ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS ANTIGENOS SOMATICOS DE Fasciola hepatica EN EL DIAGNOSTICO DE FASCIOLASIS EN BOVINOS *

CAMILA ARRIAGA DE MORILLA [1]
ALFREDO GÓMEZ ARROYO [1]
ALEJANDRO SÁNCHEZ ALBARRÁN [2]
ALBERTO ESTRADA CORREA [1]
ANTONIO MORILLA GONZÁLEZ [1]

Resumen

Se prepararon dos antígenos somáticos de *Fasciola hepatica* adulta de origen bovino: un extracto salino crudo y un extracto salino deslipidizado. Estos antígenos se evaluaron en las pruebas de difusión doble en agar, hemoaglutinación pasiva, intradermorreacción e inmunoensayo en capa delgada y se determinó la especificidad y sensibilidad para cada prueba. Para esto se utilizaron 12 bovinos infectados naturalmente con *F. hepatica* localizados en Tulancingo, Hidalgo, zona de alta incidencia de fasciolasis, y 20 bovinos negativos a *F. hepatica* en exámenes coproparasitoscópicos, provenientes de Hueytamalco, Puebla, zona de baja incidencia. La prueba de inmunoensayo en capa delgada con el extracto salino dio los mejores resultados. En general el ASD mostró mayor especificidad en las pruebas y el AS mayor sensibilidad.

Introducción

Durante los últimos años se han descrito diversos métodos de diagnóstico inmunológico de la fasciolasis. Uno de los problemas que se presentan al tratar de establecer estas técnicas es determinar qué tipo de antígeno se debe utilizar, ya que existen diversos métodos de extracción (Capron *et al.*, 1964; Lang y Hall, 1977; Taillez y Korach, 1970; Gundlach, 1971; Van Tiggele, 1978) y el comportamiento de los diferentes tipos de antígenos en las distintas pruebas inmunológicas puede variar.

En bovinos se han utilizado principalmente los extractos salinos crudos (Van Tiggele, 1978; Burden y Hammet, 1979, Farrel *et al.*, 1981), extractos salinos deslipidizados (Koch, 1970; Doyle, 1973) y en algunos casos antígenos purificados (Blancou, Bouchet y Tailliez, 1976; Robert *et al.*, 1980) o antígenos metabólicos (Van Tiggele, 1978). Las pruebas realizadas con estos antígenos han sido las de intradermorreacción, precipitación en agar, hemoaglutinación pasiva, fijación del complemento, contrainmunoelectroforesis y enzima inmunoensayo. Sin embargo, es difícil concluir cuáles son el antígeno y la prueba más adecuados para el diagnóstico de la fasciolasis debido a la diversidad de resultados y a que muchas de estas pruebas se han establecido en animales infectados experimentalmente y los resultados son diferentes cuando se aplican a animales infectados naturalmente (Van Tiggele, 1978).

En estudios recientes con bovinos infectados en el campo (Arriaga *et al.*, 1983) se comparó la sensibilidad y especificidad de las pruebas de difusión doble en agar (DD), hemoaglutinación pasiva (HP), contrainmunoelectroforesis (CIE), intra-

Recibido para su publicación el 5 de mayo de 1983.

* Proyecto parcialmente financiado por el CONACYT.

[1] Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, Km 15.5 Carretera México-Toluca, México 05110, D.F. Méx.

[2] Departamento de Epizootiología del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, SARH, Km 15.5 Carretera México-Toluca, México 05110, D.F. México.

dermorreacción (IDR) e inmunoensayo en capa delgada (ICD), usando un antígeno somático o uno metabólico de *F. hepatica*, y se observó que los mejores resultados se obtuvieron con las pruebas de ICD e IDR y no hubo diferencia entre los antígenos.

El objetivo del presente trabajo fue comparar dos de los antígenos más comúnmente utilizados, un extracto salino crudo y uno deslipidizado, en las pruebas de HP, DD, ICD e IDR y determinar cuál de estos antígenos proporciona una mejor especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de la fasciolasis en bovinos.

Material y métodos

Preparación de antígenos. Se prepararon dos tipos de antígeno somáticos a partir de ejemplares adultos de *F. hepatica*, obtenidos de hígados de bovino procedentes del rastro: un extracto salino crudo (AS) y un extracto salino deslipidizado (ASD), según técnicas ya establecidas (Crude Extracts of Parasites, 1975).

Determinación de proteína. La cantidad de proteína de los antígenos se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Preparación de antisueros. Para obtener los antisueros, se inmunizaron conejos con 5 mg de proteína del antígeno AS o ASD mezclados con adyuvante completo de Freund, siguiendo el esquema ya descrito (Bautista y Morilla, 1981). Se utilizaron 2 conejos Nueva Zelanda blancos de 2 kg de peso para cada uno de los antígenos.

Animales. Se obtuvieron sueros y muestras de heces de 30 bovinos localizados en la zona de Tulancingo, Hgo., que se considera como una zona enzoótica de fasciolasis. En el examen coproparasitoscópico sólo 12 animales fueron positivos. Por lo tanto, se seleccionaron los sueros de estos animales para las pruebas inmunológicas de diagnóstico. Como control negativo se utilizaron sueros de 20 bovinos localizados en el Centro Experimental Pecuario de Hueytamalco, Puebla, considerado como zona donde existe ocasionalmente fasciolasis. Estos animales fueron negativos en el examen coproparasitoscópico.

Hemoaglutinación pasiva (HP). Se siguió la técnica descrita (Indirect Haemagglutination Test 1975). Para esto se utilizaron glóbulos rojos de borrego tanizados y sensibilizados con cada uno de los antígenos. Con los sueros se hicieron diluciones dobles seriadas y se consideraron como positivos aquellos que aglutinaron hasta la dilución de 1:64 o mayor.

Difusión Doble en Agar (DD). Se siguió la técnica de Ouchterlony (1973) utilizando geles de agar Noble al 1.2% disuelto en una solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS), pH 7.2,0.15 M. Se aplicaron las muestras de antígeno y suero y las observaciones se efectuaron a las 24, 48 y 72 hs.

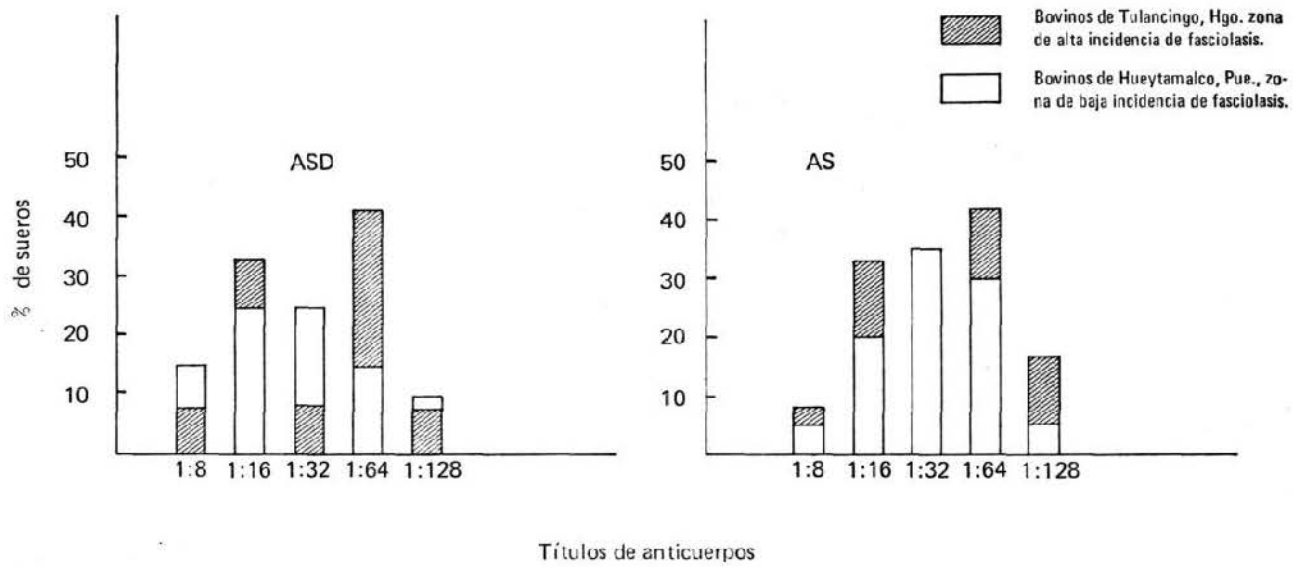
Inmunoensayo en capa delgada (ICD). Se siguió la técnica descrita anteriormente (Gómez, Arriaga y Morilla, 1979), utilizando cajas de Petri de poliestireno sensibilizadas con una concentración óptima de antígeno de 180 μg/ml.

Prueba intradérmica (IDR). Todos los animales fueron inoculados por vía intradérmica en las dos zonas que forman el pliegue anocaudal. En un punto se inoculó 0.1 ml de AS (1.4 mg de proteína), en en otro 0.1 ml de ASD (1.4 mg de proteína), y en otro, como control. 01 ml de PBS, pH 7.2, mediante una jeringa de turberculina con agujas del núm. 27, 1/4". La medición de la respuesta inflamatoria se hizo en milímetros con un vernier y las lecturas fueron tomadas antes de la inoculación de los antígenos para obtener el grosor normal de la piel y, subsecuentemente a los 30 minutos y 1, 3, 5, 6, 24 y 48 horas postinoculación de los antígenos en los animales de Tulancingo, y 1, 2, 4 y 6 horas postinoculación en los de Hueytamulco. Se consideró positivo un animal cuando se obtuvo una inflamación mayor de 8 mm (Lebrija *et al.*, 1980).

La sensibilidad o capacidad de las pruebas para detectar cantidades mínimas de

Figura 1

Porcentajes de los títulos de anticuerpos obtenidos en la prueba de hemoaglutinación pasiva con sueros de bovinos, utilizando un antígeno somático crudo y uno deslipidizado de *Fasciola hepatica*



AS Antígeno somático crudo
ASD Antígeno somático deslipidizado.

anticuerpos, y la especificidad o capacidad de discriminar a los animales infectados de los no infectados, fueron obtenidas de los resultados de las pruebas inmunológicas utilizadas de acuerdo con las siguientes fórmulas (Rosales, 1980):

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Núm. de animales con fasciolasis positivos a la prueba}}{\text{Núm. total de animales con fasciolasis}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Núm. de animales sin fasciolasis negativos a la prueba}}{\text{Núm. total de animales sin fasciolasis}} \times 100$$

Resultados

El contenido de proteína fue de 14 mg/ml para AS y 56 mg/ml para ASD. Con el objeto de estandarizar las pruebas se utilizó la misma concentración de antígeno en todas ellas (14 mg/ml).

La figura 1 muestra los porcentajes de los títulos de anticuerpos obtenidos en las pruebas de HP con los sueros de bovino utilizando los antígenos AS o ASD. Los animales con fasciolasis mostraron en su mayoría títulos del 1:64 tanto con AS como con ASD, mientras que los animales de la zona de baja incidencia dieron en su mayoría títulos de 1:16 y 1:32 con ASD y de 1:32 con AS.

En la figura 2 se muestra la respuesta inflamatoria promedio de la piel en la prueba de IDR. Los bovinos infestados tuvieron una respuesta inflamatoria con valores máximos entre 3 y 5 horas postinoculación. En los animales libres de fasciola provocó una respuesta inflamatoria entre 1 y 2 horas después de la inoculación y luego disminuyó. La respuesta inflamatoria provocada por los dos antígenos fue semejante, aunque en las primeras horas se observó una inflamación ligeramente mayor con AS que con ASD en los animales infectados. En ninguno de los animales hubo respuesta inflamatoria detectable a las 24 o 48 horas postinoculación de los antígenos. Tampoco se observó inflamación en la zona inoculada con PBS.

Los porcentajes de animales positivos detectados por las distintas pruebas de diagnóstico y los porcentajes de sensibilidad y especificidad de cada una de ellas se mues-

CUADRO 1

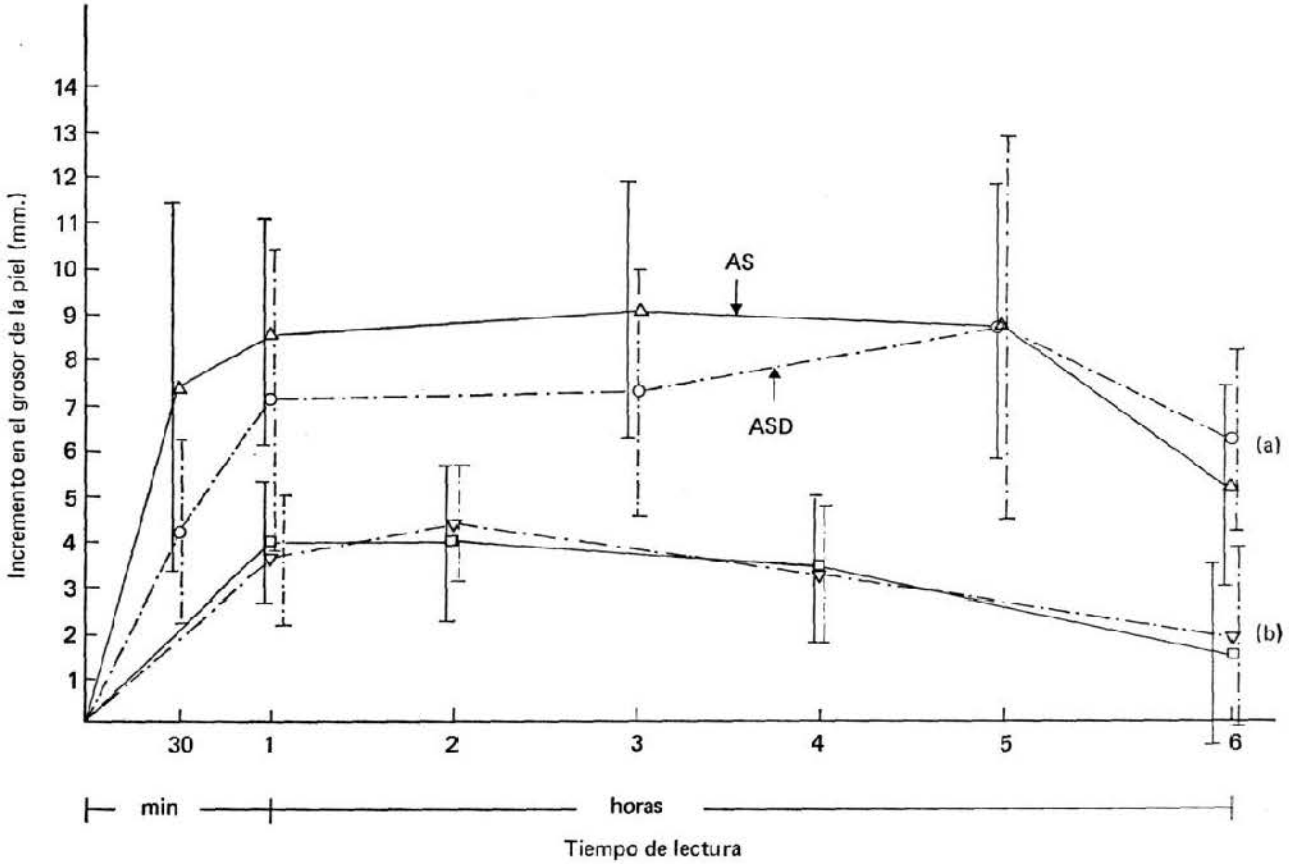
Porcentaje de bovinos positivos a Fasciola hepatica, **detectados por distintas pruebas de diagnóstico.**

	AS[1]				ASD[2]			
	Tulancingo[3]		Hueytamalco[4]		Tulancingo		Hueytamalco	
	%	+/Total	%	+/Total	%	+/Total	%	+/Total
Hemoaglutinación Pasiva (HP)	58	7/12	40	8/20	50	6/12	10	2/20
Difusión Doble en Agar (DD)	33	4/12	5	1/20	25	3/12	0	0/20
Intradermorreacción	75	9/12	50	10/20	92	11/12	35	7/20
Coproparasitoscópico	100	12/12	0	0/20				

[1] AS = antígeno somático crudo.
[2] ASD = antígeno somático desilpidizado.
[3] Zona de alta incidencia de fasciolasis.
[4] Zona de baja incidencia de fasciolasis.

Figura 2

Respuesta inflamatoria de la piel de bovinos inoculados en el pliegue anocaudal con un antígeno somático crudo y uno deslipidizado de *Fasciola hepatica*



(a) – 12 bovinos de Tulancingo, Hgo., zona de alta incidencia de fasciolasis.
(b) – 20 bovinos de Hueytamalco, Pue., zona de baja incidencia de fasciolasis.
AS Antígeno somático crudo
ASD Antígeno somático deslipidizado

tran en los Cuadros 1 y 2. La mayor sensibilidad se obtuvo con las pruebas de ICD con el antígeno AS (100%) y la de IDR con ASD (92%). Sin embargo, la especificidad de estas pruebas fue relativamente baja, ya que se tuvieron valores de 50% con AS y 65% con ASD en la prueba de IDR y de 75% con AS y 40% con ASD en ICD.

hepatica encontrándose que no hubo mayor diferencia entre la especificidad y sensibilidad de las pruebas, usando cualquiera de los antígenos (Arriaga *et al.*, 1983). En el presente trabajo se comparó el mismo antígeno somático con un extracto salino deslipidizado que es otro de los antígenos más comúnmente usados. Los resultados obtenidos mostraron que la sensibilidad

CUADRO 2

Porcentaje de sensibilidad y especificidad de las distintas pruebas de diagnóstico en bovinos utilizando dos antígenos de Fasciola hepatica

Pruebas	% Sensibilidad(a)		% Especificidad(b)	
	AS(c)	ASD(d)	AS	ASD
Hemoaglutinación pasiva (HP)	58	50	60	90
Difusión doble en agar (DD)	33	25	95	100
Inmunoensayo en capa delgada (ICD)	100	83	75	40
Intradermorreacción (IDR)	75	92	50	65

(a) Sensibilidad = $\frac{\text{Núm. de animales con fasciolasis positivos a la prueba} \times 100}{\text{Núm. total de animales con fasciolasis}}$

(b) Especificidad = $\frac{\text{Núm. de animales sin fasciolasis negativos a la prueba} \times 100}{\text{Núm. total de animales sin fasciolasis}}$

(c) AS = antígeno somático crudo.

(d) ASD = antígeno somático deslipidizado.

La prueba que mostró mayor especificidad fue DD (100% con ASD y 95% con AS).

No hubo mayor diferencia en sensibilidad de las pruebas de HP y DD utilizando AS o OSD. Sin embargo, en la prueba de ICD se obtuvo mayor sensibilidad con AS (100%) que con ASD (83%) y en IDR fue mayor la sensibilidad con ASD (92%) que con AS (75%).

Discusión

Al tratar de establecer las técnicas inmunológicas para el diagnóstico de *F. hepatica* es importante contar con el antígeno adecuado.

En estudios recientes se compararon un antígeno somático y uno metabólico de *F.*

fue ligeramente mayor utilizando AS mientras que la especificidad fue mayor con ASD, excepto por IDR donde la sensibilidad fue mayor con ASD (92%) y en ICD donde la especificidad fue mayor con AS (75%) (Cuadro 2).

En cuanto a los resultados obtenidos con las distintas pruebas, ICD fue la que mostró mayor sensibilidad aunque la especificidad fue sólo de 75%. Gómez Arriaga y Morilla (1979) y Arriaga *et al.* (1983), también encontraron alta sensibilidad de la prueba en bovinos y en forma semejante Nilsson *et al.* (1980), encontraron elevada sensibilidad de ICD en el diagnóstico de Esquistosomiasis en humanos.

La sensibilidad relativamente baja de la prueba de HP (Cuadro 2) y los títulos bajos (Fig. 1) concuerdan con los resultados

obtenidos en otros trabajos (Robert *et al.*, 1980; Arriaga *et al.*, 1983). Por otro lado Van Tiggele (1978) obtuvo buenos resultados con esta prueba en bovinos, pero observó mucha variación en los títulos, a través del año con períodos donde se obtuvieron títulos muy bajos.

La prueba de DD fue la de menor sensibilidad pero mayor especificidad, lo que concuerda con lo observado anteriormente (Blancou, Bouchet y Daynes, 1971; Blancou, Bouchet y Tailliez, 1976; Van Tiggele, 1978; Arriaga *et al.*, 1983) con animales infectados naturalmente. Por el contrario, la prueba parece tener mayor sensibilidad en animales infectados experimentalmente (Doyle, 1973).

En lo que respecta a los resultados de la prueba de IDR, éstos concuerdan con trabajos anteriores (Lebrija *et al.*, 1981; Arriaga *et al.*, 1983) en los que se determinó que los mejores tiempos para efectuar la lectura se encuentran entre los 20 minutos y las 4 horas postinoculación.

La alta sensibilidad y baja especificidad de la IDR ha sido reportada también por Pautrizel *et al.* (1962), y por Arriaga *et al.* (1983). Sin embargo, en el presente trabajo la especificidad fue menor que la encontrada anteriormente (Arriaga *et al.*, 1983), lo que podría explicarse con el hecho de que los animales negativos procedían de una zona donde se encuentra ocasionalmente *Fasciola*, y aunque los animales seleccionados fueron negativos en prueba coproparasitoscópica cabe la posibilidad de que hubieran estado alguna vez en contacto con el parásito.

En este trabajo se observó que el antígeno AS parece ser el más adecuado para la prueba del ICD, mientras que ASD da mejores resultados con la prueba de IDR. En HP y DD el comportamiento de los antígenos es semejante aunque la especificidad parece ser ligeramente mayor con ASD. En general, ASD mostró una mayor especificidad y AS una mayor sensibilidad en las pruebas. Por otra parte, la prueba del ICD utilizando AS parece ser adecuada para diagnóstico de fasciolasis en bovinos y podría ser usada en combinación con una prueba muy específica como DD para poder eliminar los falsos positivos.

Summary

Two somatic antigens were prepared from adult *Fasciola hepatica* of bovine origen: a crude saline extract (AS) and a delipidized saline extract (ASD). These antigens were evaluated for the diagnosis of fascioliasis in bovines by using the following tests: double immunodiffusion (DD), pasive haemagglutination (HT), thin layer immunoassay (TIA), intradermal test (IDT) and the sensitivity and especificity of each test were calculated. Twelve bovines naturally infected with *F. hepatica* from Tulancingo, State of Hidalgo, México, a high incidence area, and 20 bovines that were negative in coproparasitoscopic tests, from Hueytamalco, State of Puebla, México, a low incidence area, were used in this experiment. The best results were obtained with TIA using the crude antigen.

In most of the test ASD showed higher specificity while AS had higher sensitivity.

Literatura citada

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

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.

Blancou, J., A. Bouchet et P. Daynes, 1971, Etude sur l'allergie, les anticorps précipitants et les anticorps fixant le complément au cours de l'infestation des bovines par *Fasciola gigantica*. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, *24*:373.

Blancou, J., A. Bouchet et R. Tailliez, 1976, Réactions a l'injection intradermique d'un spécifique du genre *Fasciola* chez les bovines. *Rev. Elev. Méd. Pays Trop.*, *29*:39.

Burden, D.J. and N.O. Hammet, 1978, Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for anti-

body to *Fasciola hepatica* in cattle. *Vet. Rec., 103*:158.

CAPRON, A., J. BICUET., P. TRAN VAN KY, et G. ROSE., 1964, Possibilités nouvelles dans le diagnostic immunologique de la distomatose humaine á *Fasciola hepatica*. Mise en évidence d'anticorps seriques par immunoélectrophorése. *Presse Méd., 72*:3103.

CRUDE EXTRACTS OF PARASITES, 1975, In: "Serodiagnosis of Parasitic Diseases", pp. 74-75, Edited by Parasitology Division, Center for Diseases Control. *U.S. Department of Health, Education and Welfare*, Atlanta, Georgia, U.S.A.

DOYLE, J.J., 1973, Precipitin response induced in calves by a single experimental infection with *Fasciola hepatica. Res. Vet. Sci., 15*:119.

FARREL, C.J., D.T. SHEN, R.B. WESCOTT, B.Z. LANG, 1981, An Enzime-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Am. J. Vet. Res., 42*:237.

GÓMEZ ARROYO A., C. ARRIAGA DE MORILLA, y A. MORILLA GONZÁLEZ, 1979, Evaluación preliminar de la prueba de inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico serológico de la fasciolasis en animales. *Veterinaria Méx., 10*: 181.

GUNDLACH, J.L., 1971, Studies on the serological activity of *Fasciola hepatica* L. Antigens. *Acta Parasitol. Pol., 19*:9.

Indirect haemagglutination (IHA) test, 1975, In: Serodiagnosis of Parasitic Diseases, pp. 5-12. Edited by Parasitology Division, Center for Disease Control. *U.S. Department of Health, Education and Welfare*, Atlanta, Georgia, USA.

KOCH, H.W., 1970, Serological test for the early diagnosis of fasciolasis in cattle. *Inaug. Diss. Vet. Med. Fak. Fraire Univ.* Berlin, pp. 1-28.

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

LEBRIJA DE IBARRA, A., A. GÓMEZ ARROYO, C. ARRIAGA DE MORILLA, F. IBARRA, y A. MORILLA GONZÁLEZ, 1981, Algunas características de la prueba de intradermorreacción para el diagnóstico de la fasciolasis de los bovinos. *Veterinaria Méx., 12*:5.

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDAL, 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem., 193*: 265.

NILSSON L.A., L. BJEREK, A. CAPRON, A. EDWING, and O. OUCHTERLONY, 1980, Application of thin layer immunoassay (TIA) as a serodiagnostic tool in schistosomiasis. A preliminary report. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 74*:201.

OUCHTERLONY, O., 1973, Handbook of Immunodifussion and immunoelectrophoresis. *Ann Arbor Science Publishers*, Inc., 6th printing.

PAUTRIZEL, R., J. BAILINGER, J. DURET et J. TRIBOULY, 1962, Utilization d'un antigene distomien délipidé dans le diagnostique allergique de la distomatose a *Fasciola hepatica. Rev. Immunol. Thér. Microb., 26*:167.

ROSALES, C., 1980. Serocpidemiología e inmunidad de hato. En: Memorias del curso de actualización en inmunoparasitología veterinaria, *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. S.A.R.H.*, México, D.F.

ROBERT, R., P. LEYNIA DE LA JARRIGE, D. CHABASSE, C. MAHASA, C. BIZON, et H. GENTHON, 1980, Contribution au diagnostic immunologique de la fasciolose a *F. hepatica* chez les bovins: recherches d'Ag fraction II et d'Ac anti fraction II. *Rec. Med. Vét., 156*:533.

TAILLIEZ, R. et S. KORACH, 1970, Les antigens de *Fasciola hepatica*. Isolement et caractérization d'un antigene spécifique du genere. *Annals Inst. Pasteur, 118*:61.

VAN TIGGELE L.J., 1978, Host-parasite relation in *Fasciola hepatica* infections. Immunopathology and diagnosis of liver fluke disease in ruminants, PhD thesis, *Rijksuniversiteit te Leiden*, The Netherlands.