

DINAMICA DE LA RESPUESTA SEROLOGICA DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON *Fasciola hepatica*.

A. RUIZ-NAVARRETE M.¹
C. ARRIAGA DE MORILLA¹
A. GOMEZ ARROYO¹
C.R. BAUTISTA¹
A. MORILLA¹

RESUMEN

Al aplicar pruebas serológicas de diagnóstico en animales infectados con *Fasciola hepatica* es frecuente encontrar variaciones en los títulos de anticuerpos, lo cual podría ser atribuido a los cambios de niveles de anticuerpos que ocurren durante la infección. Para poder entender mejor estos cambios e interpretar más adecuadamente las pruebas de diagnóstico, se determinó estudiar cómo varía la respuesta inmune en ovinos infectados experimentalmente mediante las pruebas de difusión doble en gel (DD), hemoaglutinación pasiva (HP), inmunolectroforesis (IEF), contrainmunolectroforesis (CIE) e inmunoensayo en capa delgada (ICE), durante las primeras 15 semanas postinfección. Se utilizaron dos diferentes antígenos: somático y metabólico de *Fasciola hepatica*. Los resultados indicaron que ICD fue la prueba que primera detectó a los ovinos infectados (100% de animales positivos a

partir de la primera semana), por lo que parece ser muy adecuada para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Las pruebas de DD y CIE mostraron títulos apreciables de anticuerpos anti-*Fasciola* a partir de la quinta semana mientras que la de HP mostró títulos a partir de la séptima semana. Se sugiere que para seleccionar las pruebas serológicas de diagnóstico de fasciolosis, es importante tener en consideración los resultados obtenidos en este trabajo.

INTRODUCCION

Se han descrito diversos métodos inmunológicos para diagnosticar la fasciolosis en ovinos. Entre las pruebas adaptadas para este fin, se encuentran: inmunolectroforesis (IEF) (Capron *et al.*, 1964), difusión doble en agar (DD) (Kadhim y Alattar, 1974), contrainmunolectroforesis (CIE) (Hillyer, 1975), hemoaglutinación pasiva (HP) (Van Tiggele y Over, 1976), fijación de complemento (FC), inmunofluorescencia directa (IF e indirecta (IFI), reacción intradérmica (IDR) (Patnaik y Das, 1961) e inmunoensayo en capa delgada (ICE) (Gómez

¹ Depto. de Inmunología. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias SARH, Carretera México-Toluca Km. 15.5, 05110, México, D. F. Proyecto parcialmente financiado por CONA-CYT.

et al., 1979). Sin embargo, son pocos los estudios en los que se han determinado el desarrollo de los títulos de anticuerpos en animales 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 las 18 semanas postinfección. Por otro lado, Bénex et al., (1972) en ovinos infectados con 250 metacercarias, determinaron las tasas 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 fue el método empleado. Las tasas 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 (tercer 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 aumentaron entre las 6 y 12 semanas y disminuyeron a partir de la semana 16.

Van Tiggele y Over (1976) con un antígeno deslipidizado 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 tremátodo se detectaron en las heces a partir de la semana

11. En un trabajo posterior, Van Tiggele (1978) utilizó cuatro grupos de ovinos, que recibieron de 400 a 1200 metacercarias por animal y observó la aparición de anticuerpos 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 posteriores a la infección. Con objeto de determinar cómo se modifican las poblaciones de anticuerpos, Hanna (1980) hizo reaccionar suero proveniente de ovinos con infecciones de 0 a 30 semanas de duración, con secciones de parásitos obtenidos 1, 6 y 29 semanas después de la infestación, encontró que los anticuerpos con afinidad por el epitelio intestinal, sistema excretor y tegumento 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 dirigidos 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 biliarés en el suero, indicó que la respuesta de anticuerpos alcanza su máximo cuando las

fasciolas inmaduras provocan mayor daño al parénquima hepático, como resultado de su actividad migratoria. Los niveles de anticuerpos disminuyen una vez que los tremátodos se establecen en el ducto biliar.

Nájera (1981), en borregos infectados oralmente con 200 metacercarias, 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 predominante fue IG M. Por inmunofluorescencia indirecta detectó anticuerpos de la clase IgG desde la tercera semana, con títulos máximos entre la séptima y décima semana.

Recientemente, 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 en el tratamiento de la misma infección. El objetivo del presente trabajo fue determinar cómo varía la respuesta inmune en las pruebas HP, DD, CIE, IDR e ICD, durante las primeras 15 semanas después de la infección experimental, cuando se utilizan dos diferentes antígenos de *Fasciola hepatica*, uno somático y otro metabólico.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron 13 borregos de raza Tabasco de 2 a 3 años de edad, los cuales fueron infectados oralmente con 150 metacercarias por animal. Se tomaron muestras de suero antes de la infección y a 1, 5, 7, 10, 11 y 15 semanas después de la infección. Posteriormente los borregos fueron sacrificados y se determinó el número de fasciolas recupera-

das en cada animal. Además, 5 animales se dejaron como testigo sin infectar; estos animales fueron sangrados a las 0, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas del experimento.

Preparación de antígenos. Se prepararon dos tipos de antígenos a partir de ejemplares adultos de *Fasciola hepatica* obtenidos de hígados de bovino procedentes del rastro: un antígeno somático (AS) y un antígeno metabólico o de excreciones y secreciones (AM), de acuerdo con las técnicas descritas anteriormente (Arriaga et al., (1983).

Examen coproparasitológico. 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.

Difusión doble en agar (DD). Se utilizaron geles de agar Noble (Difco Laboratories) al 1% en solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF), pH 7.2, con 10% de NaCl según la modificación de Van Tiggele (1978).

Contrainmunolectroforesis (CIE). Se siguió la técnica ya descrita (Arriaga et al., 1983) utilizando geles de agar Noble (Difco Laboratories) al 1.2% en solución salina amortiguada de barbituratos, pH 8.6, fuerza iónica 0.05 (Sigma Chemical Company).

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

Inmunoensayo en capa delgada (ICD). Se utilizó la técnica descrita anteriormente (Gómez, Arriaga y Morilla, 1979). Se hicieron diluciones dobles seriadas de los sueros y se

consideró positivo a un suero, cuando se formaba una gota visible en la dilución 1:8.

Prueba Intradérmica (IDR). Esta prueba se llevó a cabo una sola vez, 14 semanas después de la infección. En cada animal se rasuró el cuello de ambos lados; en un lado se inoculó por vía intradérmica 0.1 ml de AS de *Fasciola hepática* (1.4mg/ml proteína) y en otra zona SSAF pH 7.2, estéril. Del otro lado del cuello se inoculó AS solamente. Las lecturas se realizaron a los 0, 30 y 60 min y a las 2, 3, 4, 5 y 6 horas utilizando un vernier. Se determinó que la prueba fue positiva cuando la reacción inflamatoria fue mayor de 5 mm (Gómez et al., 1981).

RESULTADOS

El curso de la infección en los animales inoculados con metacercarias fue semejante a lo que se ha descrito en la literatura. El promedio de fasciolas recuperadas en el hígado fue de 10.91 ± 0.2626 y los animales

empezaron a excretar huevecillos a partir de la décima semana.

La Figura 1 muestra la variación con el tiempo de infección del porcentaje de ovinos positivos a *F. hepática*, en las distintas pruebas de diagnóstico al utilizar el AS. Con la prueba de ICD hubo 100% de animales positivos a partir de la primera semana postinfección, y se mantuvo durante las siguientes catorce semanas. Con CIE hubo 50% de animales positivos en la quinta semana postinfección y fue aumentado el número hasta llegar a 90% en la semana 15. Con la prueba de DD se obtuvo 83% de positivos en la quinta semana y 100% de positivos a partir de la semana 7. Por HP se detectó 8% de positivos en la semana 7, y fue aumentando en las semanas posteriores hasta llegar a 80% en la semana 15.

Con el AM fue también ICD la primera prueba en detectar el 92% de animales positivos a partir de la

Figura 1

Variación con el tiempo de infección de los porcentajes de ovinos positivos a *F. hepática* detectados por distintas pruebas de diagnóstico con un antígeno somático. (AS)

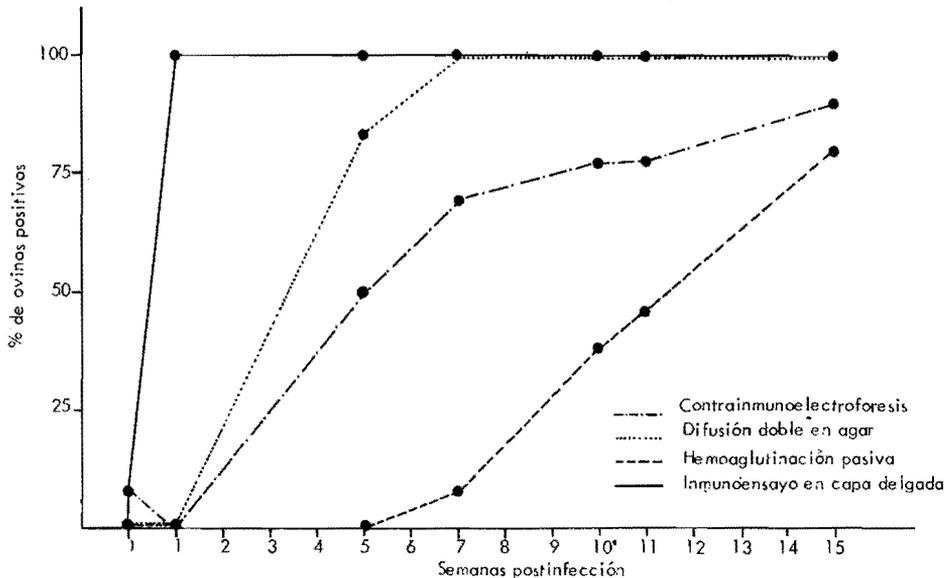
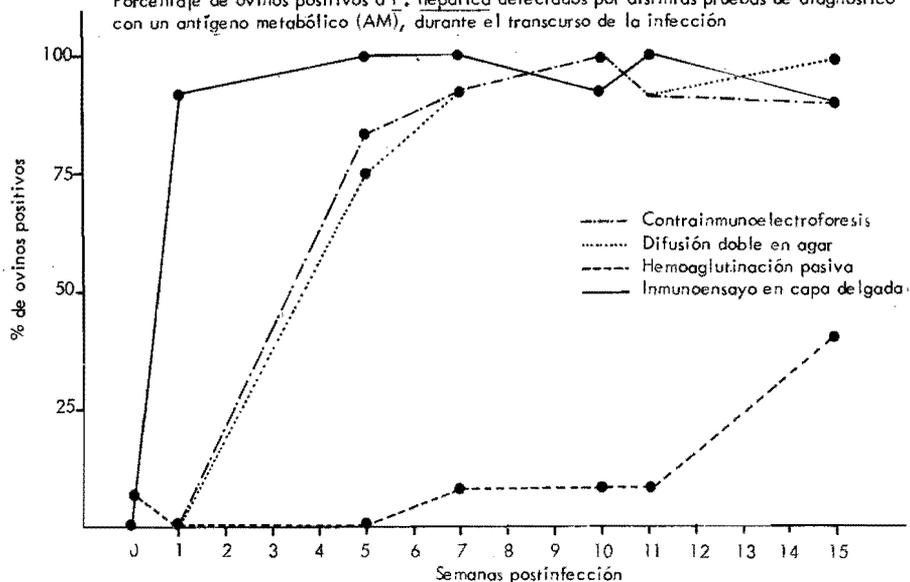


Figura 2

Porcentaje de ovinos positivos a *F. hepatica* detectados por distintas pruebas de diagnóstico con un antígeno metabólico (AM), durante el transcurso de la infección



primera semana, porcentaje que se mantuvo en las semanas siguientes (Figura 2). Con la prueba de CIE se tuvo 83% de animales positivos en la quinta semana, y aumentó a 100% en las semanas sucesivas. La

las semanas siguientes similares se obtuvieron con la prueba de DD, ya que los porcentajes se elevaron de 675% en la semana 5 a 100% en las semanas sucesivas. La

Figura 3

Promedio de los títulos de anticuerpos obtenidos en la prueba de Hemaglutinación Pasiva en ovino: infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*, utilizando antígenos: somático (AS) y metabólico (AM).

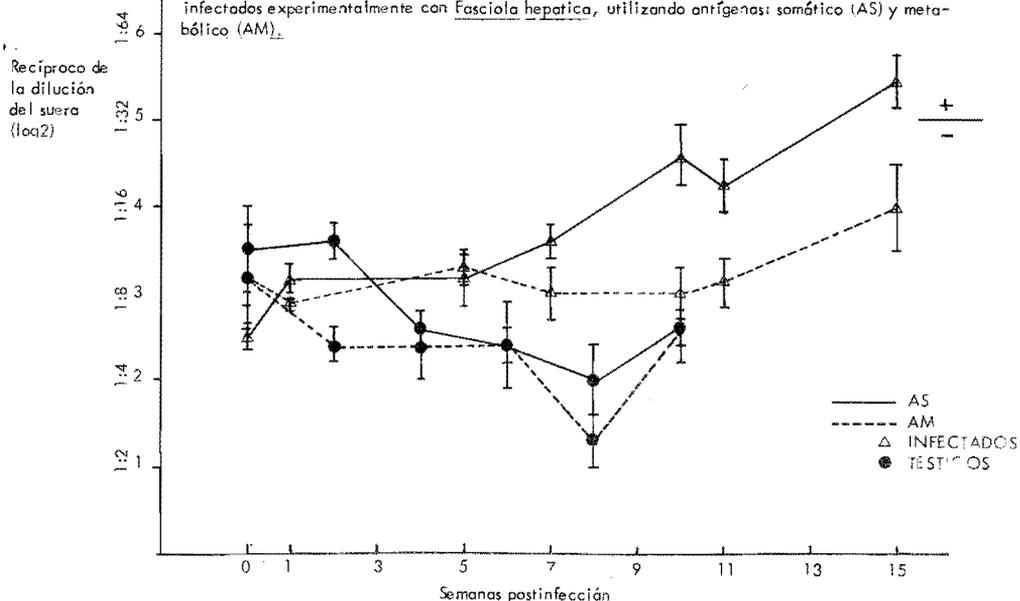
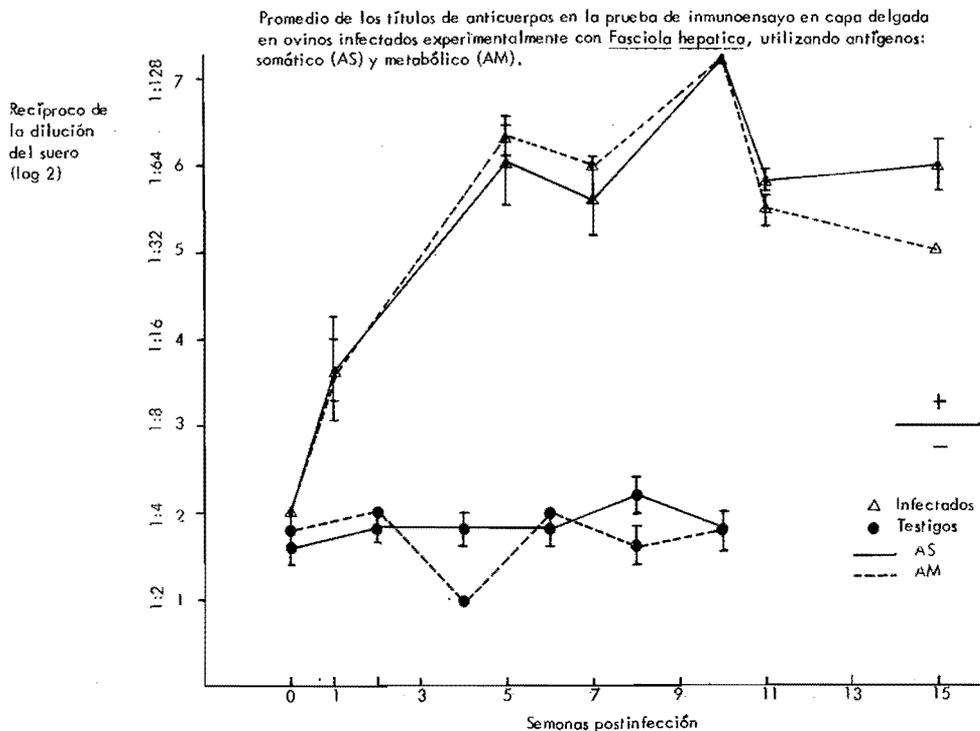


Figura 4

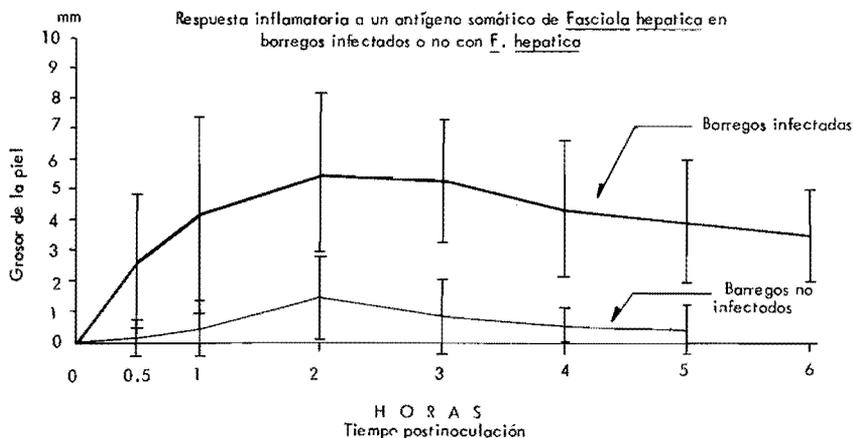


prueba de HP detectó solamente 8% de animales positivos en las semanas 7, 10 y 11, sólo hasta la semana 15 se obtuvo el 40% de positivos.

La Figura 3 muestra la variación de los títulos de anticuerpos obtenidos

con HP. Cuando se utilizó AS, los títulos permanecieron bajos durante las primeras 7 semanas y aumentaron a partir de este momento. Con el AM los títulos permanecieron bajos hasta la semana 11 y sólo a partir de la

Figura 5



semana 15 hubo incremento.

La figura 4 muestra la variación de los títulos de anticuerpos, obtenidos con ICD durante las semanas posteriores a la infección. A partir de la primera semana se encontró un marcado aumento en los títulos, los cuales llegaron a su valor más alto entre la quinta y la décima semana y disminuyeron desde la undécima semana. La respuesta con los 2 antígenos fue semejante.

Con respecto a la IDR los resultados indican que en los animales infectados experimentalmente, la reacción inflamatoria fue mayor que en los animales testigos. En los borregos infestados se observó que la inflamación fue aumentando paulatinamente a los 30 min y 1 hora postinoculación, hasta llegar a las 2 horas, en donde se presentó la reacción más intensa; posteriormente ésta fue disminuyendo a partir de las 3 horas, siguió así durante las 4, 5 y 6 horas y mantuvo los mismos niveles después de este tiempo. Por otro lado, en los ovinos controles se observó igualmente que el grado de inflamación también fue mayor a las 2 horas, pero es posible apreciar la diferencia que hay entre éstos y los animales infestados (Figura 5).

DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran cómo los títulos de anticuerpos detectados por las pruebas de ICD, DD, HP y CIE, aparecen y varían durante las 15 semanas del experimento. En general, los resultados con DD, HP y CIE concuerdan con lo informado por otros autores (Van Tiggele, 1978); sin embargo, en este trabajo los anticuerpos comenzaron a tener títulos apreciables más tardíamente al utilizar HP, probablemente debido a que se usó un menor número de metacercarias en la infestación.

El hecho de que se encuentre menor número de animales positivos

en el transcurso de la infección con el AM, sugiere que probablemente no se formen anticuerpos contra estos antígenos, ya que provienen de parásitos adultos; tal vez si se hubiera utilizado AM de parásitos juveniles, se hubiera detectado un mayor número de animales positivos.

Los resultados obtenidos indican que ICD permite observar la aparición de anticuerpos contra *F. hepatica* desde fases muy tempranas de la infestación (Figura 1 y 2). Esto apoya lo informado por Arriaga *et al.*, (1983) y por Gómez *et al.*, (1981), quienes demostraron que ICD es una prueba de alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos y bovinos.

Con respecto a la prueba intradérmica, los resultados indican que exclusivamente en los animales infectados se observa una reacción fuertemente positiva, en tanto que en los testigos la reacción es de menor intensidad.

Los datos obtenidos muestran nuevamente que el AS y el AM se comportan en forma semejante, como se ha informado anteriormente (Arriaga *et al.*, 1983), a excepción de la prueba de HP. Además confirman que ICD es una prueba muy adecuada para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos, ya que posee alta sensibilidad y porque permite el diagnóstico temprano de la enfermedad.

La variación que se observa en algunas de las pruebas al comparar estos resultados con los obtenidos en poblaciones abiertas, podría atribuirse a que en el campo, los borregos constantemente se reinfestan y las cargas parasitarias varían de acuerdo con la época de año; el haber un gran número de parásitos, los títulos de anticuerpos en algunas de las pruebas podrían disminuir, como ha sido demostrado por Garay *et al.*, (1983),

quienes encontraron que en animales muy parasitados los títulos eran bajos al compararlos con animales con menor número de parásitos. Esto en parte podría deberse a la formación de complejos inmunes circulantes, lo cual recientemente se ha informado que ocurre en borregos parasitados con *F. hepatica* (Arriaga et al., 1984).

SUMMARY

It is usually common to observe variations in the antibody titer when serologic tests are used for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in animals; this fact could be attributed to changes in the antibody levels which occur during infection. In order to understand these changes and to interpret better the performance of serologic tests, it was decided to study how the humoral immune response develops in sheep experimentally infected with *F. hepatica*. The tests utilized, during 15 weeks of infection, were: Double Immunodiffusion in gel (DD); Indirect Haemagglutination (IHA); Immunoelectrophoresis (IE); Counterimmunoelectrophoresis (CIE), ant Thin layer Immunoassay (TIA); two different antigens, obtained from adult *F. hepatica*, somatic and metabolic (excretion/secretion products) were used with the tests. The results indicated that TIA was the test which first detected anti-*Fasciola* antibodies in infected sheep (100% of positive animals in the first week after infection), and for this reason TIA seems to be appropriate to carry out the early diagnosis of fascioliasis. On the other hand, DD and CIE showed appreciable anti-*Fasciola* antibody titers at week 5 after infection, where as IHA at week 7 after infection. In order to select serologic test for the diagnosis of fascioliasis, it is suggested to take into account the results reported in this paper.

LITERATURA CITADA

ARRIAGA C., A. GOMEZ, 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. RUIZ-NAVARRETE, A. GOMEZ, M. FRAIRE, R. BAUTISTA y A. MORILLA. 1984. Detección de complejos inmunes en animales infectados con *Fasciola hepatica*. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1984*, p. 244.

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.

BENEX, J., J. GUILHON et R. BERNABE. 1972: Etude comparative de diverses méthodes de diagnostic Immunologique de la fasciolose hépato-biliaire expérimentale du mouton et influence du traitement sur la persistance des anticorps. *Bull Soc. Path. Exotique.* :116-127.

BOROJEVIC, D., JOVANOVIC, B. MOVSESI-JAN, M., 1973. Fluorescent antibody studies of *F. hepatica* infections. *Acta Veterinaria Beograd* 23:55-62.

CAPRON, A., J. BIGUET, P. TRAN VAN KY et E. ROSE, 1984. Possibilités nouvelles dans le diagnostic de la distomatose humaine a *Fasciola hepatica*. Mise en évidence d'anticorps seriques par Immunoelectrophorese. *Press Médicale*, 72:3103-3107.

GARAY E., R. ANGULO, A. GOMEZ y C.R. BAUTISTA. 1983. Especificidad y sensibilidad de diferentes pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de fascioliasis en ovinos. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1983*, pp 244-247.

GOMEZ ARROYO, A., C. ARRIAGA y A. MORILLA. 1979. Evaluación preliminar de la prueba de inmunoensayo en capa delgada para el diagnóstico serológico de la fascioliasis en ovinos. *Veterinaria, Méx.* 10:181-186.

GOMEZ A., C. ARRIAGA y A. MORILLA. 1981. Evaluación de los antígenos somático y metabólico de *F. hepatica* en las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fascioliasis en ruminantes. *Memorias de la XV Reunión Anual INIP SARH* p. 497-500.

- GOMEZ A., C. ARRIAGA, A. SANCHEZ, A. ESTRADA y A. MORILLA. 1984. Estudio comparativo de dos antígenos somáticos de *Fasciola hepatica* EN EL DIAGNÓSTICO DE FASCIOLASIS EN OVINOS. *Vet. Méx.* 15:193-198.
- HANNA R.E.B., 1980. *Fasciola hepatica*: An immunofluorescent study of antigenic changes in the tegument during development in the rat and sheep. *Exp. parasitol.* 50:103-114.
- HILLYER, G.V. 1975. Use of counterelectrophoresis to detect infections of *Fasciola hepatica* *J. Parasitol.* 61:557-559.
- KADHIM, J.K. and M. ALATTAR, 1974. Preliminary observations on antigen activity of *F. gigantica* by immunodiffusion test in sheep. *Br. Vet. J.* 130: Liv.
- KLIMENKO, V.V. 1971. A study of the dynamics of antibodies in experimental fascioliasis in sheep. *Helm. Abstr.* 43:5045.
- MOVSESIJAN, M., B. JOVANOVIĆ, O. ALUND and P. NANSEN. 1975. Immune response of sheep to *Fasciola hepatica* infection. *Res. Vet. Sci.* 18:171-174.
- NAJERA R. 1983. Respuesta inmune humoral en ovinos infectados con *Fasciola hepatica*. *Téc. Pec. Méx. Suplemento* 10:55-72.
- PATNAIK, B. and DAS, K.M. 1961. Diagnosis of fascioliasis in cattle by intradermal allergic test. *Cornell Vet.*, 51:113-123.
- 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.
- VAN TIGGELE, L.J. and H. J. OVER. 1976. Serological diagnosis of fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 1:239-248.
- VAN TIGGELE, L.J. 1978. Host-Parasite relations in *Fasciola hepatica* infections. Immunopathology and diagnosis of liver-fluke disease in ruminants. *Tesis Rijksuniversiteit te Leiden*. The Netherlands.