su duración es de 1-2 semanas.

En la infección crónica, se presenta pérdida progresiva de peso, edema submandibular y ascitis, anemia hipocrómica macrocítica, hipoalbuminemia, reticulocitosis, salida de huevecillos en las heces y un hígado cirrótico, con los conductos biliares alargados y engrosados. Su duración es de al menos varias semanas.

En bovinos se encuentran signos clínicos similares, pero la forma subaguda y crónica son las que tienen importancia (Armour 1975).

En lo que se refiere a la histopatología, Murray y Rushton (1975) y Dargie et al. (1974), describen varios tipos de fibrosis hepática: fibrosis postnecrótica, necrosis y fibrosis isquémica, fibrosis peribiliar y fibrosis monolobular o perilobular, además de colangitis hiperplástica. Los dos primeros tipos de fibrosis, parecen ser el efecto de la migración de las formas juveniles por el parénquima hepático. La fibrosis peribiliar se asocia a la presencia de parásitos en los conductos biliares. Respecto a la fibrosis monolobular, su etiología no es clara. Murray y Rushton (1975) indican que este tipo de fibrosis es el resultado de flebitis de la vena porta y la presencia de linfoblastos, seguida por células eosinofílicas, sugieren la presencia de un mecanismo inmune. La colangitis hiperplástica se asocia a la presencia de parásitos en los conductos biliares. A la mucosa biliar llegan cada vez más células plasmáticas, linfocitos, macrófagos, eosinófilos y células cebadas que se desgranulan, liberando histamina, debido a la influencia de algún mecanismo inmune de hipersensibilidad.

La presencia de complejos inmunes circulantes ha sido detectada en los sueros de humanos y ovinos parasitados con F. hepatica. En humanos, Sampaio-Silva et al. (1981) con la prueba de  $^{125}\text{I-C1q}$ , encontraron en pacientes que eliminaban huevecillos del parásito en las heces, o en aquellos que manifestaban la fase aguda de la enfermedad, la presencia de complejos inmunes circulantes en el 70% de los casos. En ovinos, (Arriaga et al., 1984) se observó que los animales infectados con F. hepatica, mostraron mayor cantidad de protefna precipitada que los animales testigo, al precipitar los sueros con polietilenglicol 6000 (PEG 6000) a concentraciones del 4, 6, 8, y 10%. Para corroborar la presencia de complejos inmunes circulantes se precipitaron los sueros con PEG al 2.5% y se determinó el consumo de complemento de los precipitados, obteniéndose valores promedio de 57% en los ovinos con fasciolosis y de 29% en los testigos.

Algunos otros efectos de esta enfermedad son la elevación de los niveles de globulinas séricas y de enzimas hepáticas como la gamma-glutamyl-transpeptidasa, la transaminasa-glutámica oxaloacéticas y la aspartato aminotransferasa (Furmaga et al., Düwell et al., 1972; Kadhim, 1976; Van Tiggele, 1978).

Existen controversias acerca del origen de la anemia en la fasciolosis. Algunos la atribuyen a la hematofagia por el parásito y otros opinan que la anemia es causada por una sustancia liberada por el parásito (Sprengler e Isseroff, 1981), que pudiera ser la prolina. Por otra parte, tanto la prolina como F. hepatica produjeron incrementos en el perímetro luminal y contenido de colágena del conducto biliar (Modavio Isseroff, 1984).

#### 1.1.6. Importancia económica y control.

La fasciolosis es económicamente importante en ovinos y bovinos. La forma crónica de la infección es la que provoca efectos insidiosos a largo plazo y deletéreos que ocasionan mayor daño económico. Las secuelas de la enfermedad crónica pueden incluir inapetencia, baja conversión alimenticia, pérdida de peso y disminución en la producción de leche y de lana (Sinclair, 1976; Roseby, 1970; Duwell et al., 1972; Black et al., 1972). La confiscación de hígados infectados durante la inspección de carne provoca también pérdidas económicas. Durante el año de 1980 las pérdidas ocasionadas por este parásito en la ganadería mexicana, ascendieron a 3 840.2 millones de pesos (Bull. Off. Int. Epiz., 1981).

Los métodos convencionales para el control de la fasciolosis, incluyen la erradicación del huésped interme

diario por molusquicidas y el uso de fasciolicidas para reducir la contaminación, así como el mejoramiento de los sistemas de drenaje para influir adversamente el habitat del caracol ( Armour, 1975).

## 1.2. Antígenos de Fasciola hepatica.

### 1.2.1. Antígenos parasitarios.

El estudio de los antígenos parasitarios tiene gran importancia, pues permite determinar cual o cuales antígenos son relevantes para el diagnóstico o aquéllos que pueden funcionar como inmunógenos para prevenir la enfermedad.

Como los parásitos se encuentran filogenéticamente alejados de sus huéspedes, muchas de sus macromoléculas son reconocidas como extrañas y por tanto son antigénicas para el huésped, de esta manera desencadenan las correspondientes respuestas inmunes en el animal infectado.

La naturaleza química de muchos antígenos parasitarios es muy variable, algunos de ellos son proteínas, otros son glucoproteínas y lipoproteínas, un gran número de ellos son polisacáridos, en algunas ocasiones se han identificado complejos de lípidos con proteínas, o bien con polisacáridos, o de ácido ribonucleico y proteínas. En ciertos casos se ha encontrado que el determinante antigénico correspondiente es un hapteno unido a proteínas del parásito, o aún a proteínas del hospedador (Kagan, 1969).



Los antígenos parasitarios pueden clasificarse en: antígenos somáticos (AS), denominados también estructurales o endoantígenos, que forman parte de las estructuras morfológicas del parásito. Al ser inoculados en animales experimentales como por ejemplo el conejo, los AS actúan como potentes antígenos y originan distintas poblaciones de anticuerpos en altas concentraciones; sin embargo es muy probable que tales antígenos no sean importantes en la protección en infecciones naturales. Estos AS están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son compartidos por diferentes especies y géneros. Estudios experimentales parecen indicar que la reactividad cruzada se asocia con los antígenos polisacáridos (Barriga, 1980).

Los antígenos que son el producto de la actividad fisiológica de los parásitos se han denominado antígenos metabólicos (AM), productos de excreción-secreción (E/S) o exoantígenos, muchos de ellos son enzimas. Los antígenos metabólicos son característicos de los organismos que los producen, y sus anticuerpos correspondientes tienen una especificidad exquisita que les permite distinguir entre diferentes cepas de la misma especie parasitaria y aún entre diferentes estadios de desarrollo del mismo parásito (Barriga, 1980).

Un tercer grupo de antígenos son los antígenos solu

bles o antígenos S (Wilson, 1978), los cuales son substancias antigénicas que se encuentran libres en los tejidos o flúidos del huésped, aunque no se sabe aún si corresponden a productos metabólicos, substancias somáticas liberadas por el parásito moribundo, o bien materiales del hospedador alterados por el parásito.

Además de las substancias características del parásito se encuentran materiales del hospedador en los extractos antigénicos del parásito, algunos adquiridos por el parásito dentro del huésped, otros pueden ser antígenos compartidos por el huésped y el parásito y otros más pueden ser sintetizados por el propio parásito (Barriga, 1980).

Por otra parte, se mencionan los antígenos del tegumento, la naturaleza tegumental de éstos se ha demonstrado por técnicas de inmunofluorescencia y de inmunoperoxidasa. Estos antígenos son aislados a partir de los parásitos utilizando detergentes como Nonidet P-40 o dodecil sulfato de sodio, en frío (Hillyer, 1980).

Otra clasificación se refiere a antígenos funcionales y no funcionales. Los antígenos funcionales o protectores son aquellos que inducen reacciones inmunológicas protectoras (Kagan, 1969).

### 1.2.2. Antígenos de Fasciola hepatica.

La estructura antigénica de los agentes patógenos se hace más compleja conforme se avanza en la escala filogenética. Así un virus tiene menos antígenos que una bacteria, ésta menos que un protozoario, que a su vez tiene menos antígenos que un metazoario (Bautista, 1980). Puesto que Fasciola hepatica es un metazoario, el número de antígenos que posee, es muy grande. Estos antígenos son diferentes entre sí, por lo que se puede decir que Fasciola hepatica es un mosaico antigénico con alto grado de complejidad. A continuación se presentará una revisión de los antígenos de los estadios sucesivos de este parásito.

### 1.2.3. Propiedades antigénicas de los estadios sucesivos de Fasciola hepatica.

#### 1.2.3.1. El huevo y el miracidio.

El huevo y el miracidio, el estadio del ciclo vital del parásito que infecta al huésped intermediario, comparten antígenos con los últimos estadios infectivos del gusano. Al utilizar inmunoglobulinas de ovinos infectados con F. hepatica marcadas con  $^{131}\text{I}$ , se demostró que se unían más fuertemente a los miracidios que las de animales no infec

tados (Movsesijan, 1968). Por estudios de inmunodifusión, Dodd (1969), encontró en parásitos adultos 7 antígenos diferentes, 3 de los cuales estaban presentes también en los miracidos y las cercarias. Movsesijan y Borojević (1970) observaron fluorescencia específica en el miracido, principalmente en su extremo posterior y dentro del cascarón de los huevecillos recién abiertos. En otros estudios de inmunofluorescencia se detectaron complejos específicos antígeno-anticuerpo sobre el cuerpo del miracido, que estaban localizados sobre los cilios (Borojević et al., 1973).

Reddington et al. (1982), aislaron y purificaron huevecillos del tremátodo a partir de la bilis de bovinos infectados. Con los huevecillos purificados, prepararon más tarde un antígeno sonificado, con el cual fue posible detectar la fasciolosis en bovinos y cabras desde las dos primeras semanas postinfección (Reddington et al., 1984).

#### 1.2.3.2. Propiedades antigénicas de las formas juveniles.

##### a) Formas juveniles recién desenquistadas.

Al incubar formas juveniles de Fasciola hepatica con el suero de un huésped sensibilizado, sin importar la capacidad del animal para desarrollar resistencia, se ha

observado un precipitado en la superficie del tremátodo. Utilizando suero de rata infectada, Howell et al. (1977) observaron la formación de un precipitado sobre el tegumento de la forma juvenil recién desenquistada del parásito, así como en el medio de cultivo; este precipitado aparentemente no provocó ningún daño al parásito. Sin embargo, al transferir intraperitonealmente estas formas juveniles a ratas no infectadas, los parásitos no pudieron desarrollarse. Este precipitado es un complejo antígeno metabólico-anticuerpo (Howell y Sandeman, 1979; Sandeman y Howell 1980, 1982; Duffus y Franks, 1981); la secreción continua del antígeno por el parásito y su precipitación con el anticuerpo conduce a la aparición del precipitado en el medio de cultivo. Los precipitados que se forman en la superficie de las formas juveniles son liberados al medio, debido al recambio del glucocálix (Duffus y Franks, 1981). Aparentemente las clases de inmunoglobulinas implicadas en esta reacción son IgM, IgG2, predominando IgG1 (Duffus y Franks, 1981). En ovinos sensibilizados se encontró que en infecciones tempranas, aparecía IgM en el precipitado, y posteriormente IgG1 como isotipo prevalente.

Con el fin de examinar el complejo antígeno-anticuerpo antes mencionado, Sandeman y Howell (1980) aplicaron la prueba de inmonodifusión con el suero de ovinos infecta

dos absorbido con formas juveniles y antígenos metabólicos (AM) juveniles, lograndose detectar una sola línea de precipitación lo que sugirió que en la formación del precipitado estaba involucrada una sola interacción antígeno-anticuerpo.

Un año más tarde se encontró que el suero de ovinos reconoce al menos dos antígenos juveniles; estos antígenos son compartidos por los últimos estadios del gusano (Sandeman y Howell, 1981). Reddington et al en 1984, encontraron que el suero bovino y el caprino reconocen al menos 13 antígenos de superficie en las formas juveniles de F. hepatica por medio de una técnica de marcado de superficie con lactoperoxidasa  $^{125}\text{I}$ . Al parecer, los bovinos que son animales capaces de desarrollar resistencia pueden reconocer diferentes antígenos superficiales durante el curso de la infección, a diferencia de las cabras que no desarrollan resistencia al desafío.

Las formas juveniles del parásito poseen antígenos específicos del estadio de desarrollo junto con otros que son compartidos con estadios de desarrollo posterior. Al estudiar los cambios en el curso de una infección experimental en ovinos y en ratas con F. hepatica, se observó que los anticuerpos fluoresceinados de infecciones tempranas (antes de 6 semanas), de ambas especies, reacc

cionaban fuertemente con el tegumento de las fasciolas jóvenes, en tanto que la fluorescencia era progresivamente más débil con el tegumento de parásitos viejos (Hanna 1979, 19780 b). Se sugirió que esto podía atribuirse a la disminución del número de cuerpos secretorios T1 en el tegumento. Como estos cuerpos contienen precursores del glucocálix, al haber menos ocurre un decremento en la velocidad de reposición del glucocálix una vez que los gusanos alcanzan los conductos biliares del huésped. Los cuerpos T1, sustituyen durante el desarrollo, a los cuerpos antigénicamente similares T0, característicos de los parásitos juveniles tempranos. Los cuerpos T2 del adulto aparecen en el tegumento hasta que el gusano penetra al conducto biliar. En forma alterna y como era de esperar, los antisueros de animales infectados por más de 6 semanas dieron fuertes reacciones con antígenos del adulto y reacciones progresivamente más débiles con los antígenos del gusano juvenil (Hanna 1979, 1980 b).

Sandeman y Howell (1981), empleando la difusión en gel con el sistema forma juvenil del parásito-suero de ovino infectado, lograron identificar dos antígenos. Estos mismos antígenos fueron detectados también al utilizar gusanos inmaduros y adultos. El gusano inmaduro produjo dos antígenos adicionales, en tanto que el gusano adulto produjo además de los antígenos del gusano inmaduro otros

dos antígenos. Utilizando también la técnica de inmuno difusión, Yoshihara et al. 1981, encontraron dos líneas de precipitación, con los extractos de metacercarias y antisuero antimetacercaria de conejos infectados. Una sola línea de precipitación se atribuyó a los antígenos metacercariales, mientras que la otra se encontró presente tanto con los extractos del gusano inmaduro, como del adulto. Se sugirió que una línea de precipitación correspondía a un antígeno distribuido sobre el ciego intestinal del tremátodo, mientras que el otro se localizaba en el quiste externo de la metacercaria.

En 1982, Bennett et al., mostraron la presencia de al menos dos antígenos juveniles específicos del tegumento después de inmunizar conejos con preparaciones antigénicas solubles de metacercarias. El antisuero resultante fue absorbido con gusanos adultos y utilizado para identificar los antígenos en los estadios de desarrollo temprano del gusano, por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Un antígeno tegumental estuvo presente en la superficie del gusano entero a los 4 días postinfección, mientras que el otro aparece después de 7 días postinfección y se observa en el tegumento de gusanos seccionados, lo que apoya la teoría de que se expresan antígenos diferentes sobre la superficie de las fasciolas a distintas edades.



b) Fasciola hepatica inmadura.

Al referirse a Fasciola hepática inmadura, se habla de aquellos gusanos que pueden ser recuperados del parénquima hepático y no de los conductos biliares, que representan el sitio final donde se aloja el parásito adulto (Reddington et al., 1984). Aparentemente los gusanos inmaduros comparten antígenos con otros estadios de desarrollo del tremátodo, como indican los trabajos de diferentes autores. Thorpe (1965), con el suero de ratas infectadas se percató del marcaje inmunofluorescente de gusanos maduros e inmaduros. Años después, Moore y Halton (1975) por estudios histoquímicos encontraron que tres enzimas, la carboxilesterasa, la acetilcolinesterasa y la fosfatasa alcalina, eran similares en gusanos maduros e inmaduros.

En un estudio de inmunofluorescencia indirecta (IFI) con un antisuero preparado en conejo contra un extracto soluble de gusanos adultos, el cual fue absorbido con antígenos tisulares de ratas y ratón, Bennett (1978), observó que el antisuero reaccionó con todos los estadios de desarrollo del gusano, excepto los estadios tempranos del gusano inmaduro. El antisuero reaccionó fuertemente con los gusanos migrantes, pero no pudo marcar el tegumento de formas juveniles recuperadas uno y dos días postinfección, ya fuera de la cavidad peritoneal o del parénqui

ma hepático. El antígeno así detectado, se comienza a expresar a los 5 días postinfección, coincidiendo su presencia con la aparición de gránulos secretorios T2 en el tegumento, por lo que posiblemente estos gránulos sean la fuente de este antígeno.

Por otra parte, la superficie tegumental de F. hepática inmadura fue dañada al incubar el parásito in vitro en presencia del suero de un ternero infectado experimentalmente (Eckblad et al., 1981). Al observar por microscopía de barrido, se pudo apreciar la degeneración de la superficie del tegumento a las 4 horas de incubación, hasta llegar a la destrucción completa del tegumento a las 16 horas cuando se utilizaron partículas de látex cubiertas con globulina como marcadores inmunológicos así mismo, se pudo determinar que hay anticuerpos dirigidos contra los antígenos superficiales de las fasciolas inmaduras y éstos son principalmente de las subclases IgG1 e IgG2.

c) Antígeno metabólico (AM) inmaduro.

Irving y Howell en 1982, recuperaron fasciola inmaduras del parénquima hepático de ratones y cultivaron los parásitos durante 5 a 7 días en medio carente de suero para determinar la incorporación de tres aminoácidos (leucina isoleucina y metionina) marcados, o bien en un medio con

leucina marcada y suero de ovino vacunado con AM de F. hepatica juvenil. Los tres aminoácidos marcados se incorporaron en las diferentes proteínas del tremátodo; los tres polipéptidos más abundantes detectados en el medio de cultivo, tenían pesos moleculares de 26,24 y 23 Kd y precipitaron al reaccionar con antisuero de conejo u ovino vacunado. La ( $^{14}\text{C}$ ) isoleucina, se incorporó principalmente a un polipéptido de peso molecular de 27 Kd. Al cultivar las fasciolas en presencia de suero de ovino vacunado, los AM formaron complejos inmunes que contenían además de los polipéptidos ya mencionados de alto peso molecular (60, 42 y 31 Kd.) Mediante la prueba de Ouchterlony se encontraron dos líneas de precipitación entre los AM marcados y el antisuero; se hizo la electroforesis de las dos líneas y se determinó que los polipéptidos de 23, 24 y 26 Kd estaban presentes en una de las líneas; en la otra, participaban los polipéptidos de mayor peso molecular así como el de 27 Kd. Esto significa que al menos 7 polipéptidos con pesos moleculares de 23 a 60 Kd participan en la formación de complejos precipitantes con anticuerpos antifasciola.

Un producto metabólico que podría ser importante para proteger al gusano de la respuesta inmune del huésped ha sido identificado por Chapman y Mitchell (1983); se

trata de una enzima o enzimas liberadas de gusanos inmaduros y adultos, que rompen las inmunoglobulinas del huésped. In vitro, la enzima tiene actividad parecida a la de la papaína o la catepsina B, sobre las inmunoglobulinas de ratón, rata, conejo y ovino. Esta enzima es una tiol proteasa, que tiene un pH óptimo de 3.5-4.5, pero es activa también a pH 7.0.

#### 1.2.3.3. Fasciola hepatica adulta.

##### a). Antígeno somático (AS).

La forma adulta del trematodo ha permitido realizar un gran número de estudios sobre este estadio de desarrollo, debido a la facilidad con que puede recuperarse de los animales infectados y a su gran biomasa como fuente de antígenos, ya sea como extractos del parásito completo, o bien de fracciones derivadas de estos extractos.

El análisis electroforético del extracto antigénico salino de F. hepatica, reveló la presencia de 7 fracciones proteínicas, 2 fracciones glucoproteínicas y 6 fracciones lipoproteínicas (Biguet et al., 1962) en tanto que la inmunoelectroforesis realizada con suero de conejo hiperimmunizado detectó 15 fracciones antigénicas. Capron et al (1964), con un

antígeno somático crudo, encuentran por inmunolectroforesis de 4 a 8 arcos de precipitación con el suero de humanos afectados por F. hepatica. Estos autores informan que el arco 2 de la inmunolectroforesis que se presenta con sueros humanos y también con sueros de conejos infectados, no participa en las reacciones cruzadas y aparece en el suero de animales infectados experimental y naturalmente.

Geyer (1967), encontró por electroforesis 30 componentes, de los cuales diferenció 14 componentes proteínicos, 10 lipoproteínas y 6 glucoproteínas junto con azúcares y lípidos libres. Por inmunolectroforesis notó que 23 de ellas tenían actividad antigénica. Gundlach (1971), con un AS deslipidizado observó la presencia de 21 bandas por inmunolectroforesis. Este antígeno funcionó muy eficientemente en las pruebas de fijación del complemento, hemoaglutinación pasiva, precipitación en anillo, difusión doble e inmunolectroforesis.

La electroforesis en disco en geles de poliacrilamida detectó 14 bandas en el antígeno somático obtenido por Movsesijan y Borojević (1973), quienes analizaron el AS de F. hepatica adulta, así como antígeno metabólico y bilis de ovino.

Dos líneas de precipitación obtenidas por medio de la prueba de difusión en gel de agar, y que representaban dos sustancias antigénicas en el AS del tremátodo, fueron aisladas individualmente a partir de 10 placas de agar y se inyectaron en conejos para producir antisuero monoespecífico contra estos antígenos (Yoshihara et al., 1979). La técnica de inmunofluorescencia indirecta con estos antisuecos y la fasciola adulta, permitió demostrar que una de las sustancias antigénicas estaba distribuida principalmente en el músculo subcuticular y células subcuticulares y la otra se localizaba en los conductos excretores del parásito.

Yoshihara et al (1981) al utilizar la prueba de difusión en gel de agar con un antisuero contra extractos de fasciolas adultas, lograron determinar la existencia de antígenos comunes (antígeno a) entre los extractos del gusano adulto, formas juveniles e inmaduras (14 y 35 días de edad) y metacercarias.

b) . Fraccionamiento del AS adulto.

En 1954, Urquhart et al., prepararon a partir del parásito adulto una fracción proteínica obtenida por precipitación con sulfato de amonio, que fue utilizado en pruebas de precipitación para el diagnóstico de la fasciolosis.

Diez años más tarde, Maekawa y Kushibe (1964), encontraron una substancia alergénica obtenida a partir de fasciolas adultas, que estaba compuesta de ácido ribonucleico y un péptido; esta substancia al ser dinitrofenolizada no perdía su actividad biológica.

Korach y Bénex (1966 a) extrajeron una lipoproteína de los gusanos adultos en buffer de boratos, la precipitaron con sulfato de dextrán y finalmente purificaron la molécula por ultracentrifugación. Las preparaciones purificadas estaban compuestas de aproximadamente 47% de lípido, 51% de proteína y pequeñas cantidades de carbohidrato y hierro. Al reaccionar la lipoproteína purificada con un antisuero de conejo, solamente se observó una línea de precipitación. Tanto el suero de conejo antilipoproteína, como el suero de ovinos y humanos infectados eran capaces de fijar el complemento ya fuera en presencia de la molécula de lipoproteína completa o únicamente con la porción lipídica en el medio. Los mismos autores (Korach y Bénex 1966 b), hicieron experimentos de protección con la porción lipídica purificada, pero no se indujo protección, indicando un posible carácter hapténico.

Tailliez et al., 1967, aislaron un antígeno específico de Fasciola hepatica a partir de un extracto crudo

del parásito. Este AS fue fraccionado en columnas de intercambio iónico y de filtración molecular en geles de destrán (Sephadex G-75). Se obtuvieron tres fracciones, la última de ellas (FH III) contenía el antígeno específico y daba 3 bandas por inmunolectroforesis (IEF). Una solución de la fracción FH III en amortiguador de borato pH 8.6, se precipitó con sulfato de potasio y se obtuvo la subfracción II que precipita a media saturación con fosfato, ésta fue la que se caracterizó como antígeno específico.

En México, Abascal Torres (1970), fraccionó un extracto crudo de F. hepatica por medio de una columna de Sephadex G200 y obtuvo 3 fracciones. La fracción II daba bandas de precipitación similares a las del antígeno total al reaccionar con suero de conejo.

Gundlach (1971) obtuvo un total de 41 preparaciones antigénicas de F. hepatica que incluían además de extractos del adulto entero, antígenos metabólicos, fracciones proteínicas obtenidas por precipitación con ácido acético, con ácido tricloroacético o con sulfato de amonio, fracciones polisacáridas y polisacáridos altamente purificados. La actividad serológica de las preparaciones fue probada con suero de conejos inmunes mediante las técnicas de fijación de complemento, hemoaglutinación pasiva, precipitación en anillo, difusión doble e inmunolectroforesis. De las fracciones obtenidas la que presentó mayor



actividad serológica fue el polisacárido ácido o fracción C.

Mediante fraccionamiento por Sephadex G-100, Movsesijan Borajević (1973), analizaron un extracto del trematódo adulto y obtuvieron 3 picos, de los cuales sólo en el segundo y el tercero se encontraron componentes antigénicos que eran reconocidos por el suero de conejos infectados e inmunizados.

Hillyer (1975) utilizó inicialmente un extracto crudo de gusanos adultos para detectar la presencia de fasciolosis por contraelectroforesis (CIE) en ratones. Esta preparación cruda reaccionaba en forma cruzada con el suero de humanos que padecían otras infecciones parasitarias. Para eliminar la reactividad cruzada, el extracto fue fraccionado usando una columna de filtración en gel (Sephadex G-200) (Hillyer y Capron, 1976). Por este método se obtuvieron 4 picos de proteína. Los antígenos encontrados en la cresta y porción descendente del segundo pico de proteína y en el tercer pico de proteína reaccionaron fuertemente con el suero de ratas infectadas con F. hepatica, pero no reaccionaban en forma cruzada con el suero de ratas infectadas con S. mansoni, o con el suero normal. Resultados similares fueron informados por

Hillyer y Santiago de Weil (1977) con el AS de origen bovino al filtrarlo por Sphadex G-200.

En su tesis doctoral, Van Tiggele (1978) comparó varios métodos de fraccionamiento del antígeno del gusano adulto: a) por medio del fraccionamiento según Kwapinski (Gundlach, 1971), observó que el polisacárido ácido C era útil en pruebas de diagnóstico, pero inestable a temperaturas de 4° - 20°C b) la precipitación con ácido tricloroacético desnaturizó el antígeno; c) la precipitación con sulfato de amonio dió resultados similares a la filtración en gel, pero no era reproducible; d) la cromatografía de intercambio iónico no permitió la separación de los antígenos presentes en el extracto por poseer cargas eléctricas similares y por último e) filtración en gel utilizando Sephadex G-100 separó el antígeno en 4 picos; el pico I y el pico III se usaron posteriormente en inmunoelectroforesis y doble difusión, sin embargo, el pico III no funcionó en hemoaglutinación pasiva, fijación de complemento ni ELISA.

Con el fin de obtener grandes cantidades de antígenos específicos de E. hepatica, Hillyer y Cervoni (1978), obtuvieron el pico III de la cromatografía por filtración en gel de Sephadex G-200 y lo corrieron por inmunoelectroforesis cruzada de Laurell; obteniendo los complem

jos antígeno anticuerpo específicos que utilizaron para inmunizar conejos; posteriormente obtuvieron la fracción IgG del antisuero y prepararon una columna de afinidad para aislar el antígeno específico a partir de una preparación cruda del parásito adulto.

Choi y Lee (1979) fraccionaron extractos crudos del tremátodo por medio de Sephadex G-200, y encontraron solamente 3 picos basados en su contenido de proteína. Cuando los antígenos fraccionados (picos I,II,III) se corrieron en inmunoelectroforesis contra suero de conejo anti fasciola, se detectaron respectivamente 2, 3 y 5 bandas.

El aislamiento de antígenos adultos ha sido efectuado por solubilización del tegumento con detergentes. Hillier y Rodríguez Ramos (1980), probaron el efecto de tres detergentes: dodecilsulfato de sodio (SDS) desoxicolato de sodio (DOC) y triton X-100, así como de un buffer ácido de glicina-HCl sobre la reactividad de un extracto de F. hepatica adulta de bovino. El amortiguador ácido destruyó buena parte de la reactividad inmunológica del antígeno. El DOC disminuyó las interacciones antígeno-anticuerpo, mientras que el SDS a bajas concentraciones incrementó la reactividad del antígeno.

En otro estudio, al utilizar el detergente Nonidet P-40 en frío, se lograron aislar antígenos del tegumento (Hillyer, 1980), cuya naturaleza tegumentaria fue evidenciada por la técnica inmunocitoquímica de peroxidasa-antiperoxidasa a nivel de microscopio de luz. Los antígenos liberados fueron empleados en la técnica de Ouchterlony para el inmunodiagnóstico de la fasciolosis. En el tegumento de F. hepatica, se encontró un antígeno específico del género Fasciola que corresponde a la fracción II reportada por Tailliez et al. (1967).

Estudios similares fueron realizados por Demare y Hillyer (1982), quienes incubaron parásitos adultos con Nonidet P-40 y los examinaron por medio del microscopio electrónico de transmisión. El detergente destruyó la membrana tegumental limitante, permitiendo la liberación de componentes superficiales. La técnica de peroxidasa-antiperoxidasa se aplicó para localizar los antígenos en los gusanos intactos. Estos se encontraron en la porción del glucocálix del tegumento de F. hepatica adulta.

En fracciones antigénicas de F. hepatica y S. mansoni, colectadas de la superficie de gusanos después de la incubación con detergente no iónico, se encontró que contenían antígeno parenquimal, lo que sugería la salida de componentes internos al sobrenadante durante la preparación (Hanna y Hillyer, 1984).

Por medio de la cromatografía en Sephadex G-200 de un extracto soluble del parásito adulto, se obtuvieron 7 fracciones que fueron denominadas  $F_1$  -  $F_7$ . La fracción más antigénica correspondió a  $F_1$ , que fue la primera en salir de la columna. Las respuestas de anticuerpos medidas por la técnica de ELISA a estas fracciones, mostraron diferentes cursos en el tiempo (Oldham, 1983 a).

En Egipto, en donde la esquistosomiasis es endémica y existe la fasciolosis humana ocasionada tanto por Fasciola hepática como por F. gigantea, surgió la necesidad de encontrar un antígeno de Fasciola que permitiera detectar ambas especies, y evitar las reacciones cruzadas con S. mansoni y E. histolytica. Mansour et al. (1983), prepararon un extracto crudo de F. gigantea que fué fraccionado por Sephadex G-200 y obtuvieron 4 picos de proteína. Los antígenos de la cresta y porción descendente del pico II, así como todo el pico III se juntaron y se utilizaron en pruebas de contrainmunolectroforesis (CIE). Fue posible detectar sueros de humanos fasciolosos por medio de esta técnica y se logró evitar reacciones cruzadas con los parásitos antes mencionados. El antígeno reaccionó con el suero sin diluir de aquellos individuos que excretaban huevecillos de F. gigantea y con algunos sueros de pacientes que excretaban huevecillos de F. hepática, la mayor parte de estos últimos dieron reacción positiva luego

de concentrarlos 5 veces. Aparentemente los antígenos parcialmente purificados de F. gigantea contienen antígenos comunes a ambas fasciolas; sin embargo, dada la diferente respuesta de anticuerpos sería conveniente utilizar este antígeno para el diagnóstico de la infección homóloga.

Utilizando también la filtración en Sephadex G-200, Pfister et al. (1984) fraccionaron un extracto crudo de F. hepatica adulta. Obtuvieron varias fracciones y la tercera y cuarta, denominadas Fhs1 y Fhs2 fueron comparadas con el antígeno obtenido según el método de Tailliez et al. (1967), utilizando la prueba de ELISA. El Fhs1, fue el que detectó la infección después de 19 a 26 días postinfección y permitió diferenciar claramente entre conejos infectados y testigos.

c) Antígenos metabólicos (AM).

Durante el curso de la infección por Fasciola hepatica se liberan productos metabólicos del parásito adulto, los cuales han sido objeto de varios estudios. Gundlach (1971), observó que el AM de la fasciola reaccionó en distintas pruebas de diagnóstico con títulos comparables a los del AS, excepto en hemoaglutinación pasiva, donde los títulos fueron más bajos. El análisis de la composición antigénica del AM, denotó que comparte componentes antigé

nicos con el AS. El AM tuvo alta actividad serológica so  
bre todo con el suero de animales infectados experimental  
mente.

Cuperlovic y Movsesijan (1972), al utilizar una téc  
nica de anticuerpos fluorescentes, encontraron que el con  
tenido cecal del parásito presentaba una fuerte fluores  
cencia específica durante el curso de la infección. Tam  
bién resultaron fluorescentes las células epiteliales cer  
canas a la superficie del útero. conductos excretores y  
las células espermatogénicas. Movsesijan y Borojević  
(1973), analizaron AS del tremátodo así como AM obtenido  
del contenido cecal del parásito y de bilis de ovinos in  
fectados. Al fraccionar por Sephadex G-100 se obtuvieron  
con el AM dializado y con el antígeno de bilis, 2 picos de  
proteínas, ambos con actividad antigénica. Por medio de  
la electroforesis en disco en gel de poliacrilamida se de  
tectaron 10 bandas en el antígeno de bilis y 13 bandas  
en el AM.

La inmunolectroforesis del AM del parásito adulto re  
veló que éste poseía un espectro antigénico parecido al  
del AS, en tanto que el AM del parásito juvenil era menos  
complejo (Van Tiggele, 1978).

F. hepatica produce sustancias que son tóxicas para los linfocitos del huésped y que por tanto, lo permiten protegerse de las defensas inmunes. Al incubar formas juveniles recién desenquistadas en presencia de suero y células peritoneales de ratas resistentes a F. hepatica, se observó que los gusanos se cubrieron con células entre las que destacan una gran cantidad de eosinófilos. Cuando al mismo sistema se le agrega AM del adulto, el porcentaje de células que se adhieren disminuye en forma considerable, indicando que el AM evita esta unión (Goose, 1978). Por otra parte, las células cebadas de la rata infectada por el parásito, se van haciendo resistentes a la degranulación por la exposición a los AM in vivo, al igual que ocurre en animales tratados crónicamente con agentes degranulantes (Goose, 1979). Los AM del tremátodo poseen propiedades degranulantes de células cebadas que podrían contribuir a la patología de la enfermedad.

En otro estudio, los anticuerpos séricos de conejo, ratas y ovinos infectados reconocieron dos grupos de antígenos de excreciones y secreciones (AM). Un grupo de antígenos tuvo peso molecular de 10,000 a 20,000 daltons y el segundo tuvo un peso molecular de 100,000 a 500,000 daltons (Lehner y Sewell, 1980).



A partir del AM del parásito adulto se purificó una enzima proteolítica con especificidad para globina; tiene un pH óptimo de 3.9 a 4.0, rompe la proteína en péptidos y libera un pequeño porcentaje de aminoácidos libres. La enzima tiene un peso molecular de 12,000 y no parece ser antigénica en animales infectados por las fasciolas (Simpkin et al., 1980). Cuando el ensayo se efectuó al pH de los conductos biliares se detectó también una enzima con actividad de colagenasa, que copurifica con la enzima globinolítica, lo cual puede tener importancia en la penetración de los parásitos adultos a los conductos biliares o en la migración de las formas juveniles por el tejido hepático.

Tres productos metabólicos del parásito adulto fueron usados en una prueba de micro ELISA para estudiar los niveles de anticuerpos séricos en una infección experimental por F. hepatica en conejo (Pfister et al., 1984). Los AM colectados de un cultivo mantenido por más de 7 días con peso molecular mayor de 10 000 y los AM de bajo peso molecular (2000-10 000) colectados de cultivos menores de 7 días, pudieron diferenciar entre infectados y testigos, así como detectar anticuerpos entre los 12 y 19 días postinfección.

#### 1.2.4. Antígenos de reacción cruzada.

Se presentan reacciones cruzadas entre los antígenos de la Fasciola hepatica y los de otros helmintos parásitos, las mas estudiadas han sido con el parásito sanguíneo Schistosoma mansoni debido a la posibilidad de obtener protección cruzada. Biguet et al. (1962) y Capron et al. (1964), por estudios de inmunolectroforesis, encontraron reacciones cruzadas con antígenos obtenidos a partir de 7 especies de helmintos: Shistosoma mansoni, Dicrocoelium dendriticum, Taenia saginata, Onchocerca volvulus, Ascaris lumbricoides, Trichinella spiralis y Echinococcus granulosus.

Por otro lado, Capron et al. (1968) encontraron por medio de inmunolectroforesis, que un extracto de Fasciola contenía 6 antígenos comunes con Dicrocoelium dendriticum, Taenia saginata, Schistosoma mansoni y Schistosoma hematobium, 4 con Schistosoma japonicum, 3 con Trichinella spiralis y 2 con Ascaris lumbricoides. Del total de 25 antígenos diferentes que contenía el extracto, 6 correspondieron a tejidos de los bovinos y 4 al caracol Lymnaea truncatula.

Se han utilizado diferentes técnicas para tratar de identificar los antígenos de reacción cruzada entre S.

mansoni y F. hepatica. La filtración en gel, como se mencionó en la sección anterior, ha sido utilizada para separar los diferentes antígenos presentes en las preparaciones crudas de F. hepatica adulta (Hillyer y Capron, 1976; Hillyer y Santiago de Weil, 1977; Hillyer y Cervoni, 1978, Choi y Lee, 1979). Hillyer y Capron (1976) eliminaron los antígenos de F. hepatica que reaccionaban en forma cruzada con S. mansoni por medio del fraccionamiento en Sephadex G-200. Choi y Lee (1979) encontraron que sólo 3 picos de proteína obtenidos con el extracto de fasciola adulta filtrado a través de Sephadex G-200, contenían antígenos que eran especie específicos, mientras que otros reaccionaban en forma cruzada con antígenos de Paragonimus, Clo-norchis y Paramphistomum.

Van Tiggele (1978), preparó antígeno de parásitos adultos de Cooperia oncophora, Dictyocaulus viviparus y Ostertagia ostertagi, y con la prueba de hemoaglutinación pasiva detectó reacciones cruzadas a títulos bajos (menores de 1:25) con los tres parásitos, al utilizar el suero de terneros infectados con F. hepatica. Con los sueros de terneros infectados con alguno de los tres nemátodos anteriores y el antígeno de Fasciola hepatica, ocurrieron reacciones similares con la misma prueba de hemoaglutinación pasiva. Cysticercus tenuicollis, el céstodo correspondiente al estadio intermediario de Taenia hydatigena,

posee también antígenos de reacción cruzada con F. hepatica (Campbell et al., 1977).

La presencia de antígenos de reacción cruzada entre Paragonimus westermani, Schistosoma mansoni y Fasciola hepatica, adultos, fue demostrada por la prueba de Ouchterlony y por ELISA (Hillyer y Serrano, 1983). Los antígenos comunes del tegumento de Fasciola hepatica y S. mansoni, estaban presentes también en extractos de P. westermani. Además fue posible demostrar que los antígenos de F. hepatica que se unen a Concanavalina A, así como una subfracción que tiene en isoelectroenfoque un punto isoelectrico de 4.2, se encuentran también en P. westermani. De manera semejante un suero policlonal mono específico hacia Fasciola/Schistosoma (un antígeno de reacción cruzada) y el suero anti P. westermani, reaccionaron ambos en la prueba de Ouchterlony, con el extracto antigénico de P. westermani, produciendo cada uno una línea que se unía con la otra, lo que indicaba la presencia de determinantes antígenos comunes y sugería un antígeno común entre los tremátodos digenéticos. Finalmente el antígeno de P. westermani indujo en el ratón la producción de anticuerpos que reaccionaban con antígenos adultos de S. mansoni en la prueba de ELISA.

En un intento de identificar las fuentes tisulares

de fracciones antigénicas purificadas bioquímicamente de F. hepatica y S. mansoni, se probaron antisueros contra secciones embebidas en plástico de gusanos de varias edades por una técnica de inmunofluorescencia indirecta (Hanna y Threadgold 1973). Los anticuerpos preparados contra los antígenos purificados por cromatografía del extracto de F. hepatica adulta completa a través de Concanavalina A-Sepharosa 4B, marcaron el parénquima y tegumento de F. hepatica adulta fuertemente, en tanto que los anticuerpos contra antígenos purificados por cromatografía de afinidad con anticuerpos anti S. mansoni marcaron solo el parénquima (Hanna y Hillyer, 1984). El antisuero contra extractos de F. hepatica tiñó también el parénquima del macho adulto de S. mansoni. También ocurrió una reacción cruzada entre el antisuero contra S. mansoni y el parénquima de la fasciola adulta. Un extracto de F. hepatica que Tailliez et al., 1967, describieron como de no reacción cruzada, se encontró que no contiene antígenos parenquimales de F. hepatica, ya que reacciona con el tegumento del adulto y de la forma juvenil. El antisuero contra F. hepatica proveniente de una infección experimental en conejos, tiñó componentes tegumentarios e intestino fuertemente, pero no reaccionó con el tejido parenquimal. Las cercarias de S. mansoni, así como los adultos y huevecillos contienen antígenos comunes así como determinantes anti

génicos en común con el antígeno T<sub>1</sub> de F. hepatica en el tegumento juvenil. Los autores sugieren que la reactividad cruzada entre estadios y especies se debe a la existencia dentro de éstos, de determinantes antigénicos comunes.

Se han observado también reacciones inespecíficas con el antígeno de F. hepatica. La proteína C reactiva puede dar líneas de precipitación con los antígenos del parásito (Capron et al., 1964). Estas líneas de precipitación pueden solubilizarse con una solución de citrato de sodio al 5%.

La presencia de componentes del huésped en preparaciones antigénicas de F. hepatica ha sido notada por varios autores. Capron et al., (1968), por medio de inmunoelectroforesis, encontraron que en su extracto, existían 6 componentes que correspondían a antígenos de los bovinos. Movsesijan y Borojević (1973) demostraron que tanto el AS, como el AM de F. hepatica adulta contenían proteínas séricas del huésped, siendo la albúmina el principal componente del hospedador en las preparaciones. Van Tiggele (1978) también trató de encontrar proteínas séricas en los antígenos del parásito por la prueba de difusión doble utilizando suero de conejo

antibovino y de conejo anti-ovino, apareció una línea que desaparecía al lavar las placas, el autor sugirió que se debía a anticuerpos de baja afinidad. Campos Bueno et al. (1981), trataron de identificar por difusión doble e inmunoelectroforesis, antígenos del huésped (albúminas y globulinas) en preparaciones de Fasciola hepatica, T. spiralis y A. suum; solamente A. suum mostró reactividad con el suero antialbúmina.

Otro aspecto importante a tomar en consideración, es la presencia de bacterias propias de la flora normal del parásito en las preparaciones antigénicas. Múzquiz-Moracho et al. (1981), aislaron a partir de Fasciola hepatica, Streptococcus, Staphilococcus, Enterobacteraceae y algunos anaerobios. Antígenos pertenecientes a estas bacterias pudieran dar reacciones inespecíficas al reaccionar con el suero de animales infectados.

### 1.3. Los antígenos de Fasciola hepatica en la inducción de resistencia y verificación de la inmunidad

#### 1.3.1. Inducción de resistencia a Fasciola hepatica en el huésped con antígenos de los estadios sucesivos del parásito

Varios estudios han sido realizados para estimular la resistencia contra la fasciolosis en el huésped, y para tratar de entender los mecanismos de resistencia con el fin de producir una vacuna. La resistencia a infecciones de desaffo, posteriores a la administración de dosis sensibilizantes de Fasciola hepatica es dependiente del huésped (Haroun y Hillyer, 1985). Los bovinos, ratas y cabras desarrollan niveles considerables de resistencia. En los ratones hay resultados contradictorios y los ovinos y conejos son huéspedes altamente susceptibles, que desarrollan escasa resistencia. A continuación se revisarán diferentes estudios sobre la protección y resistencia producida por los diferentes estadios del parásito en distintos huéspedes.

#### 1.3.1.1. Estimulación de resistencia por huevecillos

Ericksen y Flagstad (1974) sugirieron que los huevecillos o productos metabólicos de Fasciola hepatica adul



ta, implantados quirúrgicamente en forma subcutánea en ratas, lograban inducir resistencia hacia el desafío oral con metacercarias. Rajasekariah y Howell (1978), encontraron que la implantación subcutánea de los huevecillos obtenidos de parásitos adultos cultivados in vitro induce resistencia al desafío en la rata. Sin embargo, al inyectar subcutáneamente huevos recuperados de la bilis de ovinos infectados, en ratas, por vía subcutánea, Burden y Hammet (1980) no pudieron observar resistencia al desafiar con metacercarias.

1.3.1.2. Estimulación de resistencia por formas juveniles.

a). Metacercarias irradiadas.

Las radiaciones ionizantes reducen la patogenicidad de las larvas parasitarias, sin afectar su potencial antigénico (Haroun y Hillyer, 1985). Las metacercarias irradiadas de F. hepatica, estimulan fuertes respuestas protectoras en bovinos y ratas. En ovinos, conejos y ratones hay resultados controvertidos.

Doyle (1971), al reinfectar terneros con metacercarias de F. hepatica, encontró alta resistencia ya que

sólamente el 16% de la carga parasitaria, comparada con los animales testigo, se pudo recuperar de las terneras reinfectadas.

Harness et al. (1976) informaron la inducción de resistencia significativa en ratones sensibilizados por metacercarias irradiadas, sin embargo, Harness et al. (1977) encontraron que en el ratón sensibilizado los gu sanos inmaduros de la infección de desafío migraban más rápidamente del peritoneo al hígado, que en los contro les y por tanto no había una resistencia real. En ovi nos, Dargie et al. (1974), sensibilizaron a los anima les con 6 dosis de 100 metacercarias irradiadas, antes de desafiar con 75 metacercarias normales. Aunque se obtuvo una considerable reducción en la recuperación de parásitos (64%), ésta fué estadísticamente insigni ficante.

Resistencia significativa al desafío con F. hepatica ha sido informada por Armour et al. (1974) en terneros sensibilizados con 2 dosis de metacercarias irradiadas, administradas en un intervalo de 4 semanas. Se obtuvo una reducción en la carga parasitaria del 30% cuando los terneros sensibilizados eran desafiados 4 semanas después de la segunda dosis; la reducción fue del 70% al desafiar 8 semanas después de la segunda dosis.

b). Formas juveniles recién desenquistadas

El papel de la pared intestinal del huésped como barrera para el establecimiento de las formas juveniles, ha sido examinado en ratas y ratones. Con ratas (Hayes y Mitrovic, 1977) se encontró que la resistencia protectora se expresa dentro de las primeras 24 a 48 horas después del desafío. Los autores sugieren la posibilidad de que los parásitos hubieran muerto o hubieran quedado inmovilizados en la pared intestinal. Como la resistencia se expresó contra los estadios infectivos tempranos del trematodo, este estadio sería la mayor fuente de antígenos funcionales para inmunizar al huésped.

Rajasekariah y Howell (1977), desafiaron oral o intraperitonealmente a ratas previamente infectadas con E. hepatica; la carga parasitaria de las ratas desafiadas oralmente era menor que la de los controles, pero no hubo diferencia al desafiar por vía intraperitoneal. Cuando se recuperaron las formas juveniles de los intestinos, cavidad peritoneal e hígado a diferentes horas postdesafío oral, se encontró que pocas fasciolas penetraron al intestino de ratas inmunes comparadas con los controles. Esto sugirió que el intestino actúa como barrera importante para las metacercarias al desafío. Sin embargo, Kelly et al. (1980), en un estudio similar en ratas, encontraron que las infecciones primarias, dadas ya fuera por vía

oral o intraperitoneal, generaban protección significativa al desafío en forma oral o intraperitoneal, por lo que concluyeron que el paso de parásitos juveniles por el intestino no era esencial para adquirir resistencia en la rata.

Al transferir pasivamente suero de ratas infectadas por E. hepatica a ratas normales, se obtuvo protección hacia la infección con metacercarias (Howell et al. 1977). Un precipitado formado sobre el tegumento de las metacercarias contenía anticuerpos de ratas y componentes del parásito. Cuando las metacercarias se cultivaban en presencia de suero inmune, no se desarrollaron al inocularlas intraperitonealmente en ratas. Al inocular ratas con el precipitado emulsificado con adyuvante completo de Freund y desafiar con metacercarias oralmente, se redujo en un 50% su carga parasitaria (Howell y Sandeman, 1979).

En ovinos, la inoculación intramuscular con una mezcla de adyuvante completo de Freund y el mismo precipitado de antígeno-anticuerpo, y posteriormente al desafiar con 200 metacercarias, indujo una respuesta de anticuerpos pronunciada con respecto a los componentes antigénicos, pero no hubo efecto sobre la actividad migratoria de las fasciolas juveniles (Sandeman et al. 1980). Al hacer la necropsia se encontraron cargas parasitarias similares entre vacunados y testigos, confirmando que no se logró la protección.

En estudios realizados por Doy y Hughes (1982), los parásitos juveniles incubados in vitro por 24 horas con suero de rata normal o infectada solo, o con células de ratas infectadas, se desarrollaron normalmente al transferirlos a ratas normales.

El eosinófilo parece tener participación en el desarrollo de resistencia a las formas juveniles de F. hepatica. Doy et al. (1978) observaron que en ratas resistentes con altos niveles de anticuerpos Ig E séricos, a las 3 semanas postinfección después de un desafío, aparecían elevados números de células cebadas y eosinófilas en el intestino delgado y cavidad peritoneal. Eosinófilos de ratas infectadas y testigos, pudieron observarse adheridos al tegumento de las formas juveniles en presencia de suero inmune. La adhesión ocurría independientemente del complemento y no podía ser inducida por antisuero preparado contra los antígenos del parásito muerto (Doy et al. 1979, 1980).

Al incubar in vitro formas juveniles desenquistadas in vitro, con suero fresco y células peritoneales de ratas resistentes a F. hepatica, las fasciolas juveniles se cubrieron con células que incluían un gran número de eosinófilos. No se obtuvo adhesión celular con el suero de

ratas sin infectar (Goose, 1978). Cuando parásitos juveniles se incubaron in vitro con suero inmune, eosinófilos y neutrófilos, no se detectó daño en los gusanos (Duffus y Franks, 1980). Los autores atribuyeron la carencia de daño al rápido cambio y liberación del glucocálix externo por los parásitos juveniles.

#### 1.3.1.3. Estimulación de resistencia por parásitos inmaduros.

Con los parásitos que aún no se instalan en los conductos biliares del huésped y pueden recuperarse del parénquima hepático, se ha examinado la capacidad de inducir resistencia en ratones y ratas. Hughes et al. (1981) han encontrado que la sensibilización intraperitoneal de ratas con el estadio inmaduro a las 2h., 6 y 14 días postinquinamiento, protegieron al receptor contra el desafío con adultos 3 semanas después.

La inmunización de ratones con fasciolas inmaduras de 8, 12, 14, 16 y 18 días, pero no los de 20 a 24 días de edad redujo significativamente la cantidad de gusanos observada después del desafío (Lang y Dronen, 1977). Si parásitos de 12 a 24 días de edad eran incubados en suero inmune de ratón por 4 horas antes de transferir a ratones

normales, se observa una reducción en su sobrevivencia. El pretratamiento de gusanos inmaduros con suero de ra  
tón inmune inactivado por calor, o con suero normal no tuvo ningún efecto.

Eckblad et al. (1981) observaron la degeneración del tegumento después de un periodo de incubación de 4 h. en presencia de suero inmune de ternera. El tegumento sufre degeneración entre las 8 y 12 h. después de iniciar el cul  
tivo y se nota destrucción del tegumento después de 16 h.

a). Estimulación de resistencia con AM del parásito inmaduro.

El antisuero de ratón preparado contra un fluido de cultivo del parásito de 16 días de edad, se dió a ratones receptores y se observó la destrucción de gusanos migran  
tes, después de este tratamiento el suero de ratón antiso  
mático y el suero de ratón a los 100 días de haber infec  
tado, no produjo tales efectos (Lang. 1976). En otro es  
tudio los ratones fueron vacunados exitosamente al usar ya fuera sobrenadantes de cultivos in vitro o antígenos somáticos de la fasciola de 16 días de edad (Lang y Hall, 1977). La mayor protección producida por antígenos deri  
vados de cultivos se observó cuando el período de incu  
bación in vitro fue de 12-24 h. Aparentemente los antí

genos funcionales aparecen a las 12 horas, o bien, se necesita este tiempo para que alcancen una concentración capaz de inducir protección.

Rajasekariah, et al. (1979), encontraron que los productos metabólicos de fasciolas de 28 días de edad, producen resistencia significativa al desafío en ratas, pero no en ratones. Los AM de parásitos adultos no protegen a ninguna de las dos especies contra el desafío.

#### 1.3.1.4. Estimulación de resistencia con parásitos adultos.

Si se trasplantan fasciolas adultas en forma subcutánea a ratas normales, los gusanos son capaces de disminuir la carga de los parásitos de la infección de desafío en un 50% (Ericksen y Flagstad, 1979). Sin embargo, cuando se sensibilizaron ratas con una implantación subcutánea de adultos, y se desafiaron intraperitonealmente con fasciolas adultas, solamente 23% de los parásitos del desafío murieron.

Extractos somáticos de fasciolas adultas han sido utilizados como vacunas para inducir resistencia al desafío, y para observar la respuesta inmune del huésped a la infección. Urquhart et al. (1954), inocularon a conejos



con proteínas de F. hepatica; al desaffo se observó inhibición del desarrollo de los parásitos, pero no se redujeron las cargas parasitarias significativamente, comparadas con los testigos.

Sinclair y Joyner (1974), inyectaron un extracto salino al 20% de parásitos adultos en el hígado de conejos con una infección previa existente, para determinar su efecto sobre los gusanos al desaffo. Los autores informaron que se presentó un decremento del 54% en la carga parasitaria posterior al desaffo comparado con testigos sin tratar. La diferencia se atribuyó a una reacción de tipo anafiláctico en el hígado. El uso de un extracto al 4% de gusanos adultos inyectados por vía intramuscular, no produjo protección en ratas que no habían recibido una infección primaria (Hughes et al. 1981).

Oldham (1983 b), encontró que al incrementar la cantidad de antígeno sensibilizante, se mejora el grado de protección contra el desaffo y que se requiere de al menos 2 dosis sensibilizantes del AS adulto para estimular resistencia en ratas. Ni la edad de la infección al recuperar los parásitos adultos, ni la especie del animal de la que las fasciolas se colectan tuvo efecto sobre la resistencia. Se indicó la importancia de la ruta de sensibilización, ya que al administrar el AS adulto en adyuvante

completo de Freund por vía subcutánea no se estimuló la resistencia, pero ésto si ocurría cuando se daba conjuntamente por vía intraperitoneal solución salina emulsionada con adyuvante completo de Freund.

- a). Estimulación de resistencia con AM del parásito adulto.

Ericksen y Flagstad (1974), propusieron que la resistencia del huésped inducida por la implantación subcutánea de fasciolas adultas, podría ser dirigida contra los productos metabólicos del gusano. Los hallazgos de Goose (1978), en los cuales los AM de los adultos resultaron ser tóxicos para los linfocitos de ratas infectadas, sugirieron que algunos productos liberados por los parásitos pueden servir para protegerlos de la respuesta inmune. Sin embargo en otros estudios no se ha logrado inducir resistencia con los AM del parásito adulto. Aunque las ratas sensibilizadas por una inyección subcutánea de AM presentaron ejemplares más pequeños que los recolectados en animales testigo, no se detectó resistencia al desaffo (Burden y Hammet, 1980). Rajasekariah et al. (1979), encontraron que los AM de estadios inmaduros, pero no los de parásitos adultos, podían inducir resistencia en ratones.

En México, Bautista et al. (1981), inmunizaron ovinos con tres dosis de AS o AM de F. hepatica adulta, emulsificada en adyuvante completo de Freund, por vía intraperitoneal. Los animales fueron desafiados oralmente con metacercarias 8 días después de la última inmunización. En el grupo inmunizado con AM 6 a 7 animales tuvieron un promedio de 1.1 fasciolas, en tanto que los controles tenían un promedio de 9.3 fasciolas. Los resultados sugirieron que el AM emulsificado en adyuvante completo de Freund por vía intraperitoneal en ovinos tuvo efecto protector contra la infección.

#### 1.3.1.5. Resistencia cruzada entre Fasciola hepatica y otros helmintos.

Hillyer (1979), inmunizó ratones con un extracto crudo de F. hepatica y observó un decremento del 28 al 58% en las cargas parasitarias de S. mansoni de la infección de desafío. El autor aisló entonces los antígenos protectores por cromatografía de afinidad; después de inmunizar con los antígenos purificados, se redujeron las cargas de S. mansoni en 50 a 60% comparadas con los animales control. Otros trabajos indican que el tegumento de F. hepatica, es la fuente de tal antígeno (Hillyer et al., 1979; Hillyer, 1980; Demaree y Hillyer (1982).

Haroun y Millyer (1985), realizaron un estudio para investigar la resistencia cruzada de F. hepatica y S. mansoni en borregos, con el fin de observar si los antígenos compartidos se pueden utilizar para inmunizar estos animales. La infección primaria de borregos con S. mansoni mostró que son parcialmente susceptibles a la enfermedad, encontrándose cuentas bajas de huevecillos. La infección primaria con S. mansoni produjo una reducción del 51% en la carga parasitaria después del desafío con F. hepatica. La infección primaria de ovinos con F. hepatica por 10 semanas, seguida por el desafío con S. mansoni, redujo las cuentas de huevecillos a 22 y 16% en hígado e intestino respectivamente.

Resistencia heteróloga contra F. hepatica ha sido demostrada en ovinos con una infección primaria con el metacéstodo de Taenia hydatigena (Cysticercus tenuicollis) por 12 semanas (Campbell et al., 1977). Los borregos infectados con C. tenuicollis fueron resistentes a F. hepatica, si se administraba el desafío con el tremató junto con la infección por céstodos, o después de eliminar a los céstodos con mebendazol.

Doy et al. (1981), encuentran que la infección primaria con N. brasiliensis crea resistencia significativa a F. hepatica en ratas.

1.3.2. Los antígenos de Fasciola hepatica en la verificación de la inmunidad: Inmunodiagnóstico y dinámica de la respuesta inmune.

1.3.2.1. Inmunodiagnóstico.

La técnica utilizada tradicionalmente para el diagnóstico de la fasciolosis en huéspedes parasitados es el examen coproparasitológico, debido a su sencillez y economía. Este método presenta la gran desventaja de requerir de repeticiones múltiples, lo que lo hace un método lento para llegar a determinar si el animal está libre de fasciola (Enríquez, 1971), además de no detectar infecciones tempranas, ya que los huevecillos comienzan a aparecer en las heces a las 10 semanas postinfección (Quiroz, 1984).

Como se mencionó anteriormente, diversas investigaciones han abordado temas referentes al aislamiento, purificación y caracterización de antígenos de Fasciola hepatica con el fin de obtener antígenos específicos y sensibles para el inmunodiagnóstico. Asimismo, diferentes métodos serológicos han sido implementados, con el propósito de encontrar pruebas sensibles y específicas para el diagnóstico de la fasciolosis. El cuadro 1 resume algunos de estos procedimientos.

## CUADRO I

## Pruebas diagnósticas en la fasciolosis

Método	Autor	Especie	Tipo de Antígeno
Fijación de complemento (F C)	Bénex, 1964	Ovino, humano	AS deslipidizado adulto
	Coudert <u>et al.</u> , 1967	Humano	AS adulto
	Tribouley <u>et al.</u> , 1969	Humano	AS deslipidizado
	Cuperlovič y Lalič 1970	Conejo	
	Gundlach, 1971	Conejo	AS y AM adulto enteros y fraccionados
Prueba intradérmica (P I D)	Biagi <u>et al.</u> , 1958	Humano	AS adulto
	Maekawa y Ku shibe, 1964	Conejo	RNA-péptido extraído del adulto
	Pérez Ramos, 1968.	Ovino	AS y AM adulto
	Patnaik y Das, 1968	Bovino	AS adulto
	Blancou <u>et al.</u> , 1976	Bovino	Ag de Taillez, 1970
	Gómez <u>et al.</u> , 1981	Bovino	AM y AS adulto

CUADRO I (Continuación)

Método	Autor	Especie	Tipo de Antígeno
Prueba de precipitación (DD)	Urquhart <u>et al.</u> , 1954	Bovino	Fracción proteínica precipitada en $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ al 50%
	Biagi <u>et al.</u> , 1958	Humano	Ag S adulto
	Gajos, 1968	Bovinos	
	Sinclair y Kendall, 1969	Conejos	
	Gundlach, 1971	Conejos	AS, AM enteros y fraccionados
	Doyle <u>et al.</u> , 1973	Bovinos	
	Bénex <u>et al.</u> , 1973	Ovino	
	Beresford, 1976	Humano	AS adulto
	Van Tiggele, 1976	Ovino, bovino	AS adulto
	Van Tiggele, 1978	Ovino, bovino	AS adulto
Arriaga <u>et al.</u> , 1983	Bovino	AS y AM adulto	
Inmunofluorescencia in directa (IFI)	Thorpe, 1965	Ratas, ovinos	Secciones de parásitos juveniles y adultos
	Coudert, 1967	Humano	Secciones de parásito adulto
	Bénex <u>et al.</u> , 1973.	Ovinos	Estadios de desarrollo
	Hanna, 1980	Ovinos	Secciones del parásito juvenil y adulto

CUADRO I (Continuación)

Método	Autor	Especie	Tipo de antígeno
	Hanna y Jura, 1977	Bovinos	Metacercarias des <sup>u</sup> enquistadas <u>in vi</u> <u>tro</u> .
	Hanna <u>et al.</u> , 1982	Ovino	Secciones del pa rásito juvenil y adulto.
DASS-fluo- rescencia*	Deelder y Ploem, 1975	Conejo, bovino, humano	AS adulto adsor bido sobre esfé ras.
Aglutina- ción	Bénex, 1964	Humano, bovino, ovino	AS deslipidizado adulto.
	Bénex <u>et al.</u> , 1973	Ovino	AS deslipidizado adulto.
	Enders <u>et al.</u> , 1980	Bovino, ovino	AS deslipidizado adulto.
Hemoaglutina- ción pa- siva (H P)	Tribouley <u>et al.</u> , 1969.	Humano	AS deslipidizada adulto.
	Gundlach, 1971	Conejo	AS, AM enteros y fraccionados del adulto.
	Bénex <u>et al.</u> , 1973	Ovino	AS adulto deslippi dizado.
	Poluéktova, 1975	Ovino	
	Van Tiggele y Over, 1976	Ovino, bovino	AS adulto.
	Van Tiggele, 1978	Ovino	AS adulto.
	Robert <u>et al.</u> , 1980	Bovino	Ag de Tailliez, 1970.

\* DASS: Defined antigen substrate spheres: esferas con subs-  
trato antigénico definido.



CUADRO 1 (Continuación)

Método	Autor	Especie	Tipo de Antígeno
	Arriaga <u>et al.</u> , 1983	Bovino	AM y AS de adulto
	Mansour <u>et al.</u> , 1983	Humano	AS fraccionado adulto
Inmunoelectroforesis (IEF)	Capron <u>et al.</u> , 1964	Humano conejo	AS adulto
	Bénex <u>et al.</u> , 1973	Ovino	AS adulto deslipidizado
	Van Tiggele, 1978	Ovino	AS adulto
Contrainmunoelectroforesis (CIE)	Hillyer, 1975	Humano	AS adulto
	Hillyer y Capron, 1976	Ratones	AS adulto fraccionado
	Van Tiggele y Over, 1976	Ovinos bovinos	AS adulto
	Hillyer y Santiago, 1977	Ratas	AS adulto fraccionado
	Van Tiggele, 1978	Ovinos	AS adulto
	Levine y Hillyer, 1980	Ratón, conejo	AS adulto fraccionado
	Enders, 1980	Bovino	AS adulto deslipidizado
	Mansour <u>et al.</u> , 1983	Humano	AS adulto fraccionado
Arriaga <u>et al.</u> , 1983	Bovino	AS y AM adulto	

## CUADRO I (Continuación)

Método	Autor	Especie	Tipo de Antígeno
Ensayo inmuno enzimático (ELISA)	Burden y Hammet, 1978	Bovino	AS adulto
	Levine y Hillier, 1980	Ratón, conejo	AS adulto fraccionado
	Zimmerman <u>et al.</u> , 1982	Ovino	AS adulto
	Oldham, 1983	Bovino	AS fraccionado adulto
	Pfister <u>et al.</u> , 1984	Conejo	AS y AM fraccionado
	Wescott <u>et al.</u> , 1984	Bovinos	AS adulto
Inmunoensayo en capa delgada (ICD)	Gómez <u>et al.</u> , 1979	Bovino, ovino	AS adulto
	Arriaga <u>et al.</u> , 1983	Bovino	AS y AM adulto

Puede observarse que generalmente como fuente de an  
tígeno se recurre a la forma adulta del parásito, porque  
puede obtenerse fácilmente de los huéspedes infectados  
naturalmente en cantidades suficientes y en una forma re  
lativamente pura.

### 1.3.2.2. Dinámica de la respuesta inmune.

Cabe recalcar que solo en algunos de los estudios del cuadro 1 se ha determinado el desarrollo de los títulos de anticuerpos en ovinos y bovinos infectados experimentalmente. Klimenko (1971), utilizó pruebas de precipitación en ovinos infectados con 140 metacercarias de F. hepatica y observó la producción de anticuerpos entre las 2 y 18 semanas postinfección. Por otro lado, Bénéx et al. (1973), en ovinos infectados con 250 metacercarias, determinaron los títulos de anticuerpos en el transcurso de 15 semanas por diversas pruebas de diagnóstico (FC, HP, DD, IEF, IF); los anticuerpos aparecieron durante la segunda semana postinfección cualquiera que fuera el método empleado. Los títulos de anticuerpos se incrementaron hasta estabilizarse entre la sexta y octava semana y se mantuvieron así hasta el final del experimento. Los anticuerpos precipitantes aparecieron más tarde que los otros (tercera semana). Borojević et al. (1973), llevaron a cabo pruebas de fluorescencia indirecta en ovinos infectados con 500 metacercarias y obtuvieron los títulos más altos 6 semanas después de la infección. Al utilizar la misma técnica, Movsesijan et al. (1975), observaron también un aumento marcado de anticuerpos en ovinos durante las primeras 6 semanas, seguido de una disminución gradual de ellos después de la semana 16. Además, notaron

que los niveles de IgG de los ovinos infectados aumenta ron entre las 6 y 12 semanas y disminuyeron a partir de la semana 16.

Van Tiggele y Over (1976), empleando un antígeno des lipidizado, detectaron la presencia de anticuerpos en ovinos a partir de la tercera semana con la prueba de HP; en este experimento los niveles máximos fueron alcanzados en la semana 17, en tanto que los huevecillos del tremá to se detectaron en las heces a partir de la semana 11. En un trabajo posterior, Van Tiggele (1978), utilizó cua tro grupos de ovinos, que recibieron de 400 a 1200 meta cercarias por animal y observó la aparición de anticuer pos en las pruebas de HP, DD e IEF, a partir de las 2 o 3 semanas postinfección y el mayor número de bandas de precipitación se obtuvo entre las 8 y 12 semanas poste riores a la infección. Con objeto de determinar como se modifican las poblaciones de anticuerpos, Hanna (1980), hizo reaccionar suero proveniente de ovinos con infec ciones de 0 a 30 semanas de duración, con secciones de parásitos obtenidos 1, 6 y 29 semanas después de la in festación. Encontró que los anticuerpos con afinidad por el epitelio intestinal, sistema excretor y tegumen to de las formas juveniles, mostraron su máximo nivel 4 semanas después de la infección y comenzaron a declinar tres semanas más tarde; en cambio, los anticuerpos diri ri

gidos contra el tegumento de las formas adultas, aparecieron hasta las 6 semanas postinfección y comenzaron a declinar 5 o 6 semanas después.

Sandeman y Howell (1980) cultivaron metacercarias enquistadas con el suero de borregos infectados con 100 a 200 metacercarias de F. hepatica, y observaron la formación de un precipitado, en el cual se confirmó la presencia de anticuerpos por IF y por DD. Se detectaron anticuerpos desde la primera semana postinfección. Los anticuerpos se elevaron y alcanzaron su máximo nivel entre las 9-10 semanas, lo que coincide con la primera aparición de huevecillos en las heces; después de este tiempo los niveles de anticuerpos decrecieron. La comparación de la cantidad de precipitado formado, con los niveles de enzimas hepáticas y biliares en el suero, indicó que la respuesta de anticuerpos alcanza su máximo cuando las fasciolas juveniles provocan mayor daño al perénquima hepático como resultado de su actividad migratoria. Los niveles de anticuerpos disminuyen una vez que los tremátodos se establecen en los conductos biliares.

Nájera (1981), en borregos infectados oralmente con 200 metacercarias, utilizando AS adulto determinó con la técnica de HP que los títulos de anticuerpos aumentaron

a partir de la cuarta semana; los niveles máximos se registraron entre la sexta y décima semana y la inmunoglobulina predominant e fue IgM. Por inmunofluorescencia indirecta, usando como antígeno secciones de parásitos de 12 semanas de edad, detectó anticuerpos de la clase IgG desde la tercera semana con títulos máximos entre la séptima y décima semanas.

En una infección experimental de terneros Hughes et al. (1981), con la técnica de inmunofluorescencia indirecta, usando secciones de parásitos juveniles y adultos como antígeno, estimaron la concentración de IgG e IgA específicas para el tegumento y AM en suero y en bilis. Los anticuerpos contra antígenos del tegumento (T1) y AM, alcanzaron concentraciones máximas de 4 a 6 semanas postinfección y declinaron al establecerse el parásito en los conductos biliares. Las IgG contra los antígenos del tegumento adulto (T2) aparecen en el suero 6 semanas después. En la bilis, tanto los títulos de IgG como de IgA contra los antígenos T1, se elevaron a valores máximos a las 4-6 semanas postinfección, pero no hubo actividad contra los antígenos T2.

Cuando se estudiaron los niveles de anticuerpos circulantes contra los antígenos del parásito T1, T2 y AM

durante una infección, con anticuerpos fluorescentes Hanna et al. (1982), encontraron que al aplicar un tratamiento antihelmíntico a las 3 semanas postinfección, se evitaba el desarrollo de la respuesta de anticuerpos T2. En cambio, cuando el antihelmíntico era administrado a las 6 semanas después de la infección, no se afectaban los títulos de anticuerpos T1 o anti AM, pero sí la respuesta de anticuerpos T2; lo que sugiere que los antígenos T2 se expresan hasta que el parásito penetra al hígado.

Zimmerman et al. (1982), aplicaron el ensayo inmunoenzimático para evaluar la infección experimental de borregos. La prueba detectó anticuerpos a partir de la segunda semana postinfección, aunque los valores considerados como diagnósticos ocurrieron en la sexta semana después de la infección. Oldham (1983 a), utilizó también el ensayo inmunoenzimático, para estudiar las respuestas de anticuerpos hacia 7 fracciones antigénicas de F. hepática adulta obtenidas por cromatografía en Sephadex G 200, en bovinos infectados experimentalmente. Los anticuerpos hacia antígenos de peso molecular mayor de 67,000 daltons aparecieron tempranamente y en general persistieron durante la infección; se sugiere que representan antígenos comunes a todos los estadios de desarrollo, en tanto que los anticuerpos hacia los antígenos de peso molecular menor a 48 000, incrementaban gradual



mente durante la infección y tal vez representan antígenos de maduración del gusano.

Arriaga et al. (1983) y Gómez et al. (1984), han observado que cuando se aplican diversas pruebas de diagnóstico en animales infectados naturalmente con F. hepatica, se presentan variaciones en los títulos de anticuerpos, situación que podría atribuirse a cambios en los niveles de anticuerpos que ocurren cuando se efectúa en los animales el tratamiento antihelmíntico.

El efecto de la infección con F. hepatica en los niveles de inmunoglobulinas en bilis, heces y suero de ovinos, ha sido estudiado por Wedrychowicz et al. (1984). En suero IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> fueron las que alcanzaron incrementos más marcados, con un máximo a las 16 semanas postinfección. En bilis, IgG<sub>2</sub> alcanzó valores máximos a las 2 semanas postinfección, e IgG<sub>1</sub>, IgA e IgM llegaron a niveles máximos 4 semanas después de la infección. En las heces, los niveles de IgG e IgA fueron bajos después de una infección primaria; después de reinfectar se observó un rápido incremento en la concentración de IgA. Los niveles de anticuerpos hemoaglutinantes contra antígenos de huevos, AM juveniles y AM y AS adultos fueron evaluados también. Anticuerpos hemoaglutinantes

contra AM adulto mostraron el mayor nivel a las 2-4 semanas después de la infección, mientras que los anticuerpos contra AS adulto alcanzaron títulos máximos entre las 4 y 8 semanas. Los títulos en bilis y suero hacia AM juveniles y antígenos del huevo fueron máximos a las 4 semanas postinfección, los de bilis disminuyen y los de suero permanecen elevados hasta las 16 semanas postinfección.

Recientemente, fué estudiada la variación de la respuesta inmune en ovinos infectados experimentalmente, mediante las pruebas de difusión doble en gel, hemoaglutinación pasiva, inmunoelectroforesis, contrainmunoelectroforesis e inmunoensayo en capa delgada durante las primeras 15 semanas postinfección (Ruíz Navarrete et al., 1985). Se utilizaron dos antígenos diferentes AS y AM de F. hepática adulta. El inmunoensayo en capa delgada fue la primera en detectar a los ovinos infectados (a partir de la primera semana postinfección), por lo que parece ser muy adecuada para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Las pruebas de DD y CIE comenzaron a mostrar títulos apreciables a la quinta semana y la HP a partir de la séptima semana postinfección.

## 2. Objetivos

La revisión de los antígenos de Fasciola hepatica presentada anteriormente, enfatiza la importancia de su estudio para su aplicación tanto en pruebas de diagnós tico, estudios de desarrollo de la respuesta inmune, así como su posible aplicación en ensayos de vacunación. Por ello se decidió realizar la presente tesis con los siguientes objetivos:

Caracterizar los componentes antigénicos de un antí geno somático y un antígeno metabólico (de excreciones y secreciones), de Fasciola hepatica adulta.

Determinar cuáles de estos componentes son reconoci dos por ovinos infectados experimentalmente.

Determinar cómo van apareciendo los componentes an tígenicos en el curso de una infección experimental.

### **3. Materiales y Métodos**

Los antígenos somático (AS) y metabólicos (AM) de Fasciola hepatica adulta fueron analizados por inmunoelectroforesis en gel de agar y por inmunoelectroforesis cruzada, para determinar el número de componentes antigénicos reconocidos por los sueros de borregos hiperinmunes hacia F. hepatica. La electroforesis en gel de poli-acridamida permitió determinar el número de componentes de los antígenos, así como su peso molecular, al comparar las distancias recorridas por éstos con las recorridas por marcadores proteínicos de peso molecular conocido.

Por otra parte, se infectaron 10 borregos con 200 metacercarias por animal, 5 animales se dejaron como testigos sin infectar y se tomaron muestras de suero antes de infectar y en las semanas 2,4,6,8 y 10 postinfección. El suero de estos animales fue utilizado para estudiar la dinámica de la respuesta de anticuerpos medida por distintas pruebas serológicas (hemoaglutinación pasiva, difusión doble, contraimmunoelectroforesis, inmunoelectroforesis e inmunoensayo en capa delgada).

Para determinar cuáles de los componentes del AS y AM son antigénicos, su peso molecular y como van apareciendo durante la infección los distintos componentes, se aplicó el método de inmunoelectrotransferencia, que consistió en transferir el corrimiento de los antígenos en geles de poliacrilamida a papel de nitrocelulosa, posteriormente se incubó con el suero de los borregos y después con un conjugado de IgG de conejo anti IgG de ovino acoplado a peroxidasa que fue preparado previamente. Para revelar las bandas se utilizó diaminobencidina.

3.1. Preparación de antígenos de Fasciola hepatica,  
(Bautista y Morilla, 1981).

3.1.1. Soluciones

a) Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS),

pH 7.2.

Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.585 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.98 g
Na Cl	4.25 g
H <sub>2</sub> O destilada	c.b.p. 1000 ml

b) Solución de Hedon-Fleig

Na Cl.....	7.0 g
K Cl.....	0.3 g
*Ca Cl <sub>2</sub> .....	0.1 g
Na HCO <sub>3</sub> .....	1.5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O.....	0.5 g
Mg SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O.....	0.3 g
Glucosa.....	1.0 g
Agua destilada.....	1 000 ml

Filtrar por Millipore (0.22 $\mu$ ) y guardar en un frasco con con tapón de rosca a 4°C.

\* Para evitar la precipitación del Ca Cl<sub>2</sub>, disolverlo primero en un poco de agua y añadir luego el resto de la solución.



### 3.1.2. Antígeno Somático (AS).

- a) Obtener las fasciolas de hígados infectados de bovino.
- b) Lavar con solución salina isotónica, hasta que se observe claro el sobrenadante.
- c) Lavar con agua destilada.
- d) Congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- e) Liofilizar.
- f) Triturar los parásitos en un mortero en baño de hielo, hasta formar un polvo.
- g) Pesar 10 g de polvo y suspender en 50 ml de PBS pH 7.2, agitando.
- h) Dejar con agitación lenta (con un rotor magnético) por 24 horas.
- i) Centrifugar a 3000 r p m, 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- j) El sobrenadante se filtra por Millipore de  $0.22\ \mu$ , recolectando en un tubo estéril.

- k) Dividir en alícuotas. Determinar protefna y congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su empleo.

3.1.3. Antígeno excretorio-secretorio o metabólico (AM).

- a) Colectar las fasciolas vivas en PBS pH 7.2 estéril.
- b) Lavar seis veces con PBS pH 7.2 estéril.
- c) Colocar durante diez minutos en PBS pH 7.2, con timerosal 1: 10 000.
- d) Lavar dos veces con PBS pH 7.2 estéril.
- e) Colocar de 20 a 30 fasciolas en un matrâz estéril y solución de Hedon-Fleig estéril, a razón de 1 ml/ fasciola.
- f) Incubar durante 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en bañõ marfã.
- g) Colectar el sobrenadante en bañõ de hielo y centrifugar a 8000 r p m, 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- h) Determinar el contenido de protefna por el método de Lowry.

- i) Envasar el antígeno en alícuotas y guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

### 3.2. Determinación de protefina (Lowry et al., 1951)

La concentración de protefina de las preparaciones antigénicas fué estimada por el método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando diluciones de albúmina sérica bovina como estándares.

### 3.3. Preparación de antisueros anti-AM y anti-AS

Se obtuvieron antisueros en ovinos contra el AS o AM de Fasciola hepatica, de acuerdo al esquema de inmunización propuesto por Bautista et al., 1982. El suero correspondiente a las 15 semanas postinfección, se utilizó como suero hiperinmune. Los antisueros fueron almacenados en alícuotas y conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4. Animales

Se utilizaron 15 borregos de la raza Tabasco, 10 de los cuales fueron infectados oralmente con 200 metacercarias/animal, de origen bovino, obtenidos a partir de caracoles Lymnaea viator; 5 animales permanecieron como testigos sin infectar. Se tomaron muestras de suero an

tes de infectar y a las 2, 4, 6, 8 y 10 semanas postinfección.

### 3.5. Exámen coproparasitoscópico

Se tomaron muestras para llevar a cabo la técnica de sedimentación para detectar la presencia de huevecillos de Fasciola hepatica, a lo largo del experimento.

### 3.6. Serología

Se aplicaron diferentes pruebas serológicas, utilizando el suero de las distintas semanas de infección.

#### 3.6.1. Difusión doble en agar (DD)

Se utilizaron geles de agar noble al 1% en solución salina amortiguadora de fosfatos, pH 7.2, con 10% de NaCl, según la modificación de Van Tiggele (1978).

#### 3.6.2. Contrainmunolectroforesis (CIE)

Se siguió la técnica ya descrita (Arriaga et al., 1983), utilizando geles de agar noble al 1.2% en solución salina amortiguadora de barbituratos, pH 8.6, fuerza iónica 0.05.

### 3.6.3. Hemocoaglutinación pasiva (HP)

Se llevó a cabo el método descrito por Bautista y Morilla (1981). Se utilizaron glóbulos rojos de borrego tratados con ácido tánico y sensibilizados con cada uno de los antígenos. Con los sueros se hicieron diluciones dobles seriadas. Se consideraron positivos los que aglutinaron hasta la dilución 1:32 o mayor.

### 3.6.4. Inmunoensayo en capa delgada (ICD)

Se utilizó la técnica descrita por Gómez, Arriaga y Morilla (1979). Se hicieron diluciones dobles seriadas de los sueros y se consideró positivo a un suero, cuando formaba una gota visible en la dilución 1:8.

### 3.6.5. Inmunolectroforesis (IEF).

Para el estudio inmunolectroforético se siguió el método descrito en Bautista y Morilla, 1981. El buffer utilizado fue de barbituratos 0.1 M, pH 8.6, en el cual se prepararon las placas al 1%. Se aplicaron 6 mA/lamina, durante 90 minutos.

### 3.7. Inmunolectroforesis cruzada (IEC)

Con el fin de determinar las proporciones óptimas de antígeno y anticuerpo a utilizar en la prueba de inmunolectroforesis cruzada, fue necesario establecer primeramente la técnica de electroinmunodifusión.

3.7.1. Electroinmunodifusión (EID). Técnica de rocket,  
(Laurell, 1966).

#### 3.7.1.1. Reactivos

- a) Suero
- b) Antisuero
- c) Buffer Tris-Borato pH 8.6. Para su preparación se requiere pesar:

27.7 g de 2 -amino-2hidroximetil-1,3 propanodiol  
(Tris).

7.6 g de ácido bórico

1.8 g de EDTA sal disódica dihidrato

Añadir 800 ml de agua destilada. Disolver.

Añadir 50 ml de merthiolate 1:1000. Llevar a 1 l, con  
agua destilada.

## d) Diluyente para copolimerizar

A 50 ml de barbital sódico 0.2 M, añadir 27.5 ml de HCL 0.2M y 0.4 ml de glutaraldehído al 50% w/w. Diluir a 200 ml con agua destilada. Almacenar a 2-8°C.

## e) Gel de agarosa al 1% en Tris-borato.

3.7.1.2. Determinación de la dilución de antisuero adecuado.

Se usaron laminillas con 3 ml de mezcla antisuero-agarosa, mantenida a 56°C, preparadas por el método siguiente:

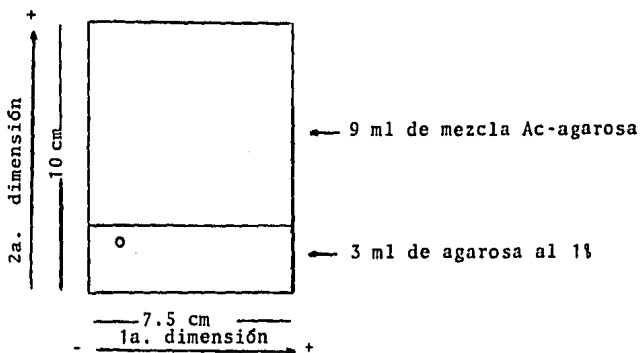
- a) Marcar 4 tubos de 13x100 con: AM 1:5, AM 1:10, AM 1:20 y AS 1:30. En el primer tubo de cada serie pipetear 4 ml, en el segundo 9 ml, en el tercero, 2.5 ml y en el cuarto, 3 ml de agarosa al 1% en tris-borato. Colocarlos en un baño de agua a 56°C.
- b) Añadir al primero y segundo tubos de cada serie un ml del antisuero anti AM o anti AS respectivo, precalentado a 56°C.
- c) Pipetear 2.5 ml de la mezcla del segundo tubo al tercero. Mezclar.

- d) Pipetear 1.5 ml del segundo tubo al cuarto tubo. Mezclar. Mantener todos los tubos a 56°C.
- e) Marcar 8 laminillas con: AM 1:5, AM 1:10, AM 1:20, AM 1:30, AS 1:5, AS 1:10, AS 1:20 y AS 1:30. Pipetear 3 ml del tubo de ensayo correspondiente, con una pipeta precalentada. Evitar la formación de burbujas de aire.
- f) Dejar solidificar las placas durante 20 minutos. Las placas se pueden guardar en cámara húmeda a 2-8°C.
- g) Perforar dos hoyitos en el gel. Eliminar el cilindro de agarosa con pipeta Pasteur, conectada a una bomba de vacío.
- h) Hacer distintas diluciones de antígeno con el diluyente de glutaraldehído.
- i) Después de 30 minutos exactamente, a temperatura ambiente, seguir con j.
- j) Llenar los pozos. Empezar la electroforesis rápidamente.
- k) Colocar las placas en la cámara de electroforesis, de tal modo que los pozos estén colocados cerca del cátodo. Se aplican 6 mA/placa, durante 2 horas.



3.7.2. Inmunolectroforesis cruzada (IEC). (Hillyer y Cervoni, 1978).

- a) Preparar agarosa para la electroforesis en la primera dimensión. Se usa agarosa al 1% en buffer para inmunolectroforesis. Se funde por calentamiento, reponiendo el agua que se pierde por evaporación.
- b) En una placa de 7.5 x 10 cm, colocar agar de impregnación (agarosa al 1%). Vertir 3 ml de agarosa al 1% y dejar solidificar 20 minutos. Perforar un hoyito en un extremo.
- c) Colocar la placa en el aparato de electroforesis. Depositar el antígeno. El hoyito debe quedar cercano al cátodo. Colocar las mechas entre el buffer y las placas. Correr con 7 mA/placa, durante 90 minutos.
- d) Hacer una dilución de anticuerpo en agarosa al 1% (pre determinado por electroinmuno difusión). Llenar el resto de la placa de modo que no se formen burbujas, (figura). Al solidificar este gel, hacer la electroforesis en segunda dimensión (en ángulos rectos a la dirección de la primera electroforesis). Aplicar 300 V, durante 2 horas.



### 3.8. Preparación de geles y muestras para electroforesis de poliacrilamida (PAGE) (Laemmli, 1970).

#### 3.8.1. Soluciones

##### a) Acrilamida - Bis. Solución stock.

Nota: Neurotóxico. Usar guantes. Usar propipeta.

30 g acrilamida recristalizada

0.8 g Bis - acrilamida (Bio-Rad).

Colocar ambas sustancias en un vaso de precipitados de 100 ml. Disolver en 60 ml de agua bidestilada, con calentamiento suave en un baño a 37°C y agitación con barrita de vidrio.

Cuando se haya disuelto, completar a 100 ml en una probeta de 100 ml.

Filtrar por Whatman No. 1, directamente en una botella estéril, para su almacenaje.

Guardar a 4°C.

b) Tris 1.5 M, pH 8.8. Buffer para el gel inferior.

Colocar 90.9 g de tris en un vaso de precipitados de 500 ml. Disolver en agua bidestilada 400 ml, con agitador magnético (asegurarse que el magneto esté limpio).

Usando un potenciómetro, (calibrado con un estándar de pH 9.0) ajustar el pH de la solución a pH 8.8 con HCl conc., (añadir gota a gota con pipeta Pasteur).

Cuando el pH sea de 8.8, completar a 500 ml con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

c) Tris 0.25 M, pH 6.8. Buffer para el gel superior.

15.1 g tris se colocan en un vaso de precipitados de 500 ml. Proceder como en b excepto que el pH se ajusta a 6.8. Volumen final 500 ml. Guardar en refrigerador.

d) Dodecil sulfato de sodio al 10% (SDS).

100 g SDS en probeta de 1 l.

Tratar de no respirar el polvo, porque hace toser.  
Añadir agua destilada hasta 1 l, lentamente para no hacer mucha espuma. Colocar en baño de agua a 37°C. Cuando todo esté disuelto, revisar si se tiene 1 l de solución. Colocar en frasco de reactivo y almacenar a temperatura ambiente.

e) Buffer de muestra utilizado para los marcadores de peso molecular.

En un frasquito de 15 ml. hacer la mezcla siguiente:

2.0 ml	SDS 10%
2.5 ml	Tris 0.25 M, pH 6.8
1.0 ml	Sacarosa al 80% (0.8 g sacarosa/ml)
0.5 ml	Azul de bromofenol al 0.2%
4.0 ml	Agua bidestilada

Guardar a 4°C.

f) Solvente para muestras.

En un frasco pequeño colocar:

2.5 ml                    Tris 0.25 M, pH 6.8

1.0 ml                    SDS al 10%

5.0 ml                    Glicerol

pequeña cantidad de rojo de fenol o azul de bromo fenol.

1.5 ml                    H<sub>2</sub>O bidestilada

g) Buffer de corrida.

28.8 g                    Glicina .

6.0 g                    Tris

20 ml                    SDS al 10%

Disolver la glicina y el tris en 1 800 ml de agua, añadir 20 ml de SDS al 10%, completar a 1 l, con agua bidestilada.

### 3.8.2. Montaje del aparato y preparación de geles.

a) Frotar las caras internas de las placas de vidrio con etanol.

b) Ensamblar las placas de vidrio en el aparato y probar que no haya fugas.

- c) Colocar el peine entre las dos placas de vidrio y señalar sobre el vidrio exterior, el punto que diste 1 cm a partir del extremo del peine. Retirar el peine.
- d) Nivelar el aparato.
- e) Preparar el gel inferior (separador).

Para una placa:

3.75 ml	Tris 1.5 M, pH 8.8
6.1 ml	Agua bidestilada
5.0 ml	Stock acrilamida/Bis

Desgasificar por 5 minutos. Añadir lo siguiente a lo anterior y usar inmediatamente.

150 $\mu$ l	SDS al 10%
150 $\mu$ l	Persulfato de amonio (75 mg/1 ml)
10 $\mu$ l	TEMED N, N, N <sup>1</sup> , N <sup>1</sup> - Tetrametil etilenediamina.

Lo anterior es para un gel a 10%.

- f) Utilizando una pipeta de boca ancha, hacer que el gel

inferior resbale por una de las paredes laterales-entre las dos placas de vidrio-, hasta llegar a la marca señalada en el paso c.

Rociar inmediatamente la superficie del gel con alcohol isopropílico.

- g) Remover el alcohol isopropílico cuando polimerice el gel.
- h) Preparar el gel superior (condensador).

Para una placa:

3.75 ml	Tris 0.25 M, pH 6.8
9.6 ml	Agua bidestilada
1.5 ml	Stock de acrilamida/Bis

Desgasificar 5 minutos. Añadir lo siguiente a lo anterior y usar inmediatamente.

150 $\mu$ l	SDS al 10%
150 $\mu$ l	Persulfato de amonio (75 mg/ml)
10 $\mu$ l	TEMED

- i) Con una pipeta serológica de 10 ml, poner el gel superior o condensador, en la misma forma que el gel inferior.

rior o separador, hasta alcanzar aproximadamente el principio de la banda blanca horizontal que se encuentra en la cámara, de electroforesis vertical, marca - Gelman.

Colocar inmediatamente el peine entre las dos placas de vidrio, introduciéndolo en posición inclinada.

- j) Preparar el buffer de corrida, mientras el gel polimeriza.
- k) Cuando el gel haya polimerizado, desmontar las bases sujetas a la cámara con tornillos y colocar dicha cámara en la cámara mayor, en un lugar nivelado.
- l) Vertir el buffer de corrida hasta cubrir completamente el gel condensador. Retirar el peine en posición inclinada, cuidadosamente.
- m) Vertir el buffer de corrida en la cámara grande hasta que rebase en 1 cm el borde inferior de las placas de vidrio.

### 3.8.3. Preparación de muestras

- a) Agregar a la muestra problema, una cantidad de solvente que guarde relación solvente/muestra de 1:5.



Para los marcadores de peso molecular se utilizan 2  $\mu$ l de solución de marcadores + 50  $\mu$ l de buffer de muestra.

- b) Para muestras reducidas, agregar 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercapto-etanol o 10  $\mu$ l de ditiotreitól 0.1 M, por cada 10  $\mu$ l de muestra.
- c) Poner las muestras en agua hirviendo durante 2 minutos.
- d) Aplicar las muestras en el gel.

#### 3.8.4. Corrida

- a) Retirar las burbujas que se encuentran en el borde inferior.
- b) Tapar la cámara mayor.
- c) Conectar la cámara a la fuente de poder.
- d) Ajustar la corriente de la fuente de poder, usando 1.5 amp, por cada carril que tenga el gel, o bien, 25 V toda la noche.
- e) Encender la fuente de poder.
- f) Procurar que durante la corrida no haya burbujas.

### 3.9. Tinción de geles de poliacrilamida.

#### 3.9.1. Con azul de Coomassie.

Reactivo.

Pesar 2 g de azul de coomassie y disolver en 1000 ml de metanol al 50%.

Agregar 70 ml de ácido acético concentrado, a la solución anterior.

Filtrar por papel filtro, directamente en una botella de reactivo.

Tinción.

Dejar tefir el gel durante 1 hora con agitación constante.

Para destefir usar ácido acético al 7%-Metanol al 30%.

#### 3.9.2. Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida con nitrato de plata (Wray et al., 1981).

Este método es sensible a proteínas a nivel de nanogramos. Puede usarse antes o después de la tinción con azul de Coomassie.

### 3.9.2.1. Procedimiento

a) Poner el gel en metanol al 50%, cuando menos 24 horas antes de teñir, con dos cambios (cuando menos). Entre estos cambios lavar al menos una vez con agua bidestilada durante 2 horas (con 2 - 3 cambios).

b) Preparar la tinción. Solución C.

Solución A: Disolver 0.8 g de  $\text{Ag NO}_3$  en 4 ml de agua bidestilada.

Solución B: Mezclar 21 ml de hidróxido de sodio al 0.36% y 1.4 ml de amoníaco líquido al 25%.

Solución C: Agregar la solución A a gotas a la solución B con agitación constante. Llevar a 100 ml con agua bidestilada. La solución C debe ser usada antes de 5 minutos.

c) Teñir el gel en la solución C, por 20 minutos con agitación constante y suave.

- d) Lavar el gel con agua bidestilada con la misma agita  
ción usada en el paso anterior, por 5 minutos.
- e) Preparar el revelador, Solución D.

Solución D: Mezclar 2.5 ml de ácido cítrico al 1% y  
0.25 ml de formaldehído al 38%, llevar a  
500 ml con agua destilada. La solución  
debe ser fresca.

- f) Desarrollar la tinción sumergiendo el gel en solución  
D, hasta que aparezcan las bandas. Las bandas apare  
cen generalmente en menos de 10 minutos y rara vez  
en más de 15 minutos.
- g) Lavar el gel con agua bidestilada y poner el gel en  
ácido acético al 1%, para detener el desarrollo de la  
tinción.
- h) Si las bandas de proteínas se ponen muy oscuras, o el  
fondo obscurece mucho, se puede destefir el gel usando Kodak Fix.

### 3.10. Preparación del conjugado peroxidasa - IgG de conejo anti - IgG de ovino.

### 3.10.1. Preparación de anticuerpos.

#### a) Preparación de IgG de ovino.

Se precipitaron las  $\gamma$ -globulinas de ovino a partir de suero, con solución saturada de sulfato de amonio al 50%, siguiendo la técnica descrita por Bautista y Morilla, 1981. Después de equilibrar la muestra con amortiguador de fosfatos 0.03 M, pH 7.6 y determinar su contenido de proteína, se aplicó en una columna de DEAE-celulosa (2.0 x 30 cm) equilibrada con el mismo amortiguador. Se midió la absorbancia de los eluatos, a 280 nm. Las fracciones con absorbancia mayor que 1.0 se reunieron y se concentraron.

#### b) Preparación de IgG de conejo anti IgG de ovino.

Con la IgG de ovino del inciso anterior, se inmunizaron conejos, siguiendo el esquema de inmunización marcado por Bautista y Morilla, 1981.

La IgG fue separada del suero de conejo hiperinmune, de manera similar al descrito en el inciso a), solamente que el buffer de la columna fue de fosfato 0.02 M, pH 7.2. Se obtuvieron 77 mg/ml IgG conejo-anti-IgG-ovino y se ajustó a 5.0 mg/ml para conjugación.

3.10.2. Determinación de la actividad de peroxidasa  
(Sigma Chem. Co. Assay data sheet).

Se utilizó la peroxidasa tipo VI lote 23 F-9580 de Sigma, marcada con una actividad de 275 Unidades/mg sólido. Sin embargo fue necesario verificar esta actividad.

a) Se preparó la reacción siguiente a 20°C.

2.0 ml pirogalol al 5% (preparada recientemente en agua)

1.0 ml H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>, 0.147 M (preparada recientemente diluyendo 1.67 ml de H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> al 30% en 100 ml de agua)

2.0 ml amortiguador de fosfatos pH 6.0, 0.1 M 14.0 ml de agua.

b) Se añadió 1 ml de solución de peroxidasa que contenía 0.0222 mg enzima/ml (equivalente a 6 unidades de purpurogalina/ml fosfatos 0.1 M, pH 6.0).

c) Después de 20 segundos exactos a 20°C se añadió un ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N para detener la reacción.

- d) Se extrajo 5 veces con porciones de 10 ml de éter.  
Se diluyen los extractos etéreos combinados a 100 ml con éter.
- e) Se anotó la densidad óptica (D.0) en el espectrofotómetro a 420 nm, usando éter como referencia. El proceso descrito en los incisos a) a e) fué repetido 4 veces. La D.0 promedio fué de 0.053.

- f) Se calculó la actividad con la fórmula.

$$\text{mg purpurogalina/100 ml éter} = \frac{D.0.420 \times 8.5}{1 \text{ cm}}$$

Trayectoria de la luz  
en cm.

$$\text{mg purpurogalina/100 ml éter} = \frac{.053 \times 8.5}{1 \text{ cm}} = 0.4505$$

1 cm

- g) Unidades por ml de solución de peroxidasa = mg de purpurogalina/100 ml éter.

$$\text{Unidades por mg} = \frac{\text{Unidades por ml de sol de peroxidasa}}{\text{mg de peroxidasa por ml (paso b)}}$$

$$\text{Unidades por mg} = \frac{4.4505 \text{ unidades por ml}}{20.29 \text{ Unidades}} = 0.0222 \text{ mg peroxidasa/por mg.}$$

ml

La actividad de la enzima bajó 13 veces.

3.10.3. Preparación del conjugado con peroxidasa (Avrameas 1972; Kuhlmann et al., 1974).

- a) Disolver 10 mg de peroxidasa en 0.2 ml de solución de glutaraldehído al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.8.
- b) Dejar la preparación por 18 horas a temperatura ambiente.
- c) Filtrar por Sephadex G 25 (columna de 0.9 x 30 cm) equilibrada con Na Cl 0.15 M. Las fracciones con coloración café, que contienen la peroxidasa, se juntan y si es necesario se concentran a 1 ml.
- d) Añadir a la solución de peroxidasa, 1 ml con 5 mg de Ig G, previamente dializado contra Na Cl 0.15 M.
- e) Añadir 0.1 ml de buffer de carbonato - bicarbonato 1 M, pH 9.5.
- f) Incubar 24 horas a 4°C.
- g) Añadir 0.1 ml de solución de lisina 1 M, pH 7.0. Dejar reaccionar por 2 horas.



h) Dializar contra PBS.

i) Filtrar por Millipore de  $0.2 \mu$ .

j) Añadir el 50% del volumen de glicerol.

k) Envasar en pequeñas cantidades. Mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3.10.4. Titulación del conjugado por la técnica de Dot  
ELISA (Pappas et al., 1983,1984).

3.10.4.1. Soluciones:

a) TBS (sol. salina amortiguada con trietanolamina) pH  
7.5.

7.5 g	Na Cl
2.8 ml	$\text{N}(\text{CH}_2 \text{CH}_2 \text{OH})_3$
17.0 ml	H Cl 1 N
0.1 g	$\text{Mg Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
0.02 g	$\text{Ca Cl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
Agua destilada c.b.p 1000 ml.	

b) BSA al 5% en TBS pH 7.5.

c) Tween 20 al 0.05%.

- d) Suero ovino cuyo contenido de protefina sea conocido.
- e) Sustrato de la enzima. Disolver 5 mg. de diaminobenzidina tetracloruro en 10 ml de TBS, añadir 0.1 ml de  $H_2O_2$  al 3%.

#### 3.10.4.2. Técnica.

- a) Se cortaron círculos de 0.5 cm de diámetro, de papel de nitrocelulosa (Millipore de  $0.22\mu$ ).
- b) Se colocó en cada disco  $1\mu$ l de suero ovino diluido 1:100, para tener entre 0.1-1 mg/ml.
- c) Se secó el papel para estabilizar la unión, en estufa a  $56^\circ C$ , 30 minutos.
- d) Se dejó que el papel llegara a temperatura ambiente. Se guardó a  $-20^\circ C$ , así pudo almacenarse unas 2 semanas.
- e) Al llegar a temperatura ambiente, se colocaron los discos en una placa de microtitulación de fondo plano.

- f) Se probaron 2 bloqueadores distintos: BSA al 5% en TBS y Tween 20 al 0.05% en TBS. Se añadieron 150  $\mu$ l de sol. bloqueadora/pozo. Se dejó agitando 15 minutos.
- g) Se aspiró la solución de bloqueo.
- h) Se hicieron diluciones dobles de conjugado en sol. bloqueadora. Se añadieron 150  $\mu$ l de dilución en cada pozo. Se agitó a temperatura ambiente por 1 hora.
- i) Se lavó en 3 cambios de Tween 20 al 0.05% en TBS, con agitación. La última lavada se dejó 10 minutos antes de aspirarse.
- j) Desarrollo de color con diaminobenzidina. Se añadieron 150  $\mu$ l del sustrato por pozo. Se deja reaccionar 30 minutos y se lava con TBS primero y después con  $H_2O$ . Se deja secar y se almacena en la oscuridad.
- k) Se obtuvieron mejores resultados con el Tween 20 al 0.05% en TBS, como bloqueador. Como título del conjugado se consideró como la última dilución en que se observa mancha café en el disco de papel. Debido a la baja actividad enzimática, se obtuvieron títulos bajos (1:160) en los conjugados preparados.

3.11. Inmunoelectrotransferencia (IET) (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981).

3.11.1. Materiales.

- a) Cámara para destinción electroforética y fuente de poder (Bio Rad Laboratories Modelo 1 200 A).
- b) Papel de nitrocelulosa (PNC) (S & S, BA 85 R 597), con tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m. Papel Whatman.
- c) Caja de lavado, con carriles de 1.4 x 15 cm, para acomodar tubos de ensayo.
- d) Ligando detector: conjugado de peroxidasa - IgG de conejo anti IgG de ovino.
- e) Soluciones amortiguadoras.

Para transferencia: 25 m M Tris, 192 m M glicina, metanol (20% v/v), pH 8.3. Preparar 2 litros.

Para bloqueo y diluciones. PBS - Tween. PBS pH 7.5 con Tween 20 (0.05% v/v).

f) Revelador. Sustrato de la enzima: diaminobenzidina. Preparado como en la técnica de titulación de conjugado.

3.11.2. Procedimiento para transferir proteínas al papel de nitrocelulosa (PNC).

3.11.2.1. Preparación del gel para eliminar hinchamiento.

a) Detener la electroforesis cuando el colorante usado como marcador llegue a 1 cm por arriba de la base del gel.

b) Incubar el gel en amortiguador de transferencia, durante 2 períodos de 30 minutos.

c) Durante el segundo período anterior, preparar el PNC.

3.11.2.2. Preparación del PNC (utilizar guantes).

a) Cortar el PNC ligeramente mayor que el gel.

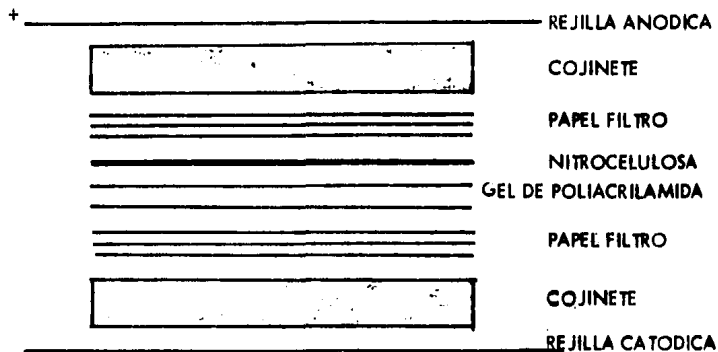
b) Empapar el PNC con agua destilada y dejarlo 5 minutos.

c) Equilibrar el PNC en amortiguador de transferencia por 15 minutos.

### 3.11.2.3. Formación del "emparedado" (Fig. 4).

- a) Humedecer 6 hojas de papel Whatman (del tamaño del gel) en amortiguador de transferencia. En este momento, cortar del gel el carril con los marcadores y teñir con azul de Coomassie y/o nitrato de plata.
- b) Recoger el gel con 3 hojas de papel Whatman.
  - i) Procurar que no haya burbujas entre papel y gel.
  - ii) Colocar la unidad papel-gel sobre una fibra Scotch-Brite, de manera que la fibra quede en contacto con el papel.
- c) Sobre el gel, colocar el PNC (la cara brillante del PNC debe de quedar hacia el papel filtro), evitando el atrapar burbujas.
- d) Completar el emparedado, adosando las otras 3 capas de hojas de papel filtro y enseguida, la segunda fibra de Scotch-Brite, fijar con ligas. Yuxtaponer las rejillas al emparedado.
- e) Colocar el emparedado en la cámara, llena de amortiguador de transferencia. Verificar que el gel esté orientado hacia el cátodo y el PNC hacia el ánodo.

Figura 4



FORMACION DEL EMPAREDADO PARA LA TRANSFERENCIA A NITROCELULOSA  
 BUFFER : TRIS 25 mM, GLICINA 192 mM, METANOL AL 20%, pH 8,3  
 CORRIENTE : 125 mA DURANTE 24 HORAS.

3.11.2.4. Transferencia

Para transferir durante la noche, 10-16 horas, se puede hacer con 125 m A. En períodos menores de 6 horas con 220 m A.

3.11.2.5. Emascaramiento de sitios de unión de proteínas en el PNC (Batteliger et al., 1982).

- a) Incubar el PNC en PBS-Tween (bloqueador) a 37°C por 1 hora, haciendo un cambio de solución a los 30 minutos.
- b) Cortar el PNC en tiras de 0,5 cm. Conservar en refrigeración en la solución bloqueadora.
- c) Cortar un pedazo de PNC y tñirlo con negro de amido, para ver cómo se efectuó la transferencia. También tñir el gel con azul de Coomassie.

3.11.3. Detección inmunológica de las proteínas transferidas.

- a) Dilución apropiada del primer ligando (ya sea suero de ovino infectado o control), aproximadamente 1:75 en amortiguador de PBS-Tween.



- b) Incubar las tiras de PNC con el primer ligando, durante 90 minutos a 22°C, manteniendo la caja en agitación constante o por la noche a 4°C.
- c) Lavar las tiras de PNC cuatro veces con PBS-Tween (20 minutos cada uno).
- d) Incubar las tiras de PNC (a 22°C por 1 hora) con el segundo anticuerpo peroxidasa-IgG de conejo-anti IgG de ovino diluida 1:150 en PBS-Tween, con agitación constante, o toda la noche a 4°C.
- e) Lavar cuatro veces con PBS-Tween (20 minutos cada uno) o durante la noche a 4°C con 3 cambios.
- f) Finalmente secar las tiras en papel filtro y adicionar el sustrato de la enzima. Se agregan 2 ml de solución de sustrato a cada tira.

Desarrollar el color por 10-20 minutos. Lavar con agua destilada. Secar en papel filtro. Guardar protegiendo de la luz para evitar que se borren.

#### 3.11.4. Tinción para papel de nitrocelulosa.

## a) Preparación del negro de amido.

Negro de amido	0.1%
Metanol	5.0%
Acido acético	10.0%

## b) Tinción.

Tefir en esta solución 5 minutos. Enjuagar con una solución de metanol al 5% - ácido acético al 10%, durante 10-15 minutos. Lavar con agua.

#### **4. Resultados**

#### 4.1. Caracterización antigénica del AS y AM de Fasciola hepatica adulta.

El AS que se utilizó en este trabajo tuvo un contenido de proteína de 22 mg/ml. El AM contenía 3.1 mg/ml de proteína.

El perfil antigénico del AS y AM fué obtenido por inmunoelectroforesis (IEF) y por inmunoelectroforesis cruzada (IEC), con sueros hiperinmunes de ovino contra estos antígenos. El AS mostró 6 líneas de precipitación en IEF con el suero de ovino anti-AS, en tanto que con el suero de ovino anti-AM, pudieron observarse 9 líneas (Fig. 5 A y B). Esto contrasta con lo obtenido con el AM, que con el suero de ovino anti-AS formó únicamente 3 líneas de precipitación, pero con el antisuero anti-AM, pudieron detectarse 10 líneas de precipitación (Fig. 5 A y B).

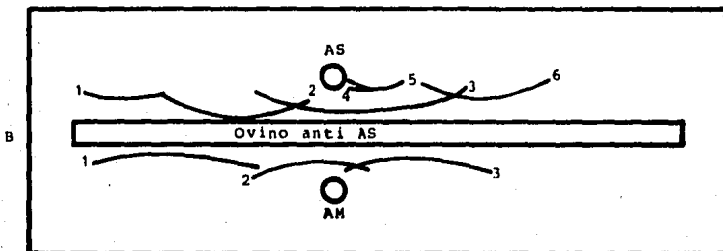
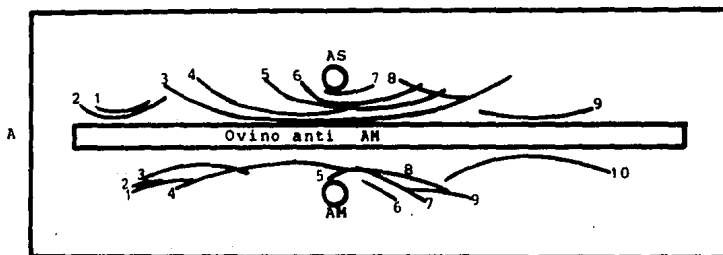
Las concentraciones de antígeno y antisuero con que se trabajó la IEC fueron determinadas por electroinmuno difusión (EID) de Laurell (Fig. 6). Para AM, se probaron las diluciones 1:5 (0.6 mg/ml de proteína y 1:2 (1.5 mg/ml). Para AS, se ensayaron las diluciones 1:5 (4.4 mg/ml), 1:10 (2.2 mg/ml, 1:20 (1.1 mg/ml y 1:40 (0.58 mg/ml). Las diluciones de antisuero para

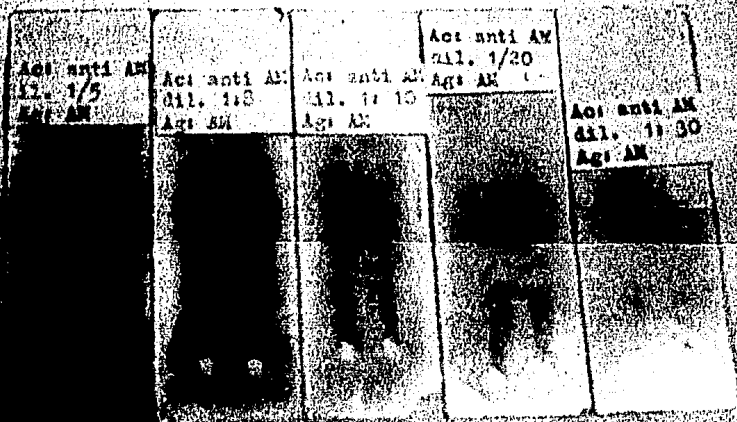
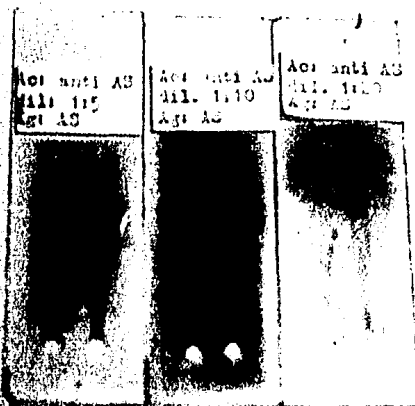
Figura 5

Inmunolectroforesis de los antígenos somático (AS) y metabólico (AM) de Fasciola hepatica.

A: Suero de ovino hiperinmune anti-AM

B: Suero de ovino hiperinmune anti-AS





anti-AS y anti-AM fueron 1:5, 1:10, 1:20 y 1:30. Las concentraciones óptimas para AS fueron: antígeno 1:10 y anticuerpo 1:10. Para AM, antígeno 1:2 y anticuerpo 1:10.

Los resultados de IEC se muestran en las figuras 7 y 8. El AS presentó líneas de precipitación con el suero ovino anti AS y 20 líneas de precipitación con el suero anti-AM, por otra parte, con el AM se pudieron observar 20 líneas con el anti-AM y 13 con anti-AS.

Por otro lado, la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), permitió obtener una imagen mas completa del espectro antigénico, ya que se pudo determinar el número de componentes presentes en el AS y AM. El peso molecular de cada componente, se obtuvo al interpolar la distancia recorrida por cada uno de ellos en una curva estándar en la cual, se grafican las distancias recorridas por marcadores proteínicos de peso molecular conocido, contra el logaritmo del peso molecular (Fig. 9 y 10).

En la figura 11 se muestran los patrones electroforéticos en PAGE, obtenidos con el AS y AM. Es importante considerar la sensibilidad del método de tinción de

IMUNOELECTROFORESIS CRUZADA

Ag. AM de Fasciola hepatica

Act. Ovíno hiperimmune anti AM

IMUNOELECTROFORESIS CRUZADA

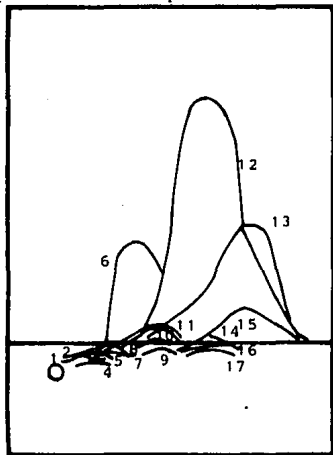
Ag. AM de Fasciola hepatica

Act. Ovíno hiperimmune anti AM

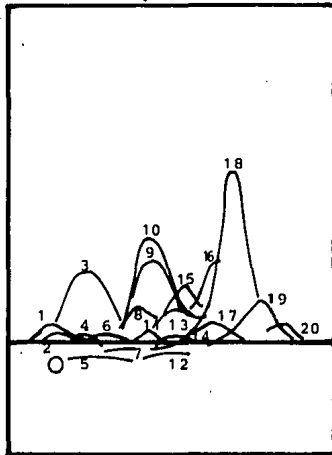


Inmunolectroforesis cruzada con los antígenos de Fasciola hepatica y antisueros de ovino. (esquema).

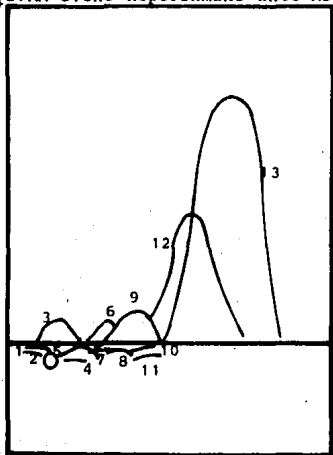
+ A: AS-ovino hiperinmune anti AS



+ B: AM-ovino hiperinmune anti AM



+ C: AN-ovino hiperinmune anti AS



+ D: AS-ovino hiperinmune anti AM

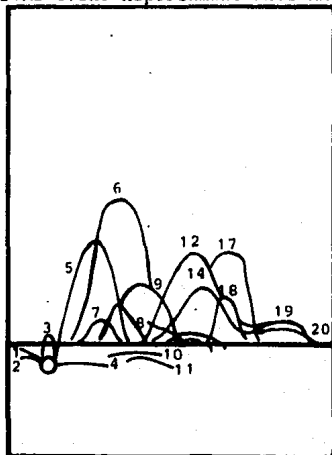


FIGURA 9  
CURVA ESTANDAR PARA DETERMINACION DE PESO MOLECULAR DEL AS  
POR ELECTROFORESIS EN CEL DE POLIACRILAMIDA

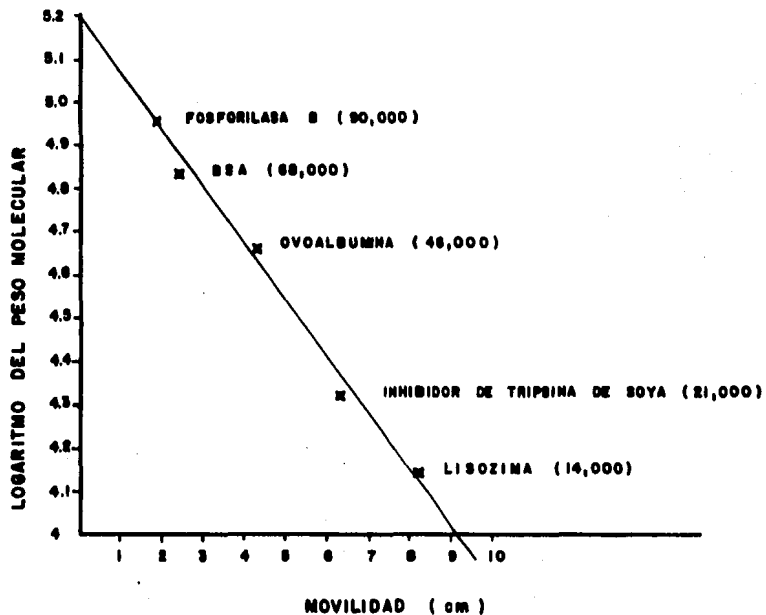
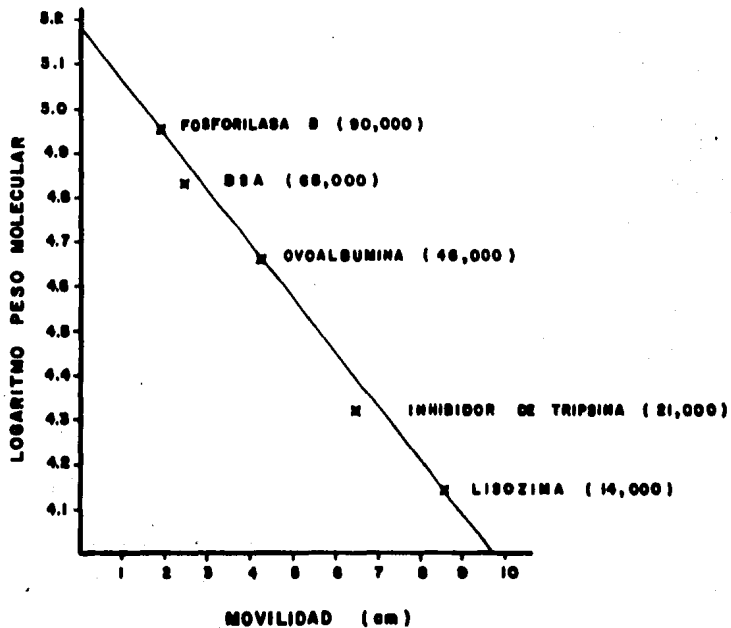


FIGURA 10  
CURVA ESTANDAR PARA DETERMINACION DE PESO MOLECULAR DEL AM  
POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA



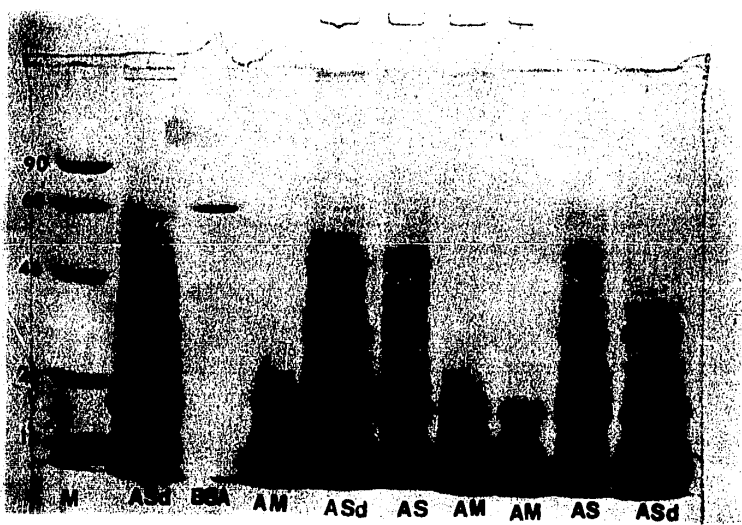
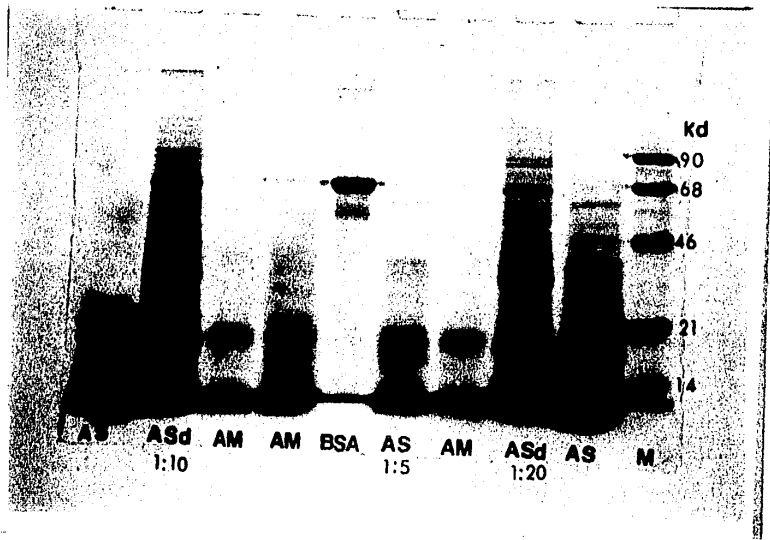


Figura 11. Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida obtenidos con los antígenos (AS y AM) de Fasciola hepatica. AS: antígeno somático; ASd antígeno somático deslipidizado; AM: antígeno metabólico; BSA: albúmina sérica bovina; M: Marcadores de peso molecular.

geles, que se efectúe para identificar las bandas. En la figura 12 se encuentra que con la tinción azul de Coomassie, se detectaron un total de 29 bandas en el AS, pero cuando la tinción se efectuó con nitrato de plata, que es sensible a nanogramos de proteína, fue posible observar 48 bandas. Las bandas más abundantes y comunes son las que tienen pesos moleculares de 97, 85, 55, 52, 31-32, 25-26, 21, 20 y 13 Kd.

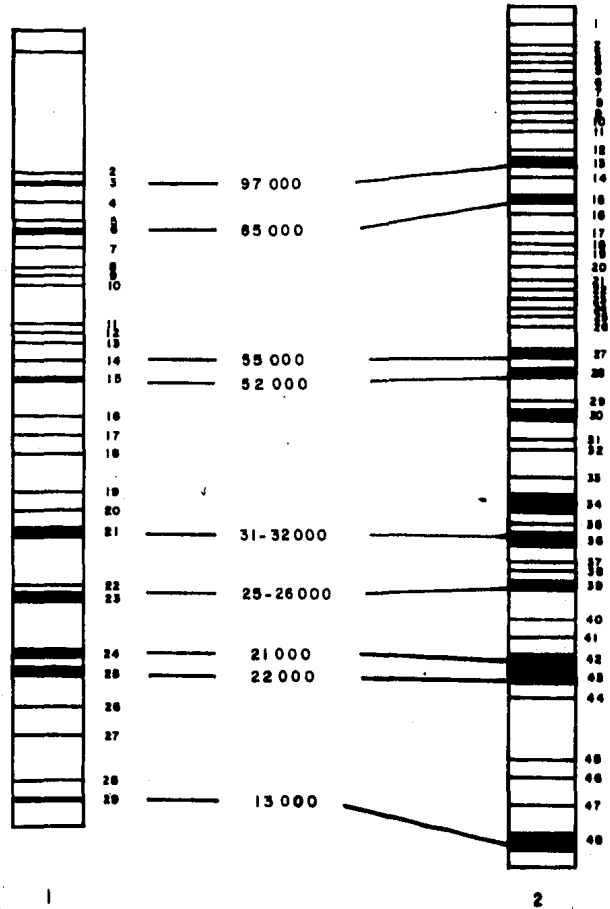
En la figura 13 se encuentran esquemas de los resultados obtenidos con el AM en PAGE. Al tefir con azul de Comasie, es posible contar 21 bandas con impregnación argéntica este número se eleva a 23 bandas. Es notorio que en la zona de alto peso molecular, aparece una banda única de peso molecular de 135 kd; aparentemente los componentes del AM, poseen pesos moleculares menores a 81 Kd. Las bandas más abundantes y comunes corresponden a aquellas con pesos moleculares de 54, 48-49, 32-34, 24-25, 20-21 y 14 Kd.

Por inmunoelectrotransferencia (IET), se encontró que de los 48 componentes del AS, el animal hiperinmune anti-AS reconoció 28, en tanto que de los 23 componentes del AM, el ovino hiperinmune anti-AM detectó 19 (Fig.14).

FIGURA 12

ESPECTRO ANTIGENICO DEL AS DETERMINADO POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

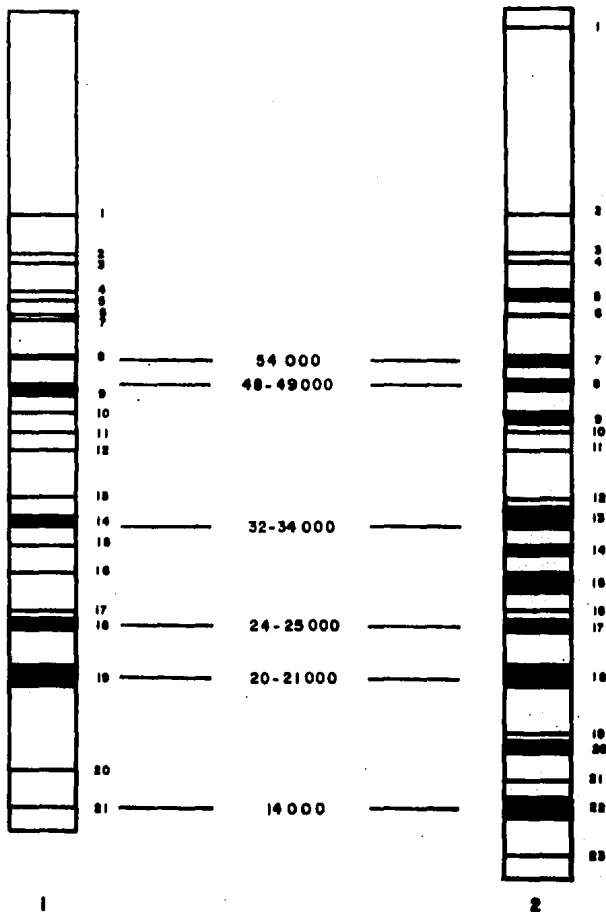
BANDAS MAS ABUNDANTES Y COMUNES (DALTONS)



1: TINCION CON AZUL DE COOMASIE  
2: TINCION CON NITRATO DE PLATA

ESPECTRO ANTIGENICO DEL AM DETERMINADO POR ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

BANDAS MAS ABUNDANTES Y COMUNES (DALTONS)

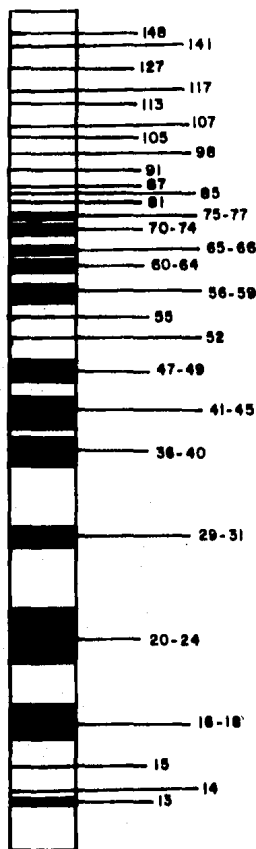


1: TINCION CON AZUL DE COOMASIE  
 2: TINCION CON NITRATO DE PLATA

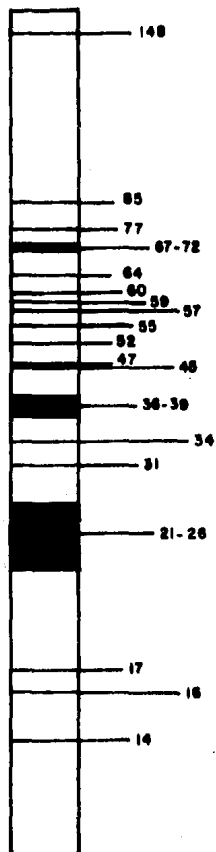
**FIGURA 14**  
**BANDAS RECONOCIDAS POR OVINOS HIPERINMUNES ANTIA S Y ANTI-AM**  
**EN LA PRUEBA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA**

p.m. (kd)

p.m. (kd)



**IET: AS / ANTI AS**  
**SE RECONOCEN 20 BANDAS**



**IET: AM / ANTI AM**  
**SE RECONOCEN 19 BANDAS**



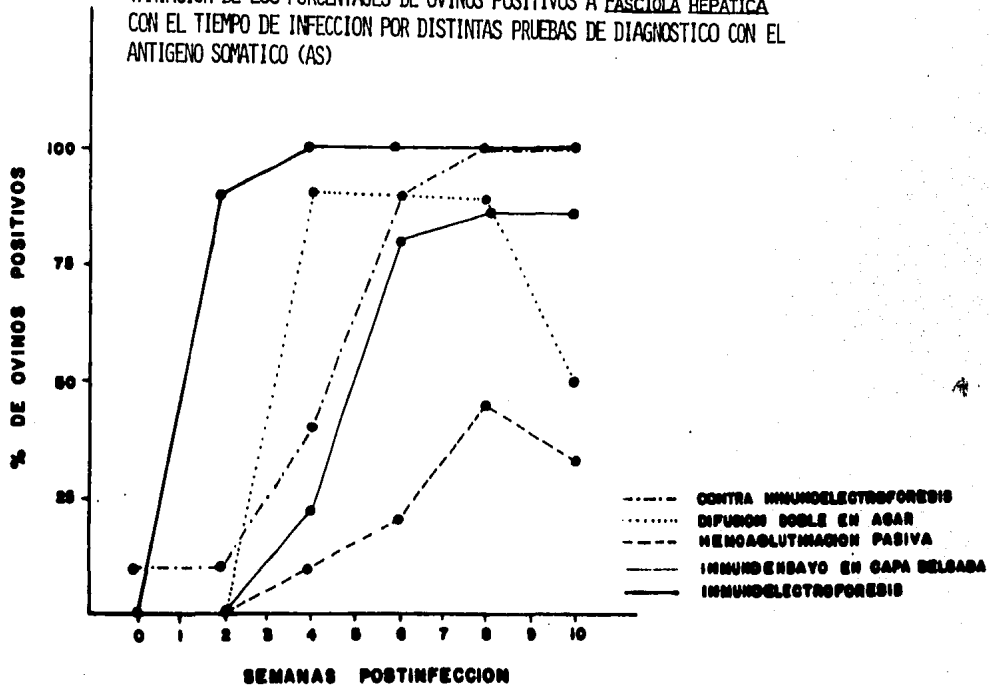
4.2. Desarrollo de la respuesta inmune en ovinos hacia el AS y AM de Fasciola hepatica, medida por distintas pruebas serológicas.

Para estudiar el desarrollo de la respuesta inmune se infectaron 10 borregos con 200 metacercarias cada uno, 5 ovinos se dejaron como testigos sin infectar. Por medio del exámen coproparasitoscópico, se comprobó que los animales infectados empezaron a excretar huevecillos, en la décima semana postinfección (p.i.); 2 animales excretaron huevecillos desde la octava semana p.i. y un borrego no excretó huevecillos.

En la figura 15 se muestra la variación con el tiempo de infección del porcentaje de ovinos positivos a Fasciola hepatica en distintas pruebas serológicas, al utilizar AS. Con la prueba de inmunoensayo en capa delgada (ICD), hubo 90% de animales positivos a partir de la segunda semana p.i., este porcentaje se elevó a 100% a partir de la cuarta semana p.i. La contraelectroforesis (CIE), detectó 40% de positivos en la semana 4, este porcentaje ascendió hasta llegar a 100% en la semana 8. Con la prueba de difusión doble (DD) se obtuvo 90% de positivos en la semana 4, este porcentaje se mantuvo hasta la semana 8 y después disminuyó a 50% en la semana 10.

FIG. 15

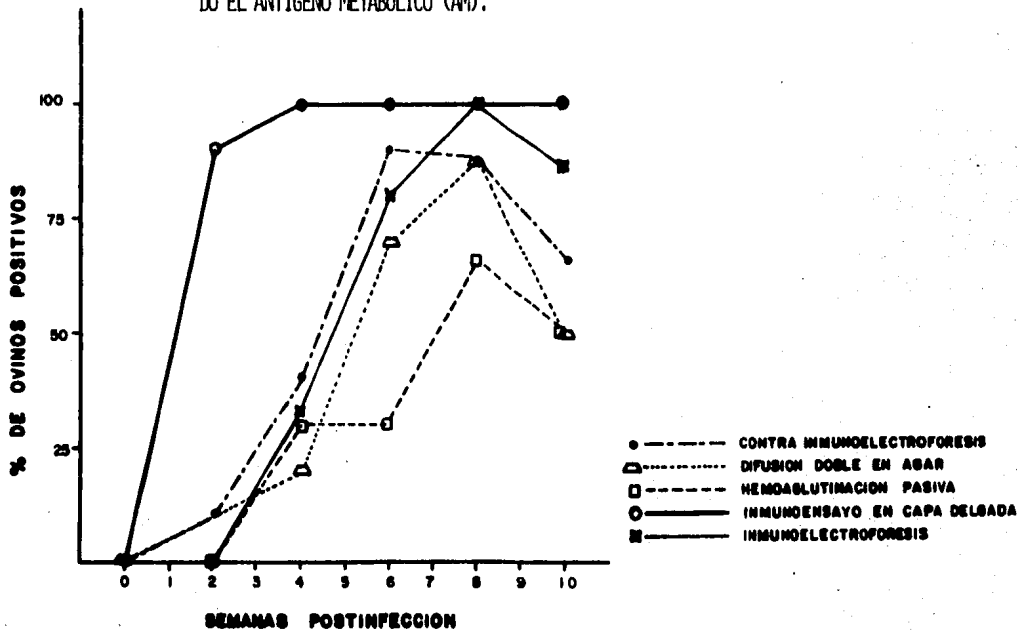
VARIACION DE LOS PORCENTAJES DE OVINOS POSITIVOS A *FASCIOLOSA HEPATICA* CON EL TIEMPO DE INFECCION POR DISTINTAS PRUEBAS DE DIAGNOSTICO CON EL ANTIGENO SOMATICO (AS)



Por hemoaglutinación pasiva (HP), se detectó 10% de positivos en la semana 4, este porcentaje se elevó y en la semana 8 alcanzó un máximo de 45% positivos, que en la semana 10 descendió a 33.3% de ovinos positivos. La prueba de inmunolectroforesis (IEF), comenzó a detectar líneas de precipitación con el AS, en el 22% de los animales en la semana 4, en la semana 6, el porcentaje se elevó a 80% y en las semanas 8 y 10 p.i., este porcentaje fué de 85.7%.

Cuando se utilizó AM en la serología, la primera prueba en detectar 90% de ovinos positivos en la semana 2, fué también ICD, el porcentaje ascendió a 100% en la semana 4 y se mantuvo en las semanas siguientes (Fig.16). La técnica de CIE detectó 40% de animales positivos en la semana 4, el porcentaje ascendió a 90% en la semana 6, disminuyó ligeramente en la semana 8 y en la semana 10 se obtuvo 66% de positivos. La prueba de DD, permitió detectar 10% de positivos en la semana 2, los valores fueron ascendiendo hasta llegar a un máximo a las 8 semanas, que baja a 50% en la última semana del experimento. Con la HP se encontró un 30% de positivos en las semanas 4 y 6, el máximo de positividad logrado con esta prueba fué de 65% en la semana 8, el porcentaje desciende a 50%, en la semana 10. Por IEF se comenzaron a detectar animales positivos en la semana 4 (33%), 80% de positivos en la se

FIG. 16  
 VARIACION DE LOS PORCENTAJES DE OVINOS POSITIVOS A *Fasciola hepatica*  
 CON EL TIEMPO DE INFECCION POR DISTINTAS PRUEBAS DE DIAGNOSTICO USAN  
 DO EL ANTIGENO METABOLICO (AM).



mana 6, 100% de positivos en la semana 8 y 86% en la semana 10.

La variación de los títulos de anticuerpos obtenidos con HP, se encuentra en la figura 17. Aunque los títulos en general permanecieron bajos durante todo el experimento, se observa diferencia entre los animales infectados y los testigos a partir de la sexta semana p.i. con AS, y de la segunda semana p.i. con AM. Si se considera positivos únicamente los sueros con títulos de 1:32 o mayores, se observa que ninguno de los animales (infectados o testigos), fué positivo a la prueba cuando se utilizó AS. Con AM 6 de 9 sueros fueron positivos a las 8 semanas p.i.

La figura 18 muestra la variación de los títulos de anticuerpos obtenidos con ICD durante las semanas posteriores a la infección. El comportamiento con ambos antígenos es similar. A partir de la semana 2, se encuentra un marcado aumento de los títulos, los cuales alcanzan valores máximos a partir de la semana 6. En las semanas 8 y 10, se observó diferencia entre los dos antígenos. Con el AM se obtuvieron títulos un poco más elevados que con el AS.

FIG. 17

VARIACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *FASCIOLOA HEPATICA* UTILIZANDO ANTIGENOS SOMATICO (AS) Y METABOLICO (AM).

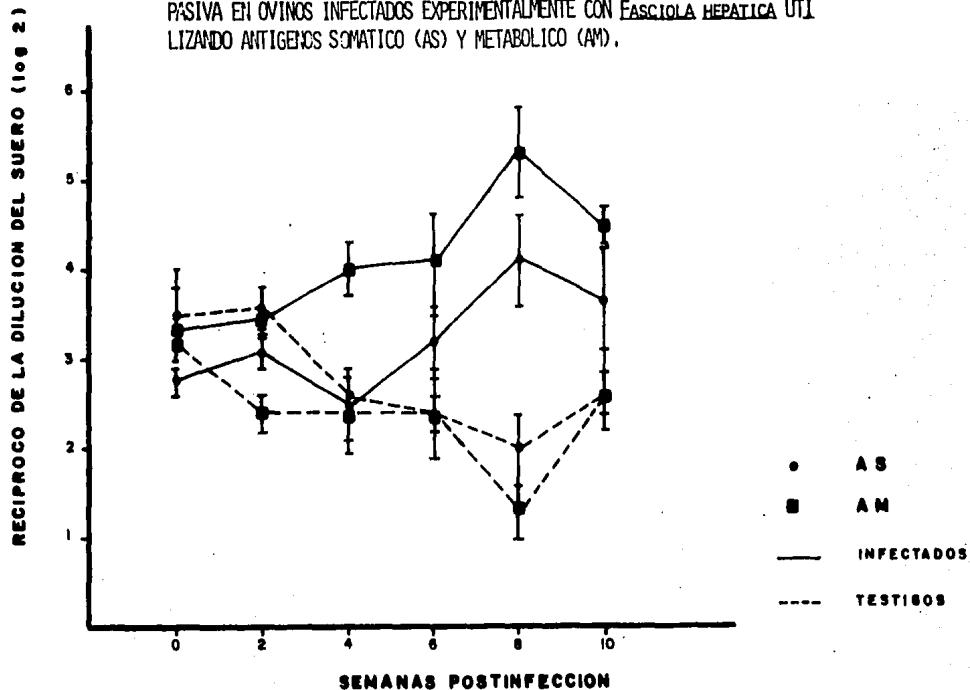
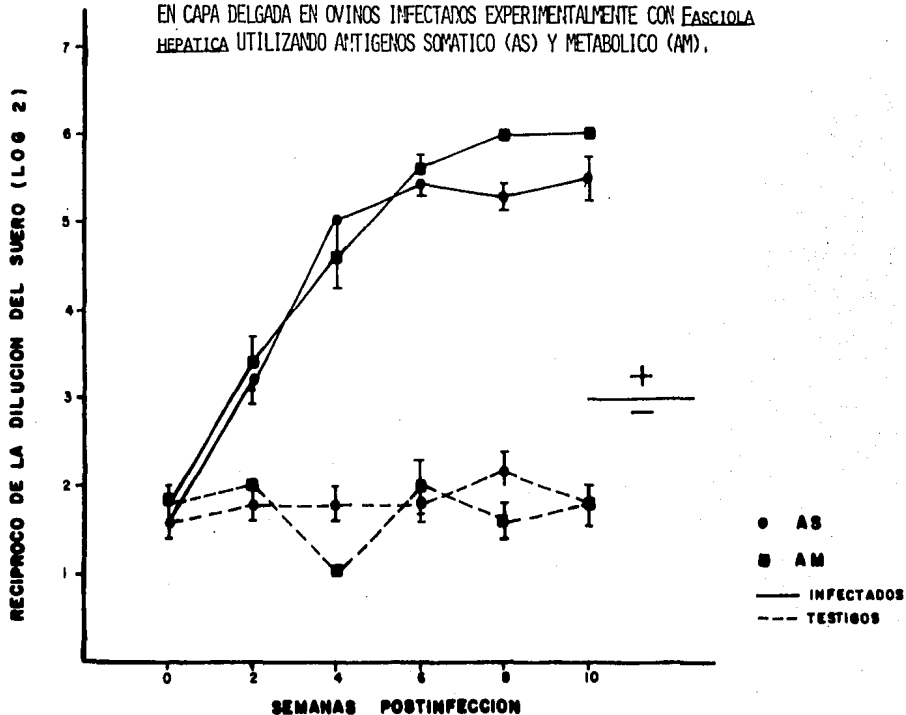


FIG. 13

VARIACION DE LOS TITULOS DE ANTICUERPOS EN LA PRUEBA DE INMUNOENSAYO EN CAPA DELGADA EN OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *FASCIOLA* HEPATICA UTILIZANDO ANTIGENOS SOMATICO (AS) Y METABOLICO (AM).



#### 4.3. Reconocimiento de antígenos de Fasciola hepatica adulta por el ovino durante una infección experimental.

El suero de 10 borregos infectados, así como el de 5 animales testigos sin infectar, tomando a las distintas semanas postinfección, fué evaluado para estudiar el desarrollo del reconocimiento de componentes antigénicos por las pruebas de inmunolectroforesis (IEF) y por inmunolectrotransferencia (IET). Con la IEF esto fue evaluado enumerando las líneas de precipitación que van apareciendo en el transcurso de la infección. En la figura 19, se puede observar que el número de líneas va aumentando con respecto al tiempo con ambos antígenos. No hubo diferencia entre el número de bandas con AS y AM (Fig.19).

En las figuras 20 y 21, se muestran algunos de los patrones de aparición de bandas por IEF durante la infección, con los dos antígenos.

La prueba de IET permitió determinar el número de componentes antigénicos, así como su peso molecular y como van apareciendo los antígenos durante la infección. La figura 22 muestra la dinámica de reconocimiento de los antígenos de Fasciola hepatica, al utilizar la prueba de IET. Al aumentar el total de bandas a las distintas semanas p.i., puede notarse (Fig. 22) que se reconocen más bandas en el AS que en el AM, el número máximo de bandas se encuentra en la semana 8 p.i. (26 con AS y 10 con AM)



FIG. 19

PROMEDIO DEL NUMERO DE LINEAS DE PRECIPITACION OBSERVADA POR IMMUNOELECTROFORESIS EN SUEROS DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON FASCIOLOLA HEPATICA.

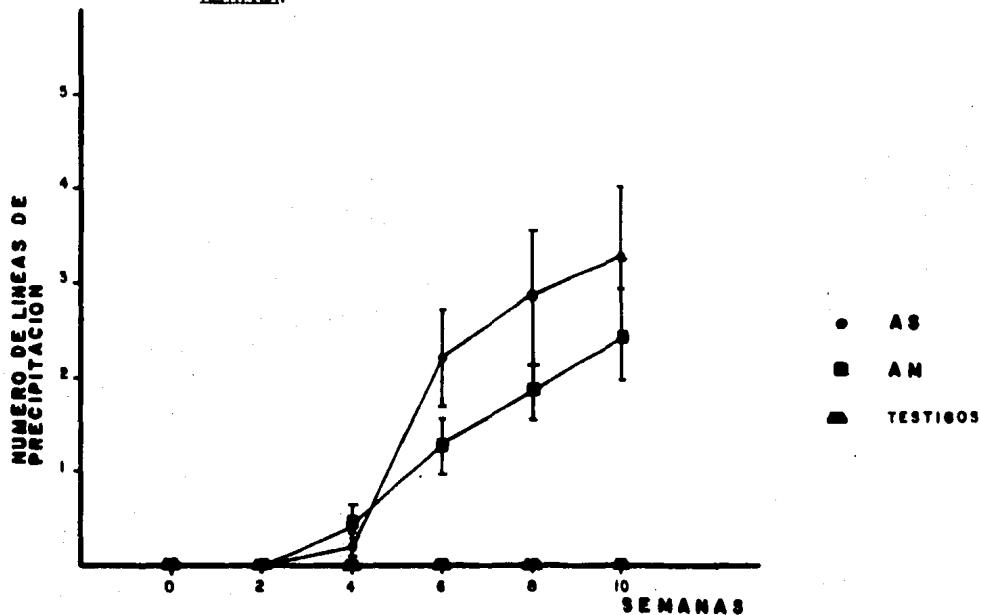


FIGURA 20

Aparición de líneas de precipitación hacia el AS o AM durante una infección experimental por Fasciola hepatica en ovinos (Animal 51)

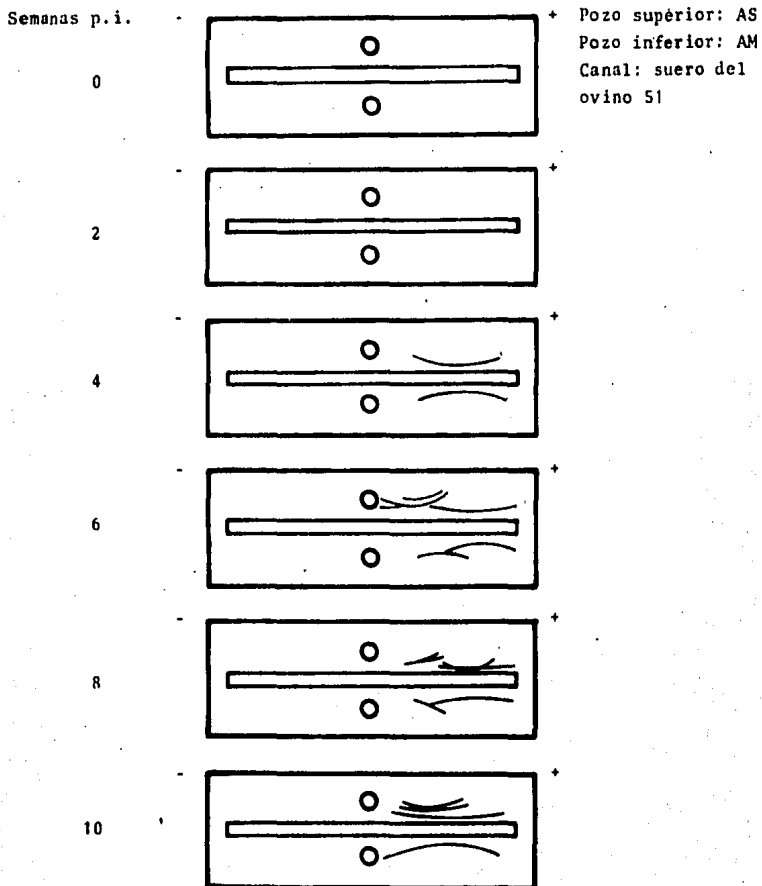


Figura. 21

Aparición de líneas de precipitación hacia el AS o AM durante la infección experimental por E. hepatica en ovinos (animal 32)

Semanas p.i.

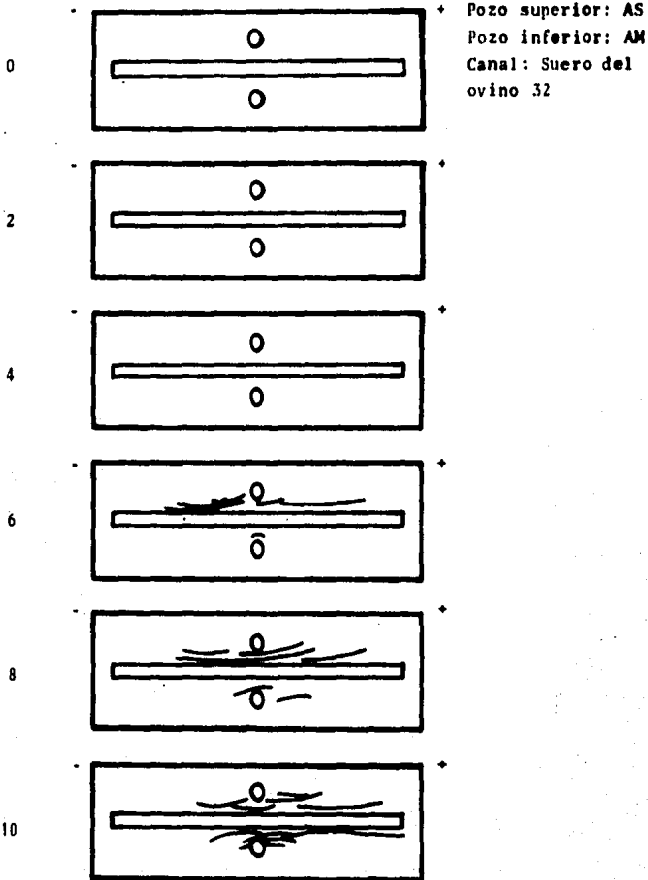
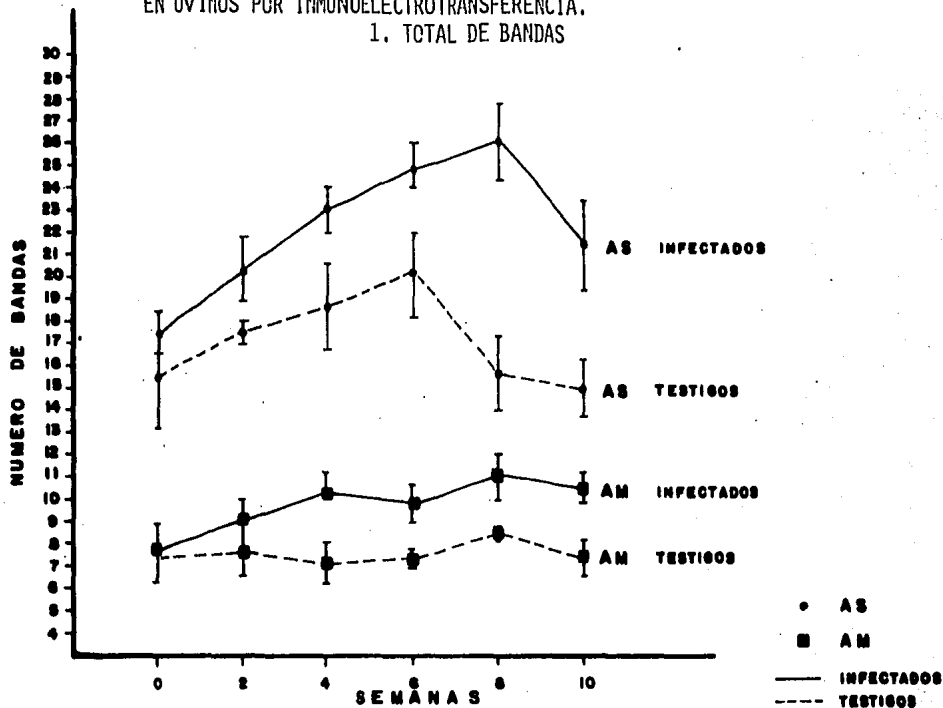


FIG. 22

DINAMICA DE RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS DE FASCIOLA HEPATICA  
EN OVINOS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

1. TOTAL DE BANDAS



con ambos antígenos. Es importante señalar que los ovinos testigos reconocieron un gran número de componentes de ambos antígenos, sin embargo, a partir de la segunda semana p.i., se encuentran diferencias entre infectados y testigos, ya que los primeros reconocen un mayor número de antígenos de los testigos.

Para su estudio las bandas se dividieron de acuerdo a intervalos de peso molecular. El primer intervalo comprendió a las bandas con un peso molecular superior a 90 Kd. Con el AS, es notoria la diferencia en cuanto a número de bandas entre animales testigos e infectados, sobre todo a partir de la semana 6 p.i. La situación con el AM, en donde casi no existen bandas en esta zona, es distinta, y no se observan diferencias entre testigos e infectados (Fig. 23).

El segundo intervalo comprende a aquellas bandas cuyo peso molecular, está entre 46 y 90 KD (Fig. 24). Puede notarse que con el AS no existe una diferencia clara entre ovinos infectados y testigos, en cuanto al número de bandas que pueden reconocer. Con el AM se encuentran diferencias entre infectados y testigos, desde la semana 2 p.i.; los infectados muestran mayor número de bandas que los testigos.

FIG. 23

DINAMICA DE RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS DE FASCIOLA HEPATICA  
 EN OVINOS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA  
 2. BANDAS CON PESO MOLECULAR MAYOR DE 90,000 D

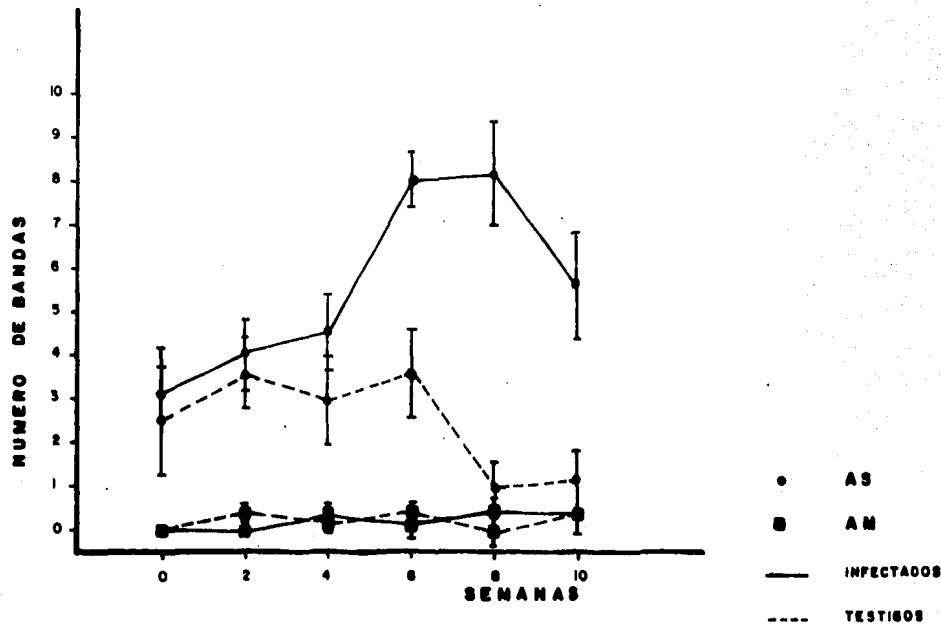
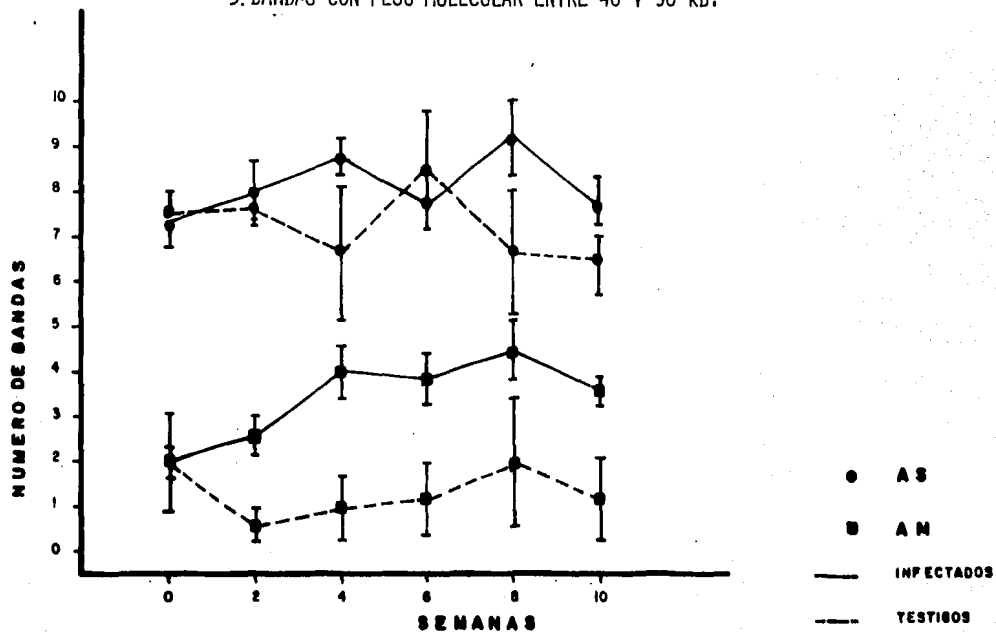


FIG. 24

DINAMICA DE RECONOCIMIENTO DE ANTIGENOS DE FASCIOLA HEPATICA  
 EN OVINOS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

3. BANDAS CON PESO MOLECULAR ENTRE 46 Y 90 KD.



El tercer intervalo correspondió a bandas de peso molecular entre 21 y 46 Kd (Figuras 25 y 26). Con el AS no se pueden detectar diferencias en cuanto a número de bandas reconocidas por ovinos infectados y testigos durante el curso de la infección (Fig. 25). En la figura 26 encontramos el patrón de reconocimiento de bandas en este mismo intervalo de peso molecular, cuando se emplea AM, aquí podemos notar, que aunque no existe una marcada diferencia entre los dos grupos de ovinos, se marca con un asterisco la presencia de una banda de peso molecular entre 23 a 27 Kd, que aumenta de intensidad y grosor con el tiempo. Esta banda comienza a manifestarse claramente a partir de la semana 4 p.i.

El último intervalo correspondió a las bandas cuyo peso molecular era menor de 21 Kd. Cuando la IET fue realizada con AS, se presenta de nuevo la circunstancia siguiente: no existe marcada diferencia entre ovinos infectados y testigos, respecto al número de bandas reconocidas, pero a partir de la semana 4 p.i., una banda de peso molecular entre 20 y 23 Kd aumenta de intensidad y grosor con el tiempo en los animales infectados (Fig. 27). Con el AM no existe diferencia entre los dos grupos de animales (Fig. 28).



FIG. 25

DINAMICA DE RECONOCIMIENTO DEL AS DE *FASCIOLA HEPATICA* EN  
OVINOS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

4. BANDAS CON PESO MOLECULAR ENTRE 21 Y 46 KD

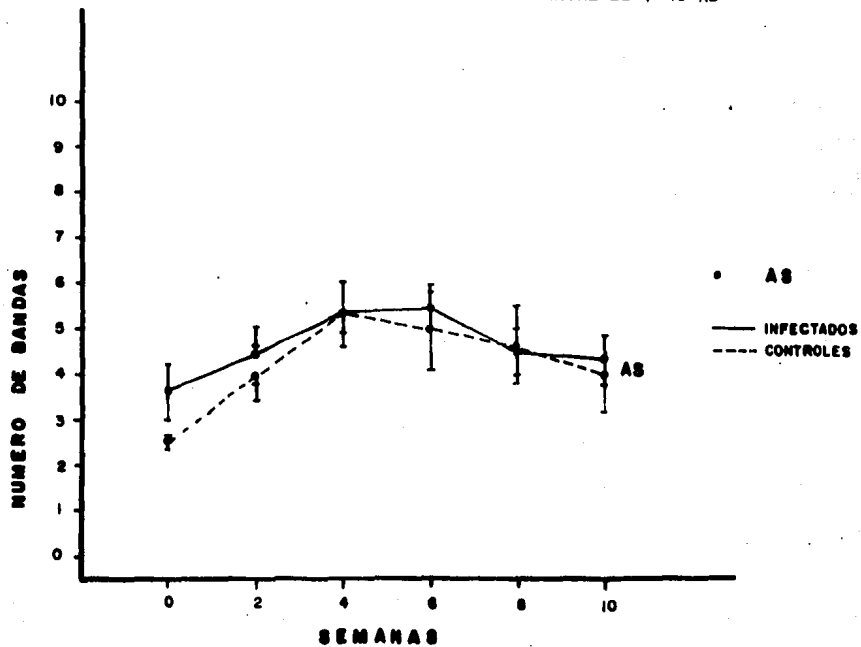


FIG. 26

DINAMICA DE RECONOCIMIENTO DEL AM DE FASCIOLA HEPATICA EN  
 OVINOS POR IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA  
 5. BANDAS CON PESO MOLECULAR ENTRE 21 Y 46 KD.

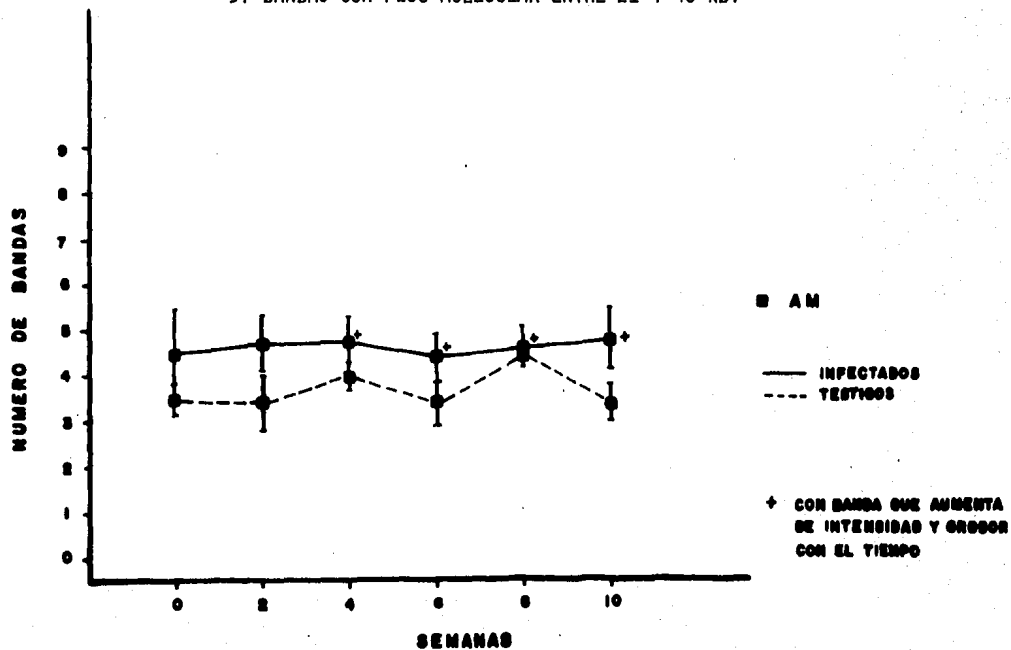


FIG. 27

DINAMICA DE RECONOCIMIENTO DEL AS DE *Fasciola hepatica* EN  
OVINOS POR INMUNOELECTROTRANSFERENCIA  
6. BANDAS CON PESO MOLECULAR MENOR DE 21 kd

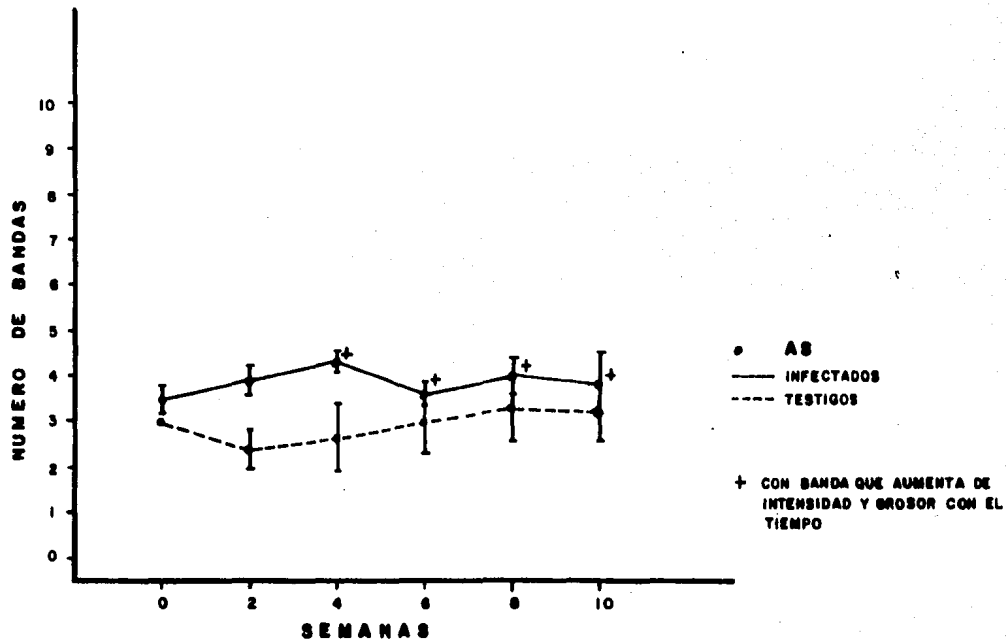
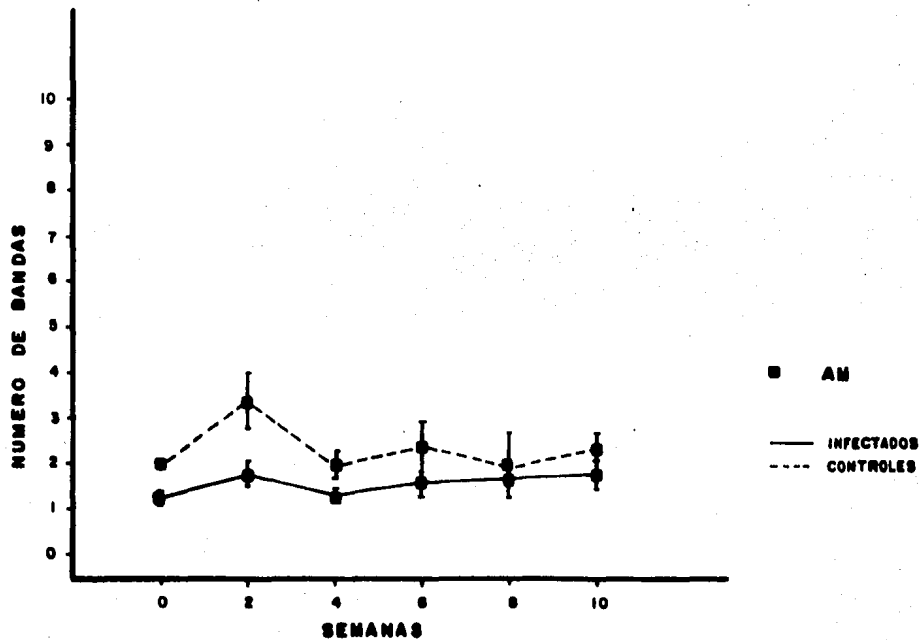


FIG. 28

DINAMICA DEL RECONOCIMIENTO DEL AM DE FASCIOLOA HEPATICA EN  
OVINOS POR IMMUNOELECTROTRANSFERENCIA

7. BANDAS CON PESO MOLECULAR MENOR DE 21 KD

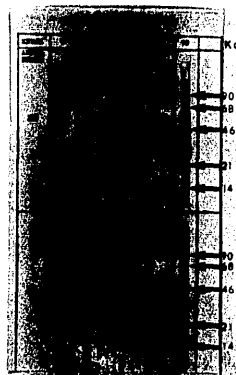
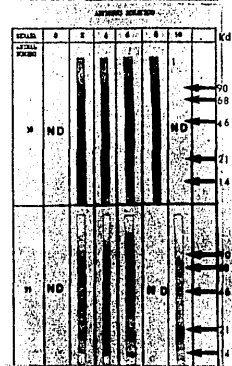
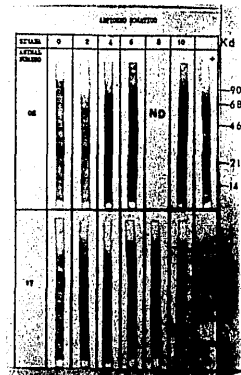


En la serie de fotografías (Fig. 29), se encuentran los resultados de la IET con el AS. Puede observarse en todos los animales infectados, que los antígenos de alto peso molecular (mayor de 120 Kd), comenzaron a ser reconocidos en la semana 4 o 6 p.i. Los antígenos de peso molecular comprendido entre 87 y 115 Kd pueden reconocer se solamente en algunas semanas, es decir aparecen y desaparecen en el transcurso de la infección. Las bandas de 55 a 87 Kd, aumentan en grosor de la semana 0 a la semana 4, posteriormente se hacen tenues. Entre 58-60 Kd se intensifica una banda en la semana 2, en algunos animales. Una banda de 55 Kd aumenta de grosor e intensidad de la semana 2 a la semana 6, posteriormente va disminuyendo. Entre 20 y 23 Kd va apareciendo una zona de bandas que aumenta considerablemente su intensidad y grosor en el curso de la infección.

En los animales testigos, se reconocieron también muchos componentes, pero en general, las bandas fueron mas tenues, aunque hubo algunas bandas que se marcaron fuertemente en forma persistente en la infección. En estos animales no se observó ninguna banda que aumentara de grosor y/o intensidad en la infección.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA CON EL ANTIGENO SOMÁTICO (AS1)

Los números 7, 38, 31, 57, 10, 27, 15, 32, y 34 corresponden a animales infectados. Los números 304, 112, 327, 317 y 332 pertenecen a otros tests.

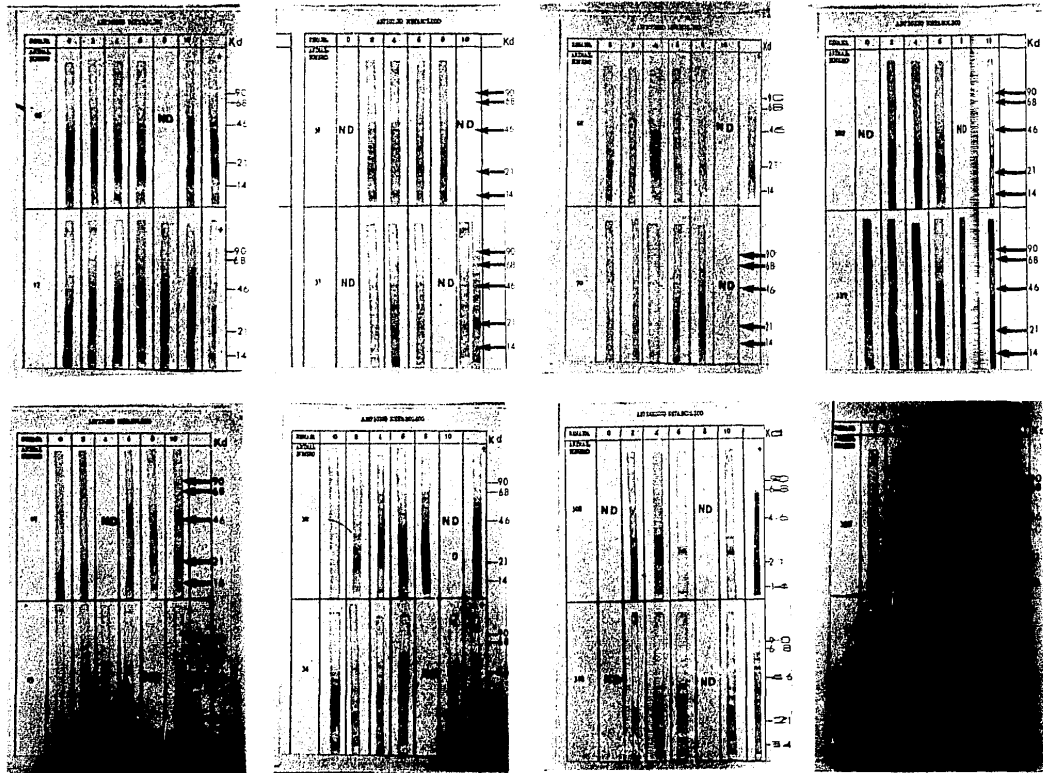


En la serie de fotografías (Fig. 30), se encuentran los resultados de la IET con el AM. Existe gran variabilidad en cuanto al reconocimiento de los diferentes componentes antigénicos entre los distintos animales. Los antígenos de alto peso molecular ( $> 100$  Kd), solamente son reconocidos por dos animales en la semana 4 o 6 p.i. Existen bandas que solo se manifiestan durante las semanas 0 y 2 p.i., generalmente se ubican en la zona de 55-60 Kd. Otros antígenos son reconocidos en la semana 2, 4 o 6 p.i. y se van intensificando con el tiempo (40 DK, 36 Kd, 69 Kd 52 Kd). Otras mas aparecen en la semana 2 y 4 y después desaparecen (64Kd, en el ovino 62, 37 Kd en el animal 38 etc). Algunas aparecen desde antes de infectar y se van diluyendo en el transcurso de la infección. Otras, aparecen en las semanas 8 y 10 como es el caso de antígenos de 57 Kd en el animal 07.

Llama fuertemente la atención que, a pesar de la gran variabilidad entre uno y otro animal, todos los animales infectados presentaron un hecho común: el reconocimiento de una banda que a partir de la semana 2 aumenta de intensidad y grosor, en la zona comprendida entre 23-27 Kd. Los antígenos de bajo peso molecular (15-16 Kd), se reconocen en todos los animales durante la infección, en algunos animales, estas bandas se intensifican en las semanas 8 o 10 p.i.

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNELECTROTRANSFERENCIA CON EL ANTIGENO METABOLICO (148)

Los números 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33 corresponden a sustratos infectados. Los números 34, 35, 36, 37, 38 y 39 corresponden a sustratos testigos.





Los animales testigos, reconocen varias bandas del AM. Hay bandas que permanecen intensas durante todo el experimento, esto es muy evidente en el animal 352. En general, puede decirse que se observan bandas múltiples y tenues, solamente resaltan algunas que permanecen cons tantes. No se observa ninguna banda que aumente de gro sor y/o intensidad durante la infección.

## 5. Discusión

### 5.1. Caracterización antigénica del AS y AM de Fasciola hepatica adulta.

La preparación y uso adecuado de un antígeno satisfactorio es la clave del éxito de cualquier prueba de diagnóstico que detecte anticuerpos hacia un determinado organismo. Fasciola hepatica es un parásito complejo que expone al huésped a un mosaico de antígenos como secreciones glandulares, antígenos superficiales y productos digestivos excretorios. Cada estadio del desarrollo del tremátodo puede tener, por un lado, antigénicidad única, pero también antígenos comunes a todos los estadios del ciclo de vida (Thorpe, 1965; Dodd, 1969; Moore y Halton, 1976; Hanna, 1979, 1980 b; Sandeman y Howell, 1981; Yoshihara, 1981; Reddington et al., 1984), de manera que el aislamiento de los antígenos apropiados se complica enormemente. Por otra parte, no es fácil recuperar todos los estadios del desarrollo del parásito, por lo que en muchos estudios, incluido este trabajo, se escoge la forma adulta del parásito como fuente de los antígenos AS y AM, por ser fácilmente recuperable en cantidades importantes y a bajo costo.

El perfil antigénico de ambos antígenos fue obtenido por inmunoelectroforesis (IEF), inmunoelectroforesis

cruzada (IEC) y por inmunoelectrotransferencia (IET) utilizando sueros hiperinmunes de ovino contra estos antígenos. El AS mostró 6 líneas de precipitación en IEF contra su suero homólogo y con el suero anti-AM formó 9 líneas (figura 5), cabe indicar que el ovino hiperinmune fue inmunizado con el AS en adyuvante completo de Freund, pero posteriormente fue infectado oralmente con metacercarias, de manera que estuvo en contacto también con el AM, de ahí que pueda reconocer un mayor número de componentes en el AM. Una situación similar se presenta con el AM, con el cual el suero ovino anti-AM reconoció 10 líneas de precipitación y con el suero ovino anti-AS, se detectaron 3 arcos de precipitación. Existen líneas comunes a ambos antígenos.

Cuando se utilizó una técnica mas sensible, como es la IEC (figuras 7 y 8), el AS presentó 17 arcos de precipitación con el suero hiperinmune homólogo y 20 arcos con el suero anti-AM. El AM muestra 20 arcos con el suero homólogo y 13 con el suero anti-AS, lo que apoya la hipótesis que el ovino se mantiene en contacto con las excreciones y secreciones del parásito, de ahí que forme mas líneas de precipitación con el AM.

En este punto cabría mencionar que cuando se utilizan sueros hiperinmunes de otras especies, se obtienen resultados distintos. Así al aplicar la prueba de IEF, en el AS se han detectado números distintos de componentes antigénicos, que van de 15, como lo informaron Bi guet et al., (1962), a 21 o 23 como lo determinaron Gun dlach, (1971) y Geyer (1967), respectivamente. También utilizando suero hiperinmune de conejo y AS en la prueba de IEC, Hillyer y Cervoni (1978), se percataron de la presencia de un conjunto complejo de arcos de precipitación, cuyo número era superior a 50.

El número, peso molecular y abundancia relativa de los componentes en ambos antígenos fue determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), quedando manifiesta la alta complejidad de éstos (figuras 11,12 y 13). Se encontró que tiene importancia la sensibilidad de la técnica de tinción que se utilice, ya que con la técnica de impregnación argéntica de Wray et al. (1981) fue posible identificar 48 componentes en el AS, a diferencia de Geyer (1967) quien encontró 30 componentes en el AS Y DE Movsesijaan y Boroje vić (1973), quienes detectaron 14 componentes. Los componentes mas abundantes y comunes fueron los de peso molecular de 97, 85, 55, 52, 31-32, 25-26, 21, 20 y 13 Kd. En el antígeno metabólico (AM), se observaron 23 bandas con impregnación argéntica, a diferencia de

Movsesijan y Borojević (1973), quienes encontraron 13 bandas con la técnica de PAGE. Las bandas mas abundantes y comunes fueron las de pesos moleculares de 54, 48-49, 32-34, 24-25, 20, 21 y 14 Kd, aproximadamente las mismas que en el AS, a excepción de las de mayor peso molecular, presentes únicamente en el AS. Estos resultados concuerdan con lo informado por Irving y Howell (1982) quienes encontraron antígenos de 26,24 y 23 Kd y de 62,42 y 32 Kd, implicados en la formación de líneas de precipitación con suero inmune, en fasciolas inmaduras.

Una vez conocido el espectro antigénico, se determinó cuantos y cuales de estos componentes eran reconocidos por el ovino. Para ello, se aplicó la prueba de inmunoelectrotransferencia (IET) con los sueros hiperinmunes de ovino. Así de los 48 componentes del AS, el ovino hiperinmunizado identificó 28. De los 23 componentes del AM, el ovino hiperinmune detectó 19 (figura 14).

## 5.2. Desarrollo de la respuesta inmune hacia los antígenos de Fasciola hepatica adulta.

Los animales infectados empezaron a excretar hueve

cillos del parásito en la décima semana p.i., este hecho concuerda con lo informado por Van Tiggele (1978).

Los resultados muestran como la respuesta de anticuerpos determinada por las pruebas serológicas utilizadas varían durante el transcurso de la infección experimental y concuerdan con lo informado por Van Tiggele (1978) y por Rufz Navarrete et al. (1985).

Puede observarse en las figuras 15 y 16 que comienzan a detectarse animales positivos mas tardíamente con la prueba de HP, que con las demás pruebas serológicas. Aunque los títulos permanecieron bajos durante todo el experimento, se observa diferencia entre los animales infectados y los testigos a partir de la sexta semana p.i. con AS y de la segunda semana p.i. con AM (figura 17), a diferencia de lo informado por Van Tiggele (1978) que con la técnica de HP observa un rápido incremento de los títulos en la segunda semana p.i., posiblemente debido a que este autor, utilizó un número mayor de metacercarias en la infección de los ovinos (500 metacercarias/animal). Asimismo se

encuentran diferencias con el trabajo de Nájera, quién también infectó en forma experimental a los ovinos con una dosis de 200 metacercarias/animal, pero que observa elevados títulos de anticuerpos medidos por la técnica de HP desde la cuarta semana p.i. Sin embargo los resultados obtenidos en esta tesis, son similares a los que se obtuvieron en un trabajo anterior (Rufz Navarrete et al., 1985), las diferencias con otros autores podrían atribuirse a la utilización de diferentes preparaciones antigénicas.

La prueba de ICD, permite observar la aparición de anticuerpos hacia F. hepatica, desde fases muy tempranas de la infección (figura 18). Este hecho apoya lo informado por Gómez et al. (1981) y por Rufz Navarrete et al. (1985), quienes demostraron que ICD es una prueba de alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos y bovinos. Por otro lado, nuevamente se encuentra que, en general, el AS y el AM funcionan de manera semejante como lo informan Arriaga et al. (1983).

5.3. Reconocimiento de antígenos de Fasciola hepatica adulta por el ovino, durante la infección experimental.



Los resultados presentados en la figura 19, indican que con la prueba de IEF, tanto con el AS como con el AM, el número de líneas de precipitación va aumentando con respecto al tiempo. Las líneas de precipitación comienzan a aparecer en la cuarta semana p.i. (figura 15 y 16), solamente en 2 de 9 animales con AS y en 3 de 9 animales con AM. A la sexta semana p.i., el 80% de los animales presentó líneas de precipitación con ambos antígenos en la prueba de IEF y a las 8 semanas con el AM, todos los animales infectados presentaron líneas, en tanto que con el AS el 86% de los animales fue positivo a esta prueba; este porcentaje se mantuvo en la décima semana p.i. con ambos antígenos. Algunas de estas líneas aparecieron constantemente durante la infección (figura 20 y 21). El aumento en el número de líneas se presenta en forma gradual, de tal manera que en la última semana del experimento (semana 10) se encuentra el mayor número de bandas. A pesar de que el promedio del número de líneas obtenido con AS fue ligeramente mayor que el obtenido con AM, no hubo diferencia entre ambos antígenos (figura 19), como lo informa Van Tiggele (1978).

Con la prueba de inmunoelectrotransferencia (IET), se pudo determinar por un lado, el número de componentes antigénicos reconocidos por los ovinos infectados y testigos, y por otro, el peso molecular de estos antígenos. De las figuras 29 y 30, resulta evidente la

gran variedad de bandas reconocidas por los dos grupos de animales.

Al enumerar los componentes identificados por los ovinos testigos, con el AM puede observarse que en promedio durante toda la infección se detectan 7.2 bandas mientras que, con el AS, se encuentra un promedio de 17.3 bandas durante toda la infección (Figura 22). Esta situación podría atribuirse a varias razones: a) en los antígenos se encuentran presentes proteínas de la flora normal de Fasciola hepatica (Streptococcus sp., Staphylococcus sp., etc) como anteriormente lo han informado Muzquiz et al. (1981). b) que los borregos reconocen en los antígenos componentes de reacción cruzada con parásitos tales como Cooperia oncophora, Dictyocaulus viviparus, Ostertagia ostertagi o Cysticercus tenuicollis, como lo informan Van Tiggele (1978) y Campbell (1977). c) Otra posibilidad es la anotada por Tsang y Hancock (1985), que tal vez el gel utilizado para la transferencia estuviera sobrecargado de proteína y diera lugar a reacciones inespecíficas.

Sin embargo, a pesar de que los animales testigos reconocieron componentes de ambos antígenos, se observan diferencias a partir de la segunda semana p.i.,

ya que los infectados reconocen un mayor número de bandas.

Como no era posible analizar los resultados con base en el total de bandas identificadas, se decidió dividir las bandas en intervalos de peso molecular. Puede observarse que con los antígenos de alto peso molecular (mayor de 90 Kd para la IET con AS y entre 46 y 90 Kd para AM), se encuentra mayor número de bandas en los animales infectados que en los testigos (figuras 23 y 24). En la figura 29 se observa que los componentes del AS de peso molecular mayor a 120 Kd, comenzaron a ser reconocidos en la semana 4 a 6 p.i., a diferencia de lo informado por Oldham (1983 a), quién con antígenos purificados, encontró que los anticuerpos hacia antígenos de peso molecular mayor de 70 Kd comienzan a elevarse poco después de la infección, notándose una clara diferencia respecto a los niveles presentes en la preinfección, en la tercera semana p.i.; el autor informó que los anticuerpos permanecen en un máximo entre la cuarta y décima semana p.i.

No existe un patrón definido de aparición de bandas en la zona de 87 a 115 Kd. En la zona de 55 a 87 Kd hay algunas bandas que aumentan de grosor de la se

mana 0 a la 2, posteriormente se observan tenues. Otras bandas solamente son reconocidas en las semanas 4 y 6 (figura 29).

Con el AM (figura 30) ocurre algo similar, algunos componentes solamente se reconocen al principio de la infección, (semanas 0 y 2), otros a partir de la semana 2, 4 o 6 y algunos se van intensificando con el tiempo. Es to podría indicar la expresión de antígenos del parásito a diferentes tiempos post infección, como lo han informado Hughes et al. (1981) y Hanna et al. (1982), ya que los anticuerpos hacia los antígenos del tegumento T1 y los AM, alcanzan el máximo de 4 a 6 semanas p.i. y lue go declinan al establecerse el parásito en los conductos biliares; además, la IgG dirigida contra los antígenos del tegumento adulto T<sub>2</sub>, se puede encontrar a las seis semanas p.i., es decir, cuando el parásito ya se encuen tra alojado en los conductos biliares.

Con antígenos de bajo peso molecular, no se encuen tran diferencias marcadas en cuanto a número de bandas reconocidas por los dos grupos de ovinos, sin embargo, cuando se utiliza AM en la prueba de IET, en la zona comprendida entre los 21 y 46 KD, se puede apreciar una banda que aumenta de grosor e intensidad conforme progresa la infección en el grupo de animales infecta

dos que corresponde a un peso molecular de 23 a 27 Kd (figura 26). Una banda con características similares aparece en la zona de componentes de peso molecular menor de 21 Kd cuando la IET se realizó con AS, y tiene un peso molecular comprendido entre los 20-24 Kd (Figura 27), lo cual está de acuerdo con lo informado por Oldham (1983a), quién describe que los anticuerpos contra antígenos de peso molecular menor de 48Kd, se incrementan gradualmente durante la infección; el autor sugiere que se traten de antígenos de maduración del parásito.

La intensa banda presente en ambos antígenos descrita antes, debiera ser investigada, para determinar el papel que desempeña dentro de la infección. Dado que se manifiesta tan prominentemente, es posible que este componente antigénico intervenga en las pruebas de diagnóstico, ya que comienza a aparecer en la semana 1 o 4 p.i. y va aumentando con el tiempo. Pero la inducción de respuesta inmune hacia este componente antigénico, pudiera ser dirigida por el parásito como un mecanismo de inmunoevasión a la respuesta inmune del huésped.

Diferentes mecanismos de inmunoevasión han sido descritos en las infecciones por Fasciola hepática. Se

ha informado que existe un rápido recambio en los antígenos del tegumento de las fasciolas (Hanna 1979; Hanna 1980 b; Bennet 1979; Bennet et al., 1980), ya que al poner en contacto los gusanos juveniles con el suero inmune del huésped éstos se cubren con IgG, que se une al glucocálix externo, posteriormente se presenta un recambio del glucocálix que da lugar a la pérdida de estos complejos (Duffus y Franks, 1981; Sandeman y Howell, 1980; Hanna, 1980 a). También existen informes acerca de la presencia de grupos sanguíneos humanos en las fasciolas adultas (Ben Ismail et al., 1979), así como de la presencia de componentes séricos del huésped en las fasciolas adultas (Capron, 1968; Movsesijan y Borojević, 1973). Esta antigenicidad compartida por el huésped y el parásito, dificulta el reconocimiento del parásito por el huésped.

En un trabajo reciente, se ha encontrado que la Fasciola hepática produce inmunosupresión, ya que reduce las respuestas a los glóbulos rojos de pollo en el borrego (Orozco et al., 1986). También existen evidencias de la producción de sustancias tóxicas para los linfocitos del huésped, por la F. hepática adulta (Goose, 1978) que le permiten protegerse de las defensas inmunes.

También ha sido descrita la liberación de gran cantidad de antígenos del parásito, que posiblemente reaccionan con los anticuerpos disponibles y forman complejos inmunes (Van Tiggele, 1978). La presencia de complejos inmunes en las infecciones por F. hepatica, fue demostrada por Arriaga et al. (1984). Así la aparición de esta prominente banda reconocida por todos los animales infectados, podría ser dirigida por el parásito para distraer la atención del sistema inmune del huésped.

Así podemos concluir que dada la alta complejidad del parásito, sus diferentes componentes desencadenan distintas respuestas de anticuerpos en forma asincrónica en el animal infectado. Existen algunos componentes que provocan fuertes respuestas de anticuerpos durante la infección como es el caso de los componentes de peso molecular de 20-23 Kd.

Debido a que en Medicina Veterinaria, el diagnóstico serológico de una enfermedad se basa en el hato y no en el individuo, y a que algunos animales responden contra determinados antígenos, mientras que otros animales pueden responder contra antígenos diferentes, resulta aparente que, con fines prácticos de diagnóstico, sería conveniente utilizar antígenos crudos, como el AS o preferentemente el AM, porque nos permitiría de

tectar un mayor número de animales con anticuerpos anti-fasciola.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el uso de la tinción argéntica permite tener una idea mas aproximada de la complejidad de los antígenos de Fasciola hepatica; se podría intentar el aislamiento de los componentes de peso molecular de 20 a 23 Kd para llevar a cabo el diagnóstico serológico, debido a que éstos inducen fuertes respuestas de anticuerpos. Asimismo se podría determinar si dichos componentes pueden provocar respuestas inmunes protectoras.

Por otra parte, la tecnología utilizada para la prueba de IET da la pauta para aplicar la prueba de Dot-ELISA (ELISA en mancha) para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos.

Otros estudios que se pueden sugerir tomando como referencia los resultados del presente trabajo son:

- "Dinámica de la respuesta inmune contra AS y AM de Fasciola hepatica en ovinos y bovinos infectados en forma natural, mediante el uso de la técnica de IET".

- "Utilización de la técnica de IET en el estudio



del papel que desempeñan los antígenos de superficie (tegumento) de F. hepatica en infecciones experimentales en ovinos y bovinos".

- "Determinación de las clases de inmunoglobulinas anti-F. hepatica en el transcurso de la infección, tanto en infecciones experimentales como en naturales, mediante la prueba de IET".

- "Evaluación de la respuesta inmune humoral por medio de la prueba de IET, en ovinos o bovinos inmunizados con diferentes preparaciones antigénicas de F. hepatica".

- "Determinación del efecto de inmunoglobulinas inducidas por antígenos de F. hepatica identificadas por IET, sobre fasciolas juveniles in vitro".

## 6. Literatura Citada

Abascal Torres, G.A., 1970. Estudio inmunológico de fracciones antigénicas de Fasciola hepatica. Tesis F.M.V.Z., U.N.A.M.

Armour, J., J. Dargie, J.J. Doyle, M. Murray, P. Robinson and B. Rushton, 1974. Immunisation against fascioliasis. Proceedings of the Third International Congress of Parasitology. Munich, p. 494.

Armour, J., 1975. The epidemiology and control of bovine fascioliasis. Vet. Rec., 96: 198-201.

Arriaga, C., A. Gómez, C.R. Bautista y A. Morilla, 1983. Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de Fasciola hepatica en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fascioliasis en bovinos. Téc. Pec. Méx., 44:41-51.

Arriaga C., A. Rufiz-Navarrete, A. Gómez, M. Fraire y A. Morilla, 1984. Detección de complejos inmunes en animales infectados con Fasciola hepatica. Memorias de la Reunión de Inv. Pecuaria en México 1984, p. 244.

Avrameas, S., 1972. Enzyme markers: Their Linkage with proteins and use in immuno histochemistry. Histochem. J., 4: 321-330.

Barriga, O.O., 1981. The immunology of parasitic infections. University Park Press, Baltimore.

Batteiger, B., W.J. Newhall and R.R. Jones, 1982. The use of Tween 20 as blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. J. Immunol. Meth., 55: 297-307.

Bautista C.R., 1980. Inmunología en la fascioliasis. Memorias del Curso de Actualización en Inmunoparasitología Veterinaria. México, p. 84-89.

Bautista, C.R. y A. Morilla, 1981. Inmunología Veterinaria. Manual de Laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C., México, D.F., P. 6-10, 31-39 y 44-51.

Bautista, C.R., A. Gómez, A. Rufiz-Navarrete, A. Santillán y A. Morilla, 1982. Inmunización experimental de borregos contra Fasciola hepatica con antígenos somático o metabólico del parásito adulto. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México., p. 102.

Bénex, J., 1964. Le diagnostic sérologique pratique de la distomatose. 1. Une méthode d' agglutination sur lame a l'aide d'antigène absorbé sur des particules de latex. Bull. Soc. Path. Exot., 57; 495-502.

Bénex, J., J. Guilhon et R. Bernabé, 1973. Etude comparative de diverses méthodes de diagnostic immunologique de la Fasciolose hépatobiliaire expérimental du mouton et influence du traitement sur la persistance des anticorps. Bull.Soc. Path. Exot., 66 116-128.

Ben-Ismaïl, R, B. Carme, P. Rouger, N. Gentilini et C. Salmon, 1979. Mise en évidence de substance Lewis dans Fasciola hepatica. C.R. Acad. SC. Paris, 289: 1322-1324.

Bennett, C.E., 1975a. Fasciola hepatica: Development of caecal epithelium during migration in the mouse. Exp. Parasitol, 37 :426-441.

Bennett, C.E., 1977. Fasciola hepatica: Development of excretory and parenchymal systems during migration in the mouse. Exp. Parasitol., 41: 43-53.

Bennett, C.E., 1978. The identification of soluble adult antigens on the tegumental surface of juvenile Fasciola hepatica. Parasitology, 77:325-332.

Bennett, C.E. and L.T. Threadgold, 1973. Electron microscope studies of Fasciola hepatica XIII. Fine structure of newly exysted juvenile. Exp. Parasitol., 34: 85-99.

Bennett, C.E. and L.T. Threadgold, 1975. Fasciola hepatica: Development of tegument during migration in mouse. Exp. Parasitol., 38:38-55.

Bennet, C.E., D.L. Hughes and E. Harness, 1980. Fasciola hepatica: Changes in tegument during killing of adult surgically transferred to sensitized rats. Parasite Inmu nol., 2 : 39-55.

Bennett, C.E., G.W.P., Joshua and D.L., Hughes, 1982. Demostration of juvenile-specific antigens of Fasciola hepatica. J. Parasitol., 68: 791-795.

Beresford, O.D., 1976. A case of Fascioliasis in man. Vet. Rec. 98:15.

- Biagi, F., J. Tay y J. Portilla, 1958. Valor de una intra dermo-reacción y una reacción de precipitación en el diagnóstico de la fasciolosis humana. Rev. Lat. Microb. 1:69-78.
- Biguet, J., Capron A. et P. Tran Van Ky, 1962. Les antigènes de Fasciola hepatica. Etude électrophorétique et immunoelectrophorétique. Identification des fractions et comparaison avec les antigènes correspondant à sept autres Helminthes. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 37: 221-231.
- Blancou, J., A. Bouchet et R. Tailliez, 1976. Réactions à l'injection intradérmique d'un antigène spécifique du genre Fasciola chez les bovins. Essai préliminaire en vue d'une application au diagnostic de l'infestation. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 29: 39-42.
- Black, N.M. and G. Froyd, 1972. The possible influence of liver fluke infestation on milk quality. Vet. Rec., 90:71-72.
- Boray, J.C., 1967. Studies on experimental infections with Fasciola hepatica, with particular reference to acute fascioliasis in sheep. Ann. Trop. Parasitol., 61:439-450.
- Borojević, D., B. Jovanović and M. Movsesijan, 1973. Fluorescent antibody studies of Fasciola hepatica infections. Acta Vet. Beograd., 23:55-62.
- Brown, H.W., 1977. Parasitología Clínica. Nueva Editorial Interamericana, 3a. Edición, México.
- Bull. Off. int. Epiz., 1981. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. 93: 903.
- Burden, D.J. and N.C. Hammet. 1978, Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to Fasciola hepatica in cattle. Vet. Rec., 103: 158.
- Burden, D.J. and N.C. Hammet, 1980. Fasciola hepatica: Attempts to immunise rats using fluke eggs and in vitro culture products. Vet. Parasitol., 7:51-57.
- Burnette, W.N., 1981. Western blotting: Transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiiodinated Protein A. Anal. Biochem., 112: 195-203.

Campbell, N.J., J.D. Kelly, R.B. Townsend and J.K. Di neen, 1977. The stimulation of resistance in sheep to Fasciola hepatica by infection with Cysticercus tenuicollis. Int. J. Parasitol., 7: 347-351.

Campos Bueno, M., V. Gómez García, I. Mañas Almendros, J. Lozano Maldonado, y M. Rodríguez Osorio, 1981. Investigación de comunidades antigénicas de extractos antigénicos de trematodes y nematodes con seroproteínas de especies hospedadoras y no hospedadoras. Rev. Ibér. Parasitol., 41: 83-92.

Capron, A., J. Biguet, P. Tran Van Ky et G. Rosé, 1964. Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique de la distomatose humaine à Fasciola hepatica. Mise en évidence d'anticorps sériques par immunoelectrophorèse. La Presse Med., 72: 3103-3107.

Capron, N., J. Biguet, A. Vernes et D. Afchain, 1968. Structure antigénique des helminthes. Aspects immunologiques des relations hôte-parasite. Pathol. Biol., 16: 121-138.

Coudert, J., J.P. Garin, P. Ambroise-Thomas, Kien Troung Thai, J. Despeignes et M.A. Pothier, 1967. La reaction d'immuno-fluorescence sur coupes de Fasciola hepatica: une nouvelle technique pour le sérodiagnostic de la distomatose. Bull. Soc. Path. Exot. 60: 71-79.

Cuperlović, K., R. Lalic, 1970. Immunological reaction of rabbits to the reinfection with Fasciola hepatica. Acta Vet. Beograd., XX:333-339.

Cuperlović, K. and M. Movsesijan, 1972. Isolation and labeling of Fasciola hepatica antigen active during the infection, J. Parasitol., 58: 1209-1210.

Chapman, C.B. and G.F. Mitchell, 1983. Proteolytic cleavage of immunoglobulins by enzymes released by Fasciola hepatica. Vet. Parasitol., 11: 165-178.

Choi, W.Y. and O.R. Lee, 1979. Immunoelectrophoresis for Fasciola hepatica. Korean J. Parasitol., 17:73-80.

Dargie, J.D., J. Armour, B. Rushton and M. Murray, 1974. Immune mechanisms and hepatic fibrosis in fascioliasis. In Parasitic Zoonoses. Clinical and Experimental Studies. Edited by E.J.L. Soulsby. Academic Press, Inc. New York, pag. 249-274.

Dawes, B., 1962. Citado por Reddington, J.J., R.W. Leid y R.B. Wescott, 1984. A review of the antigens of Fasciola hepatica. Vet. Parasitol., 14:209-229.

Deelder, A.M. and J.S. Ploem, 1975. An immunofluorescence reaction for Fasciola hepatica using the defined antigen substrate spheres (DASS) system. Exp. Parasitol., 37: 173-178.

Demaree, R.S. and Hillyer G.V., 1982. Immunoperoxidase localization of Fasciola hepatica worm tegument antigens by electron microscopy. Int. J. Parasitol., 12: 179-183.

Dodd, K., 1969. Citado por Van Tiggele, L.J., 1978. Host-parasite relations in Fasciola hepatica. infections. Immunopathology and diagnosis of liver fluke disease in ruminants. Thesis. Rijksuniversiteit, Leiden, The Netherlands.

Doy, T.G. and D.L. Hughes, 1982. In vitro cell adherence to newly excysted Fasciola hepatica: failure to affect their subsequent development in rats. Res. Vet. Sci., 32: 118-120.

Doy, T.G., D.L. Hughes and E. Harness, 1978. Resistance of the rat to reinfection with Fasciola hepatica and the possible involvement of intestinal eosinophil leukocytes. Res. Vet. Sci., 25: 41-44.

Doy, T.G., D.L. Hughes and E. Harness, 1979. In vitro adherence of rat peritoneal derived leucocytes on artificially excysted Fasciola hepatica. British Soc. for Parasitology, 79: xxxii.

Doy, T.G., D.L. Hughes and E. Harness, 1980. The selective adherence of rat eosinophils to newly excysted Fasciola hepatica in vitro. Res. Vet. Sci., 29: 98-101.

Doy, T.G., D.L. Hughes and E. Harness, 1981. The heterologous protection of rats against a challenge with Fasciola hepatica by prior infection with the nematode Nippostrongylus brasiliensis. Parasite Immunol., 3: 171-180.

Doyle, J.J., 1971. Acquired immunity to experimental infection with Fasciola hepatica in cattle. Res. Vet. Sci., 12: 527-534.

Doyle, J.J., 1973. The precipitin response induced in calves by a single experimental infection with Fasciola hepatica. Res. Vet. Sci. 15: 119-120.

- Duffus, W.P.H. and D. Franks, 1980. In vitro effect immune serum and bovine granulocytes on juvenile Fasciola hepatica. Clin. Exp. Immunol., 41: 430-440.
- Duffus, W.P.H. and D. Franks, 1981. The interaction in vitro between bovine immunoglobulins and juvenile Fasciola hepatica. Parasitol., 82:1-10.
- Düwel, D., W. Sambeth and W. Bossaller, 1972. On the pathogenicity of Fasciola hepatica in sheep. Parasitologia XIV: 35-44.
- Eckblad, W.P., L.F. Woodward and B.Z. Lang, 1981. Scanning electron microscopy of in vitro serum mediated destruction of juvenile Fasciola hepatica. J. Parasitol., 67:784-789.
- Enders, B., D. Düwel and K.D. Hungerer, 1982. Serology of fascioliasis in ruminants. A comparative serological follow-up-study with latex agglutination test and counterimmunoelectrophoresis (CIEP) in artificially Fasciola hepatica invaded cattle and sheep with regard to chemotherapy control. Behring Inst, Mitt. 66: 34-42.
- Enríquez, A.S., 1971. Evaluación de la prueba intradérmica y examen coproparasitológico en el diagnóstico de la fascioliasis en bovinos. Tesis. F.M.V.Z., U.N.A.M. México.
- Erickson, L. and T. Flagstad, 1974 Fasciola hepatica: Influence of extrahepatic adult flukes on infections and immunity in rats. Exp. Parasitol., 35: 411-417.
- Faust, E.C., P.F. Russell y D.R. Lincicome, 1961. Parasitología Clínica de Craig y Faust. Segunda edición en español. U.T.E.H.A., México.
- Furmaga, S., J.L. Gundlach and K. Sobieszewski, 1972. The behaviour of certain biochemical indicators in experimental sheep fascioliasis. Acta Parasitol. Polonica, XX: 539-550.
- Gajos, E., 1968. L'etude des anticorps précipitants dans la bile de bovins infestés par Fasciola hepatica. Wiadomości Parazytologiczne, XIV: 721-722.
- Geyer, E., 1967. Citado por Van Tiggele, L.J., 1978. Host-parasite relations in Fasciola hepatica infections. Immunopathology and diagnosis of liver fluke disease in ruminants. Thesis. Rijksuniversiteit, Leiden, The Netherlands.



Gómez-Agudelo T., R. Pérez-Reyes y F. Zerón-Bravo, 1978. Fasciolosis en México. Estado actual y huéspedes intermedios. Rev. Lat. amer. Microbiol., 20: 121-127.

Gómez Arroyo A., C. Arriaga y A. Morilla, 1979. Evaluación preliminar de la prueba de inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico de la fasciolosis en animales. Vet. Méx. 10: 181-186.

Gómez, A., C. Arriaga y A. Morilla, 1981. Evaluación de los antígenos somático y metabólico de Fasciola hepatica en las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fasciolosis en rumiantes. Memorias de la XV Reunión Anual INIP-SARH, p. 497-500.

Gómez A., C. Arriaga, A. Sánchez, A. Estrada y A. Morilla, 1984. Estudio comparativo de dos antígenos somáticos de Fasciola hepatica en el diagnóstico de fasciolosis en ovinos. Vet. Méx. 15: 193-198.

Goose, J., 1978. Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defences by Fasciola hepatica. Nature, 275: 216-217.

Goose, J., 1979. Mast cell changes in rats infected with Fasciola hepatica. British Soc. Parasitol., Parasitology, 79: xxxii.

Gundlach J.L., 1971. Studies on the serological activity of Fasciola hepatica L. antigens. Acta Parasitol. Polonica, 19: 9-47.

Hanna, R.E.B., 1975. Fasciola hepatica: An electron microscope autoradiographic study of protein synthesis and secretion by gut cells in tissue slices. Exp. Parasitol., 38: 167-180.

Hanna, R.E.B., 1979. Surface antigenicity of Fasciola hepatica during development. British Soc. Parasitol., Parasitology, 79: xxxi.

Hanna, R.E.B., 1980a., Fasciola hepatica: glycocalyx replacement in the juvenile as a possible mechanism for protection against host immunity. Exp. Parasitol., 50: 103-114.

Hanna, R.E.B., 1980b. Fasciola hepatica: An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and the sheep. Exp. Parasitol., 50: 155-170.

- Hanna, R.E.B., 1980c. Fasciola hepatica: Autoradiography of protein synthesis, transport and secretion by the tegument. Exp. Parasitol., 50:279-304.
- Hanna, R.E.B. and W. Jura, 1977. Antibody response of calves to a single infection of Fasciola gigantica determined by an indirect fluorescent antibody technique. Res. Vet. Sci., 22: 339-342.
- Hanna, R.E.B. and G.V. Hillyer, 1984. Fasciola hepatica and Schistosoma mansoni: Immunofluorescent antigen localization and cross-reactivity. Exp. Parasitol. 57: 1-14.
- Hanna, R.E.B. and L.T. Threadgold, 1975. Development of an in vitro technique for cytological investigations of slices of Fasciola hepatica: evaluation by morphological criteria. Int. J. for Parasitol., 5: 321-331.
- Hanna, R.E.B. and L.T. Threadgold, 1976. Fasciola hepatica: stereological analysis of effects of certain metabolic inhibitors on synthesis of secretory bodies by the tegument of tissue slices. Exp. Parasitol., 39:106-114.
- Hanna, R.E.B., D.L. Hughes and S.M. Taylor, 1982. Fasciola hepatica: antibody levels in sheep serum before and after treatment with anthelmintic. Res. Vet. Sci., 33: 328-332.
- Harness, E., D.L. Hughes and T.G. Doy, 1976. The demonstration of prehepatic immune response to Fasciola hepatica in the mouse. Int. J. Parasitol., 6:15-17.
- Harness, E., T.G. Doy and D.L. Hughes, 1977. The early migratory behaviour of young Fasciola hepatica in sensitized mice. Int. J. Parasitol., 7: 51-54.
- Haroun, E.T.M. and G.V. Hillyer, 1985. Resistance to fascioliasis. A review. Third International Immunoparasitology Symposium. June 1981, 1985. Lincoln, Nebraska.
- Hayes, T.J. and M. Mitrovic, 1977. The early expression of protective immunity to Fasciola hepatica in rats. J. Parasitol., 63: 585-587.
- Hillyer, G.V., 1975. Use of counterelectrophoresis to detect infections of Fasciola hepatica. J. Parasitol., 63: 557-559.
- Hillyer, G.V., 1979. Schistosoma mansoni: reduced worm burdens in mice immunized with isolated Fasciola hepatica antigens. Exp. Parasitol., 48: 287-295.

Hillyer, G.V., 1980. Isolation of Fasciola hepatica tegument antigens. J. Clin. Microbiol., 12: 695-699.

Hillyer, G.V. and A. Capron, 1976. Immunodiagnosis of human fascioliasis by counter-electrophoresis. J. Parasitol., 62: 1011-1013.

Hillyer, G.V. and N. Santiago de Weil, 1977. Partial purification of Fasciola hepatica antigen for the immunodiagnosis of fascioliasis in rats. J. Parasitol., 63: 430-433.

Hillyer, G.V. and M. Cervoni, 1978. Laurell crossed immunoelectrophoresis and affinity chromatography for the purification of a parasite antigen. J. Immunol. Meth., 20: 385-390.

Hillyer, G. V. and J.L. Rodríguez Ramos, 1980. Effect of detergents and acid buffer on the reactivity of Fasciola hepatica antigens. J. Parasitol. 66: 38-41.

Hillyer, G.V. and A. E. Serrano, 1983. The antigens of Paragonimus westermani, Schistosoma mansoni and Fasciola hepatica adult worms. Am.J. Trop. Med. Hyg., 32: 350-358.

Hillyer, G.V., R.P. Pelley and A. Del Llano de Díaz, 1979. Solubilization of antigens of Fasciola hepatica which react with antibodies to Schistosoma mansoni. J. Parasitol., 65: 55-60.

Howell, M.J. and R. M. Sandeman, 1979. Fasciola hepatica some properties of a precipitate which forms when metacercariae are cultivated in immune rat serum. Int. J. Parasitol., 9: 41-45.

Howell, M.J., R.M. Sandeman and G.R. Rajasekariah, 1977. In vivo and in vitro studies of the effects of immune rat serum on Fasciola hepatica. Int. J. Parasitol., 7: 367-371.

Hughes, D.L., R.E.B. Hanna and H. W. Symonds, 1981. Fasciola hepatica: IgG and IgA levels in the serum and bile of infected cattle. Exp. Parasitol., 52: 271-279.

Hughes, D.L., E. Harness and T.G. Doy, 1981. The different stages of Fasciola hepatica capable of inducing immunity and the susceptibility of various stages to immunological attack in the sensitised rat. Res. Vet. Sci., 30: 93-98.

- Irving, D. O. and M. J. Howell, 1982. Characterization of excretory-secretory antigens of Fasciola hepatica. Parasitol., 85: 179-188.
- Kadhim, K., 1976. Changes in serum proteins values of sheep infected with Fasciola gigantica. Am J. Vet. Res., 37: 229-231.
- Kagan, I. G., 1969. Caracterización de antígenos parasitarios. Bol. Oficina Sanitaria Panamericana, 57: 13-30.
- Kelly, J. D., N. J. Campbell and J. K. Dineen, 1980. The role of the gut in acquired resistance to Fasciola hepatica in the rat. Vet. Parasitol., 6: 359-367.
- Klimenko, V. V., 1971. A study of the dynamics of antibodies in experimental fascioliasis in sheep. Helm. Abst., 43: 5045.
- Kløie, M., P. Nansen and N. Ø. Chistensen, 1977. Stereocan studies of rediae, cercariae, cysts, excysted metacercariae and migratory stages of Fasciola hepatica. Z. Parasitenk 54: 289-297.
- Korach, S. and J. Bénex, 1966 a. A lipoprotein antigen in Fasciola hepatica. I. Isolation, physical and chemical data. Exp. Parasitol., 19: 193-198.
- Korach, S. and J. Bénex, 1966 b. A lipoprotein antigen in Fasciola hepatica. II Immunological and immunochemical properties. Exp. Parasitol., 19: 199-205.
- Kuhlmann, W. D., S. Avrameas and T. Ternynk, 1974. A comparative study for ultrastructural localization of intracellular immunoglobulins using peroxidase conjugates. J. Immunol. Meth., 5: 33-48.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, London, 227: 680-685.
- Lang, B. Z., 1976. Host-parasite relationships of Fasciola hepatica in the white mouse. VII. Effect of antiworm incubate sera on transferred worms and successful vaccination with a crude incubate antigen. J. Parasitol., 62: 232-236.

Lang, B.Z. and N.O. Dronen, 1972. Host-parasite relationships of Fasciola hepatica in the white mouse. IV. Studies on worm transfer and the induction of acquired immunity by worms of different ages. J. Parasitol., 58: 84-87.

Lang, B.Z. and R.F. Hall, 1977. Host-parasite relationships of Fasciola hepatica in the white mouse. VIII. Successful vaccination with culture incubate antigens and antigens from sonic disruption of immature worms. J. Parasitol., 63: 1046-1049.

Landeros, M.A., F. Ibarra Velarde, J.L. Escudero Corona y F. Milián Suazo, 1981. Determinación de algunos hospederos intermediarios de Fasciola hepatica en la cuenca lechera de Tulancingo, Hgo. Téc. Pec. Méx., 40: 47-51.

Laurell, C.B., 1966. Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Anal. Biochem., 15: 45-52.

Lehner, R.P. and M.M.H. Sewell, 1980. A study of the antigens produced by adult Fasciola hepatica maintained in vitro. Parasite. Immunol., 2: 99-109.

Levine, D.M., G.V. Hillyer and S.I. Flores, 1980. Comparación de counterelectrophoresis, the enzyme-linked immunosorbent assay and katofecal examination for the diagnosis of fascioliasis in infected mice and rabbits. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 602-608.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

Maekawa, K. and M. Kushibe, 1964. Studies on allergen of Fasciola hepatica. Part V. Constitution of allergen P4. Agr. Biol. Chem., 28: 328-287.

Majovko, V.V. y P.V. Makarov, 1981. Biología General. Tercera edición Editorial Grijalbo. México, D.F., pp. 288-293.

Mansour, N.S., F.G. Yousseff, E.M. Mikhail and F.N. Bector, 1983. Use of a partially purified Fasciola gigantica worm antigen in the serological diagnosis of human fascioliasis in Egypt. Am. J. Trop. Med.

Modavi, S. and H. Isseroff, 1984. Fasciola hepatica: Collagen deposition and other histopathology in the rat host's bile ducts caused by the parasite and by proline infusion. Exp. Parasitol., 58: 239-244.

Moore, M.N. and D.W. Halton, 1976. Fasciola hepatica: Histochemical observations on juvenile and adults and the cytopathological changes induced in infected mouse liver. Exp. Parasitol., 40: 212-224.

Movsesijan, M., 1968. Immunoglobulin binding by the miracidia of Fasciola hepatica. J. Comp. Pathol. 78: 421-425.

Movsesijan, M. and D. Borojević, 1973. Antigenic analysis of Fasciola hepatica: Extraction and fractionation. Isotopes and Radiation in Parasitology, III Int. Atomic. Energy Agency. Vienna. pp 11-22.

Movsesijan, M., B. Jovanović, O. Aalund and P. Nansen, 1975. Immune response of sheep to Fasciola hepatica infection. Res. Vet. Sci., 18: 171-174.

Murray, M. and B. Rushton, 1975. The pathology of fascioliasis with particular reference to hepatic fibrosis. Simpsonia of the British Soc. for Parasitology. Vol 13 Pathogenic processes in parasite infections. Ed. by A.E.K. Taylor and R. Muller. Blackwell Sci. Pub. Oxford, pp 27-41.

Muzquiz Moracho, J.L., J.L. Alonso Martínez, C. Sánchez Acedo y A. Sánchez Franco, 1981. Aislamiento de diversos agentes bacterianos en Fasciola hepatica. Rev. Ibérica Parasitología, 41: 111-117.

Nájera, R., 1981. Respuesta inmune humoral en ovinos infectados con Fasciola hepatica. Téc. Pec. Méx. Suplemento 10: 55-72.

Náquira Vildoso F. and Marcial Rojas R.A., 1971. Fascioliasis. In: Pathology of Protozoal and Helminth Diseases. The William and Wilkins Company, Baltimore.

Oldham, G., 1983a. Antibodies to Fasciola hepatica antigens during experimental infection in cattle measured by ELISA. Vet. Parasitology, 13: 151-158.

Oldham, A.F., 1983b. Protection against Fasciola hepatica in rats with adult fluke antigen in Freund's adjuvant: influence of antigen batch, antigen dose and number of sensitising injections. Res. Vet. Sci., 34: 240-244.

- Orozco, M., E. Morales y C.R. Bautista, 1986. Inmunosupresión en ovinos infectados experimentalmente con Fasciola hepatica. Resúmenes del XVII Congreso Nal. de Microbiología. Puebla, Pue., 27-30 de abril de 1986.
- Owen, J.M. 1977. Liver fluke infection in horse and ponies. Equine Vet. J., 9: 29-31.
- Pappas, M.G., R. Hajkowski and W.T. Hochmeyer, 1983. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA); a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. J. Immunol. Meth., 64: 205-214.
- Pappas, M.G., R. Hajkowski, L.T. Cannon and W.T. Hockmeyer, 1984. Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA). Comparison with standard ELISA and complement fixation assays for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. Vet. Parasitol., 14: 239-249.
- Patnaik, B. and K.M. Das, 1968. Diagnosis of fascioliasis in cattle by intradermal allergic test. Cornell Vet., 5: 113-123.
- Pérez-Ramos, R., 1968. Estudio inmunogénico de Fasciola hepatica en ovinos. Tesis profesional. Escuela Nal. de M.V.Z. U.N.A.M. 24 pp.
- Pfister, K. Ch. Daveau, P. Ambroise-Thomas, 1984. Partial purification of somatic and excretory-secretory products of adult Fasciola hepatica and their application for the serodiagnosis of experimental and natural fascioliasis using an ELISA. Res. Vet. Sci., 37: 39-43.
- Poluéktova, P.F., 1977. Passive haemagglutination test in the diagnosis of experimental fascioliasis in sheep. Helminth. Abs., 46: 692.
- Quiroz Romero H., 1984. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Limusa. México.
- Rajasekariah, G.R. and M.J. Howell, 1977. The fate of Fasciola hepatica metacercariae following infection of immune rats. J. Helminth., 51: 289-294.
- Rajasekariah, G.R. and M.J. Howell, 1978. Fasciola hepatica: Role of developmental stages in the rat's resistance to challenge. Exp. Parasitol., 44: 233-238.
- Rajasekariah, G.R. and M.J. Howell, 1979. Fasciola hepatica in rats: transfer of immunity by serum and cells from infected to Fasciola hepatica naive animals. J. Parasitol., 65: 481-487.

- Reddington, J.J., R.B. Wescott and R.W. Leid, 1982. Isolation and purification of Fasciola hepatica eggs. Vet. Parasitol., 11: 179-183.
- Reddington, J.J., R.W. Leid and R.B. Wescott, 1984. A review of the antigens of Fasciola hepatica. Vet. Parasitol., 14: 209-229.
- Robert, R., P. Leynia de la Jarrige, D. Chabasse, C. Mahaza, C. Bizon et H. Genthon, 1980. Contribution au diagnostic immunologique de la fasciolose à Fasciola hepatica chez les bovins: Recherche d'anticorps antifraction II. Rec. Méd. Vét., 156: 533-538.
- Rogan, M.T. and L.T. Threadgold, 1984. Fasciola hepatica: Tegumental alterations as a consequence of lectin binding. Exp. Parasitol. 57: 248-260.
- Roseby, F.B., 1970. The effect of fascioliasis on the wool production of merino sheep. Austr. Vet. J., 46: 361-365.
- Ruiz-Navarrete, M.A., C. Arriaga, A. Gómez, C.R. Bautista y A. Morilla, 1985. Dinámica de la respuesta serológica de ovinos infectados experimentalmente con Fasciola hepatica. Téc. Pec. Méx., 49: 78-86.
- Sampaio-Silva, M.L., F. Santoro and A. Capron, 1981. Circulating immune complexes in human fascioliasis. Relationship with Fasciola hepatica egg output. Acta Tropica, 38: 39-44.
- Sandeman, R.M. and M.J. Howell, 1980. In vitro studies of the response of sheep to infection with Fasciola hepatica. Vet. Parasitol., 6: 347-357.
- Sandeman, R.M. and M.J. Howell, 1981. Precipitating antibodies against excretory-secretory antigens of Fasciola hepatica in sheep serum. Vet. Parasitol., 9: 35-46.
- Sandeman, R.M. and M.J. Howell, 1982. Characterization of sheep antibodies involved in precipitation formation with surface antigens of Fasciola hepatica in vitro. Int. J. Parasitol., 12: 467-471.
- Sandeman R.M., M.J. Howell and N.J. Campbell, 1980. An attempt to vaccinate sheep against Fasciola hepatica using a juvenile fluke antigen sheep antibody complex. Res. Vet. Sci., 29: 255-259.



Sigma Chem. Co. Peroxidase (horseradish), Type VI. Assay data sheet.

Simpkin, K.G., C.R. Chapman and G.C. Coles, 1980. Fasciola hepatica: a proteolytic digestive enzyme. Exp. Parasitol. 49: 281-287.

Sinclair, K.B., 1970. The pathogenesis of Fasciola hepatica and other liver flukes. Helminth. Abs., 36: 115-134.

Sinclair, I.J. and S.B. Kendall, 1969. Precipitating antibodies to infection with Fasciola hepatica in rabbits. Res. Vet. Sci., 10: 483-485.

Sinclair, I.J. and L.P. Joyner, 1974. The effect of the administration of a homologous antigen on the establishment of Fasciola hepatica in the rabbit. Res. Vet. Sci., 16: 320-327.

Smith, G. and B.T. Grenfell, 1984. The influence of water, temperature and pH on the survival of Fasciola hepatica miracidia. Parasitol., 88: 97-104.

Spengler, R.N. and H. Isseroff, 1981. Fascioliasis: Is the anemia caused by hematophagia, J. Parasitol., 67: 886-892.

Tailliez, R., R. Mangalo et S. Korach, 1967. Isolément d'un antigène spécifique de la grande douve du foie (Fasciola hepatica). C.R. Acad. Sc., Paris, 265: 466-469.

Thorpe, E., 1965. An immunocytochemical study with Fasciola hepatica. Parasitol., 55: 209-214.

Toledo Roa, E.L., 1985. Aislamiento, purificación y caracterización química del glucocálix de Fasciola hepatica. Tesis profesional. E.N.C.B. - I.P.N.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76: 4350-4354.

Tribouley, J., J. Tribouley-Duret, M.J. Irribarren et M. Pautrizel, 1969. Mise en évidence des anticorps spécifiques de Fasciola hepatica par hémagglutination passive en utilisant la glutaraldéhyde comme agent de couplage. C.R. Acad. Sc. Paris. 268: 2215-2217.

Tsang, V.C.W. and K. Hancock, 1985. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) or "Western-Blot". Improvements on transfer efficiency and sensitivity. Third International Immunoparasitology Symposium. June 19-21, 1985. Lincoln, Nebraska.

Urquhart, G.M., W. Mulligan and F.W. Jennings, 1954. Artificial immunity to Fasciola hepatica in rabbits. I. Some studies with protein antigens of Fasciola hepatica. J. Infect. Dis., 94: 126-133.

Van Tiggele, L.J., 1978. Host-parasite relations in Fasciola hepatica infections. Immunopathology and diagnosis of liver fluke disease in ruminants. Thesis. Rijksuniversiteit, Leiden. The Netherlands.

Van Tiggele, L.J. and H.J. Over, 1976. Serological diagnosis of fascioliasis. Vet. Parasitol., 1: 239-248.

Wedrychowicz, H., K. Turner, K. Pfister, P.H. Holmes and J. Armour, 1984. Local antibody responses in the bile and feces of sheep infected with Fasciola hepatica. Res. Vet. Sci., 37: 44-51.

Westcott, R.B., C.J. Farrell and D.T. Shen, 1984. Diagnosis of naturally occurring Fasciola hepatica infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res., 45: 178-179.

Wilson, R.J.M., 1978. Citado por Barriga, O.O., 1981 The immunology of parasitic infections. University Park Press, Baltimore, pag. 20-21.

Wray, W., T. Boulikas, V.P. Wray and R. Hancock, 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Analytical Bioch., 118: 197-203.

Yoshihara, S., K. Susuki, T. Suto and J. Fujita, 1979. Fluorescent antibody studies on the distribution of antigens in Fasciola s.p. with specific antisera against antigens of agar-gel precipitates. Jap. J. Vet. Sci., 41: 227-233.

Yoshihara, S., N. Taira and K. Susuki, 1981. Antigenic comparison among several developmental stages of Fasciola sp. Jp. J. Vet. Sci., 43: 699-707.

Zimmerman, G.L., L.W. Jen, J.E. Cerro, K.L. Farnsworth and R.B. Westcott, 1982. Diagnosis of Fasciola hepatica infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 43: 2097-2100.

## 7. Resumen

Con el fin de caracterizar los componentes antigénicos del antígeno somático (AS) y del antígeno metabólico (AM) de Fasciola hepatica adulta, se analizaron los antígenos por inmunoelectroforesis (IEF), inmunoelectroforesis cruzada (IEC) y por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). Para estudiar la variación de la respuesta inmune durante una infección experimental, así como para determinar cuales de los componentes de ambos antígenos son reconocidos por animales infectados experimentalmente, 10 borregos fueron infectados oralmente con metacercarias del parásito, y 5 animales se dejaron como testigos sin infectar. Se tomaron muestras de suero antes de la infección y a las 2, 4, 6, 8 y 10 semanas postinfección (p.i.). Los sueros se utilizaron en distintas pruebas serológicas: hemoaglutinación pasiva (HP), contrainmunoelectroforesis (CIE), inmunoelectroforesis (IEF), difusión doble (DD) e inmunoensayo en capa delgada (ICD), así como en la prueba de inmunoelectrotransferencia (IET).

Los resultados indican en el AS la presencia de 48 bandas en PAGE teñida por la técnica de impregnación argéntica, siendo los componentes mas abundantes los de peso molecular de 97, 85, 55, 52, 31-32, 25-26, 21 y 13 Kd. La IEF con un suero de ovino hiperimmune anti-AS,

revela la presencia de 6 líneas de precipitación. La IEC mostró 17 arcos de precipitación con el suero hiperinmune de ovinos. En el AM fue posible identificar 23 bandas en PAGE y los componentes mas abundantes fueron los de peso molecular de 54, 48-49, 32-34, 24-25, 20-21 y 14 Kd. La IEF revela la presencia de 10 líneas de precipitación con este mismo suero. La prueba de IET realizada con suero de ovino hiperinmune permitió detectar que el ovino hiperinmune anti-AS reconoce 28 componentes del AS, y el ovino hiperinmune anti-AM reconoció 19 componentes del AM.

Los resultados obtenidos con las pruebas serológicas en el curso de la infección, indican que ICD es la prueba que detecta primero a los ovinos infectados (90% de animales positivos a partir de la segunda semana p. i.), por lo que resulta una prueba muy conveniente para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Las pruebas de DD, CIE así como la IEF, detectaron animales positivos a partir de la cuarta semana p.i.; el comportamiento de los dos antígenos utilizados fue similar en todas las pruebas excepto en la HP, que detectó animales positivos a partir de la octava semana con el AS y de la segunda semana con el AM.

Por medio de la IET se determinó que los ovinos reconocen mas bandas del AS que del AM. El número máximo de bandas se encontró en la semana 8 p.i. (26 bandas con AS y 10 con AM). Los ovinos testigo reconocieron numerosos componentes de ambos antígenos, pero a partir de la segunda semana p.i., los animales infectados identificaron un mayor número de bandas que los testigos. Cuando se dividieron los componentes antigénicos en intervalos de peso molecular, se observó que los ovinos infectados, respecto de los animales testigo, detectan un mayor número de antígenos cuando su peso molecular es mayor de 90 Kd con el AS, y entre 46 y 90 Kd con el AM. No existe diferencia en cuanto a número de bandas identificadas por ambos grupos de borregos cuando el peso molecular es menor de 46 Kd, pero si es posible advertir la presencia de una banda de peso molecular de 20 a 23 Kd con el AS y de 23 a 27 Kd con el AM, que aumenta de intensidad y grosor con el tiempo. Esta banda se comienza a apreciar desde la cuarta semana p.i.