

INMUNIZACION INTRAPERITONEAL DE OVINOS CONTRA *Fasciola hepatica* CON ANTIGENOS DEL PARASITO ADULTO

CARLOS RAMON BAUTISTA GARFIAS ¹

ALFREDO GOMEZ ARROYO ²

ANGELA RUIZ-NAVARRETE MUÑOZ ²

ANTONIO MORILLA GONZALEZ ²

RESUMEN

En tres ocasiones se inyectaron por vía intraperitoneal antígenos somático (AS) o metabólico (AM) (productos de excreción/secreción) de *Fasciola hepatica* adulta de origen bovino, mezclados con adyuvante completo de Freund (ACF), a ovinos libres del parásito. Una semana después de la última inoculación, los animales fueron desafiados con 150 metacercarias (origen bovino) por ovino y la resistencia a la infección se determinó 15 semanas después por medio del conteo de parásitos adultos en los conductos biliares de los borregos sacrificados. Sels de siete animales tratados con AM mostraron resistencia, no se observó protección en un ovino de ese mismo grupo ni en sels borregos tratados con AS, siete animales inoculados con ACF solo y cinco ovinos testigo, con base en el promedio de la carga parasitaria de cada grupo. Los animales inmunizados con AM o AS mostraron títulos altos de anticuerpos, por medio de la prueba de hemoaglutinación pasiva, durante todo el experimento. Los resultados sugieren que la inoculación intraperitoneal de AM mezclado con ACF, puede inducir un efecto protector en ovinos contra la infección por *F. hepatica*.

INTRODUCCION

En animales domésticos se han utilizado diferentes métodos con objeto de inducir una respuesta inmune protectora contra la infección por *Fasciola*

¹ Proyecto Fasciolosis. CIMEVET-INIFAP-SARH. Apdo. Postal 206, C.P. 62500, CIVAC, Mor.

² Departamento de Inmunología. CIMEVET-INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, México, D.F., C.P. 05110.

hepatica. Uno de ellos, el uso de metacercarias irradiadas, éste ha tenido un éxito aceptable en bovinos contra *F. gigantica* (Bitakaramire, 1973) y contra *F. hepatica* (Nansen, 1975) pero no en ovinos (Campbell y col., 1978). Otro método es el uso de antígenos somáticos o metabólicos (productos de excreción /secreción), obtenidos de fasciolas juveniles o adultas e inoculados por diferentes vías, mezclados o no con adyuvantes, que ha sido evaluado en animales de laboratorio (Burden y Hammet, 1980; Burden, Harness y Hammet, 1982; Davies y col., 1979; Lang y Hall, 1977; Oldham y Hughes, 1982; Oldham, 1983; Rajasekariah y col., 1979) y bovinos (Hall y Lang, 1978; Oldham, 1985). Los resultados de los experimentos anteriores, muestran que los antígenos metabólicos (productos de excreción/secreción) son mejores que los antígenos somáticos para inducir respuestas inmunes protectoras contra la infección por *F. hepatica*, aunque, en ocasiones el uso de antígenos somáticos ha dado buenos resultados (Oldham y Hughes, 1982; Oldham, 1983). Sin embargo, se ha indicado que las respuestas inmunitarias contra *F. hepatica*, en animales de laboratorio y en rumiantes domésticos, son similares pero no iguales (Van Tiggele, 1978; Oldham, 1985), por lo cual se debe

tener precaución al tratar de transferir resultados de un grupo de animales a otro.

Por otra parte, se ha demostrado tanto en corderos como en borregos adultos, que la inmunización intraperitoneal con antígeno en adyuvante oleoso, estimula la producción de anticuerpos, sobre todo IgA, en el intestino (Husband, 1978; Husband, Beh y Lascelles, 1979). También se ha obtenido una buena respuesta inmune protectora contra *Salmonella typhimurium* en corderos inmunizados por vía intraperitoneal con una vacuna contra *S. typhimurium* (Husband, 1980). Cabe mencionar que en ratas resistentes a *F. hepática*, las fasciolas juveniles de una reinfección son cubiertas por anticuerpos específicos en el lumen intestinal de estos roedores (Burden, Hughes y Hammet, 1982). De acuerdo con la literatura anterior, es aparente que la inmunización intraperitoneal de ovinos con antígenos mezclados con adyuvantes estimula una respuesta inmune protectora, cuando menos a nivel intestinal. El propósito del presente estudio fue determinar si la inoculación intraperitoneal de antígenos somático o metabólico de *F. hepática* adulta, mezclados con adyuvante completo de Freund, en ovinos, estimula una respuesta inmune protectora contra una infección de desafío.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron 25 ovinos Tabasco o Pelibuey machos, de uno a dos años de edad. Estos animales fueron criados en el Centro Experimental Pecuario de Mochochá, Yuc., área considerada como libre de *F. hepática* (Arriaga y col., 1983). Los animales fueron transportados a la Unidad Central de CIMEVET-INIFAP en la ciudad de México, D.F. y fueron mantenidos bajo condiciones convencionales, en corrales con piso de

concreto. Los borregos fueron alimentados con una dieta de mantenimiento en base seca y agua a libre acceso.

Antígeno somático (AS) de *F. hepática*. Se colectaron fasciolas adultas de hígados de bovino decomisados en el rastro de Ferrería, D.F. Las fasciolas fueron lavadas varias veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH 7.2 y se preparó un antígeno somático crudo de acuerdo al método descrito por Bautista y Morilla (1986).

Antígeno metabólico (AM) (productos de excreción /secreción) de *F. hepática*. Se colectaron fasciolas adultas vivas a partir de hígados de bovino decomisados en el rastro de Ferrería, D.F. Los parásitos fueron lavados seis veces con PBS pH 7.2 estéril, sumergidos en una solución 1:10,000 de Timerosal¹ y lavados otras dos veces con PBS pH 7.2 estéril a 37°C. Después de 20 a 30 fasciolas se transfirieron a matraces de Erlenmeyer estériles a los cuales se les adicionó solución estéril de Hedon-Fleig (1 ml/fasciola) (Dawes, 1954), los matraces se cerraron con tapones de hule. Los parásitos se incubaron durante 18-20 h en baño María a 37°C. El líquido de incubación fue colectado y centrifugado a 1500 xg durante 40 min en una centrifuga refrigerada (4°C). El sobrenadante obtenido fue concentrado por medio de liofilización y se almacenó a 4°C hasta su uso. El contenido de proteína, tanto del AS como del AM, fue determinado por medio del método de Lowry (Lowry y col., 1951).

Inmunización de ovinos. Los 25 borregos Pelibuey, libres de *F. hepática* fueron divididos al azar en cuatro grupos. El grupo A (cinco ovinos) fungió como testigo no tratado. Los animales del grupo B (siete borregos) fueron inoculados por vía intraperitoneal (IP) en tres ocasiones con 1 ml/ovino de adyuvante completo de

1 Eli Lilly y Cía de México, S.A. de C.V.

Freund (ACF)², con 21 días de intervalo entre la primera y segunda inmunización y 427 días entre la segunda y tercera inmunización. Los animales del grupo C (seis borregos) fueron inoculados por vía IP con AS (30 mg de proteína/borrego/inoculación) emulsificado con ACF, en tres ocasiones a los mismos intervalos que en el grupo B. Los animales del grupo D (siete ovinos) fueron inyectados por vía IP con AM (30 mg de proteína/borrego/inyección) emulsificado con ACF, en tres ocasiones a los mismos intervalos que en los grupos B y C.

Administración de metacercarias y evaluación de resistencia. Se obtuvieron metacercarias de *F. hepatica* a partir de caracoles *Lymnaea viator* infectados en el laboratorio con miracidios eclosionados de huevos de *F. hepatica* y colectados de vesículas biliares de bovinos parasitados por el tremátodo. Las metacercarias adheridas a plástico (polietileno) fueron mantenidas en agua destilada a 4°C hasta su empleo, que se realizó dentro de los tres meses posteriores a su colección, previa determinación de su viabilidad según lo indicado por Boray (1969). Cada ovino fue desafiado con 150 metacercarias por vía oral. Doce semanas después del desafío se llevaron a cabo exámenes coproparasitoscópicos semanales de las heces de cada uno de los ovinos para determinar el número de huevos por gramo (HPG) por medio de la técnica de sedimentación (Hope y Ruane, 1971). Quince semanas después del desafío todos los animales fueron sacrificados y se determinó el número y tamaño (en mm) de las fasciolas recuperadas de los hígados.

Prueba de hemoaglutinación pasiva (HP). Se obtuvieron en forma convencional muestras de suero sanguíneo de los 27 ovinos en las semanas 0 (día de la primera inyección de antígeno), 3, 6, 2 Difco, Detroit, Mich., U.S.A.

9, 12, 24, 61, 66, 68, 70, 72, 74, 75 y 81. Dichas muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización. Los títulos de anticuerpos anti-*F. hepatica* fueron determinados con utilización de AS del parásito y la técnica de HP descrita por Kaga y Norman (1976). Los sueros que dieron una reacción de aglutinación $\geq 1:64$ fueron considerados como positivos a anticuerpos contra *F. hepatica*.

RESULTADOS

Al comparar el número de huevos/gramo de heces, eliminados por los ovinos de los cuatro grupos, pareció existir una correlación directa entre este número y la cantidad de fasciolas en el hígado. Esto se pudo apreciar con cierta claridad en los grupos A, C y D (Cuadro 1). En el grupo D, seis de siete animales eliminaron de cero a siete (2.49 en promedio) HPG y sólo un animal presentó 140 HPG.

El promedio de fasciolas recuperadas a la necropsia fue de 11.2 para el grupo A; 10.7 para el grupo B; 10 para el grupo C y 11.7 para el grupo D. En este último, parece que hubo cierto efecto protector contra *F. hepatica*, ya que sólo un animal de siete presentó 75 fasciolas (el mismo que eliminó 140 HPG), en comparación con los otros seis ovinos que tuvieron una carga parasitaria que osciló entre cero y dos fasciolas (Cuadro 1) que promedian 1.16 parásitos por ovino. Cabe señalar que el animal ya mencionado fue el único de los 25 borregos del estudio que presentó el máximo número de fasciolas.

El tamaño promedio de los parásitos fue muy semejante en los cuatro grupos: 19.5 x 8.9 mm para el grupo A; 18.3 x 8.7 mm para el grupo B; 18.4 x 7.4 mm para el grupo C y 18.3 x 8.2 mm para el grupo D (Cuadro 1).

En cuanto al título de anticuerpos anti-*F. hepatica*, por medio de la

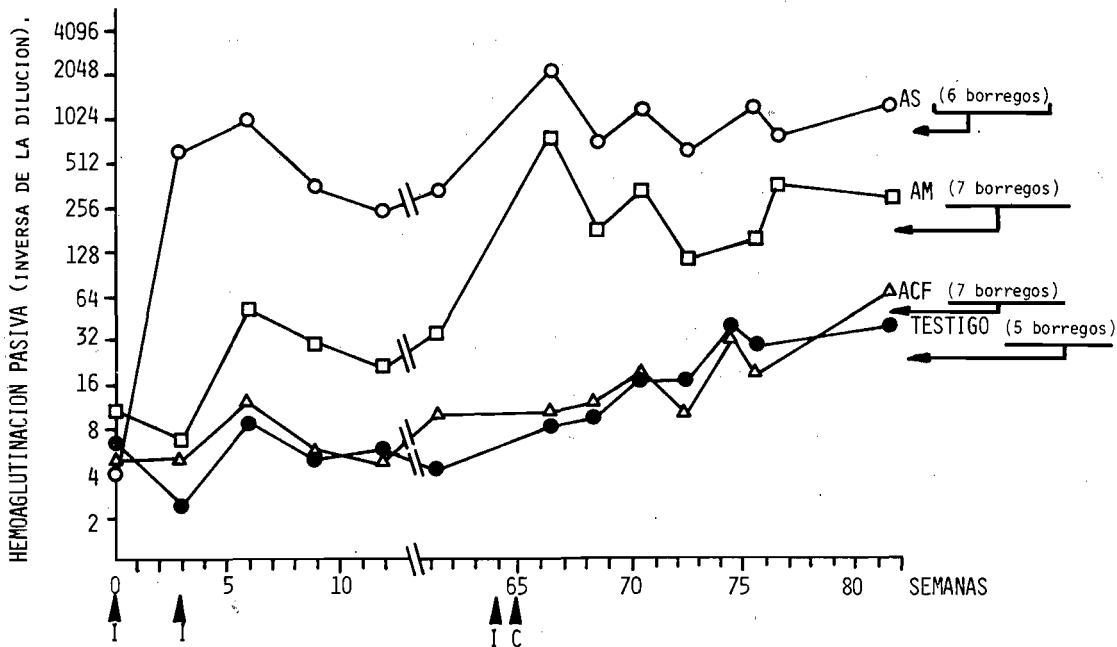
CUADRO 1

HUEVOS DE Fasciola hepatica POR GRAMO DE HECES Y NUMERO Y TAMAÑO DE FASCIOLAS RECUPERADAS AL SACRIFICIO EN BORREGOS INMUNIZADOS POR VIA IP CONTRA FASCIO-LASIS CON ANTIGENOS SOMATICO (AS) O METABOLICO (AM) DEL PARASITO ADULTO MEZCLA DO CON ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND (ACF).

GRUPO	BORREGO No.	HUEVOS DE F. hepatica /g DE HECES. ^a	No. DE FASCIOLAS RECUPERADAS	TAMAÑO PROMEDIO DE LAS FASCIOLAS RECUPERADAS(mm).
A TESTIGO	1	1	1	17 x 10
	2	3	1	19 x 9
	3	8	5	20.4 x 7.6
	4	19	13	19.4 x 8.3
	5	159	36	21.8 x 9.8
	$\bar{X} \pm SD$	38.0 \pm 60.82	11.2 \pm 13.15	\bar{X} 19.5 x 8.9
B ACF	1	3	4	18.5 x 8.5
	2	22	6	18 x 9.3
	3	36	7	21.2 x 9.7
	4	42	8	19.5 x 9.3
	5	21	13	15.4 x 7.4
	6	119	17	20.4 x 10
	7	8	20	15.3 x 7.1
$\bar{X} \pm SD$	35.85 \pm 36.29	10.7 \pm 6	\bar{X} 18.3 x 8.7	
C AS + ACF	1	3	0	-----
	2	2	1	20 x 7
	3	3	3	16 x 6.6
	4	2	7	15.5 x 9.8
	5	45	21	19.8 x 7.3
	6	59	28	20.8 x 6.5
$\bar{X} \pm SD$	19.0 \pm 23.68	10.0 \pm 10.67	\bar{X} 18.4 x 7.4	
D AM + ACF	1	0	0	-----
	2	1	1	16 x 7
	3	5	1	22 x 10
	4	7	1	20 x 10
	5	0	2	14.5 x 6
	6	2	2	19.5 x 9
	7	140	75	18 x 7.7
$\bar{X} \pm SD$	22.14 \pm 48.17	11.7 \pm 25.8	\bar{X} 18.3 x 8.2	

^a El examen coproparasitológico se llevó a cabo una semana antes del sacrificio.

FIGURA 1. MEDIA ARITMETICA DEL TITULO DE ANTICUERPOS ANTI-*Fasciola hepatica* EN LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION PASIVA EN OVINOS PELIBUEY INMUNIZADOS POR VIA IP CON ANTIGENO METABOLICO (EXCRECIONES/SECRECIONES) O ANTIGENO SOMATICO DE *Fasciola hepatica* ADULTA EN ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND (ACF).



AS = Antígeno somático de *F. hepatica*; AM = Antígeno metabólico (excreciones/secreciones) de *F. hepatica*; ACF = Adyuvante completo de Freund; I = Inmunización; C = Confrontación (150 metacercarias/borrego).

prueba de HP, los ovinos de los grupos C (AS) y D (AM) tuvieron los títulos más altos que los de los grupos A (Testigo) y B (ACF) durante todo el desarrollo del experimento (Figura 1). Se puede apreciar que los títulos se incrementan en forma considerable poco después de las inmunizaciones en los grupos C y D y en los grupos A y B, poco a poco, después del desafío (Figura 1).

DISCUSION

En el presente estudio, en un principio se programó inocular a los animales con los antígenos y el adyuvante en dos ocasiones, separadas 21 días, para desafiar a los ovinos 14 días después de la segunda inyección, pero debido a problemas técnicos la producción de metacercarias para el desafío se vió interrumpida por un lapso muy largo. Una vez que estos problemas fueron superados, la producción de metacercarias se restableció, pero ya había transcurrido demasiado tiempo para el desafío de los ovinos inmunizados, por lo que se decidió repetir la inmunización y desafiarlos con las metacercarias siete días después de esta tercera inoculación.

Los resultados obtenidos indican que en apariencia, no hubo un efecto protector contra la infección experimental por *F. hepatica* en los ovinos tratados con ACF, AS o AM. Sin embargo, cabe hacer las siguientes observaciones: en una población normal de hospedadores hay pocos individuos muy resistentes, muchos otros susceptibles y algunos cuantos muy susceptibles a la infección con parásitos. Esta característica de resistencia o susceptibilidad tiene un control genético (Wakelin, 1984). De acuerdo a lo anterior, es muy probable que el ovino del grupo vacunado con AM, que presentó 75 fasciolas (el máximo

número de parásitos de todos los animales del experimento) haya tenido poca resistencia genética a la infección por *F. hepatica*, de tal manera que la inmunización no tuvo ningún efecto. Otra posibilidad, es la de que este ovino haya sido resistente debido a que la cantidad de antígeno administrada fue excesiva, de tal forma que ocurrió una tolerancia a dosis alta; o bien, que haya ocurrido una inmunosupresión por el tratamiento. A este respecto, se ha demostrado que *F. hepatica* adulta produce sustancias tóxicas para los linfocitos del huésped (Goose, 1978) y que la infección por este parásito en ovinos suprime las respuestas proliferativas de linfocitos de sangre periférica a mitógenos (Zimmerman y col., 1983). También se ha observado que en ovinos parasitados en forma experimental con *F. hepatica* se presenta una inmunosupresión a antígenos heterólogos timo-dependientes (Orozco, 1986) y que, en borregos con fasciolosis natural, se producen complejos inmunes circulantes, una de las causas probables de inmunosupresión (Arriaga y col., 1987). Sin embargo, en el grupo inmunizado con AM llama la atención el hecho de que el promedio de fasciolas recuperadas en seis animales (con exclusión del ovino ya mencionado) fue de 1.16 mucho menor en comparación con el promedio del grupo testigo o de los grupos tratados con ACF o AS, lo cual sugiere que el AM de *F. hepatica* adulta contiene uno o varios componentes con capacidad para inducir una respuesta inmune protectora contra *Fasciola* en ovinos. En experimentos llevados a cabo en ratas, se ha demostrado el efecto protector del AM de fasciolas juveniles al inocularse por vía IP (Rajasekariah y col., 1979). Así mismo, en ovinos se ha podido inducir protección contra *Taenia hydatigena* y *T. ovis* con productos de excreción/secreción (AM) de estos cestodos (Onawunmi y Coles, 1980;

Rickard y col., 1977). En otros estudios, se ha observado que el AM de fasciolas adultas es menos complejo que el AS y que los sueros de borregos infectados en forma experimental con **F. hepatica** reconocen componentes del AM, por medio de la técnica de inmunolectrotransferencia, cuyos pesos moleculares oscilan entre 90,000 y 14,000 daltons; es en particular interesante un componente de 23,000 a 27,000 daltons que es reconocido con mayor eficiencia conforme progresa la infección (Ruíz-Navarrete, 1987), hecho que lo sitúa como un buen candidato para aislarlo y determinar su capacidad para inducir protección. En cuanto al tamaño de las fasciolas recuperadas éste fue similar en los ovinos de los cuatro grupos, lo cual sugiere que los parásitos que lograron alcanzar el hígado no fueron afectados por los diferentes tratamientos.

Los títulos de anticuerpos obtenidos por medio de HP, indican que, en apariencia, no existe correlación entre títulos altos de anticuerpos anti- **F. hepatica** y protección contra el parásito, aunque esto debe ser corroborado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se sugiere la comprobación de las observaciones presentadas en futuros experimentos, sobre el probable efecto protector del AM de **F. hepatica** mezclado con ACF e inoculado por vía IP en ovinos; bajo la consideración de los parámetros indicados por Murray y col., (1979) para antígenos somáticos y metabólicos de helmintos, como son, entre otros: dosis, intervalo entre dosis, clase de adyuvante y vía de administración.

SUMMARY

Somatic (SA) or *In vitro* culture (MA) antigens from adult **Fasciola hepatica** (bovine origin) were mixed with Freund's complete adjuvant (FCA) and injected intraperitoneally, in three opportunitites in naive sheep. One week after the last inoculation, each animal was challenged

with 150 viable metacercariae (bovine origin). Resistance to infection was assessed by counting adult worms in the bile ducts 15 weeks later. Six out of seven animals treated with MA showed resistance, while no protection was observed in one ovine belonging to this same group nor in six sheep injected with SA, seven animals inoculated with FCA alone nor in five control sheep, as determined by the average worm burden of each group. The ovinos immunized with **F. hepatica** antigens showed high anti-**Fasciola** antibody titers, measured by indirect hemagglutination test during all the experiment. The results suggest that the intraperitoneal injection of MA mixed with FCA may induce a protective effect against **F. hepatica** infection in sheep.

LITERATURA CITADA

ARRIAGA, C., GOMEZ, A., BAUTISTA, C.R. y MORILLA, A., 1983. Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de **Fasciola hepatica** en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos. *Tec. Pec. Méx.* 44:41.

ARRIAGA, C., RUIZ NAVARRETE, A., GOMEZ, A., FRAIRE, M., BAUTISTA, C.R. y MORILLA, A., 1987. Complejos Inmunes circulantes en ovinos infestados con **Fasciola hepatica**. *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 29:127.

BAUTISTA, C.R. y MORILLA, A., 1986. Métodos de obtención de antígenos. En: Manual de Inmunología. A. Morilla y C.R. Bautista (editores) Ed. Diana. México, D.F., p.36.

BITAKARAMIRE, P.K., 1973. Preliminary studies on the immunization of cattle against fascioliasis using gamma-irradiated metacercariae of **Fasciola gigantica**. En: Isotopes and Radiation in Parasitology III. International Atomic Energy Agency, Vienna. p. 23.

BORAY, J.C., 1969. Experimental fascioliasis in Australia. *Adv. Parasitol.*, 7:95.

BURDEN, D.J. and HAMMET, N.C., 1980. **Fasciola hepatica**: Attempts to immunise rats using fluke eggs and *in vitro* culture products. *Vet. Parasitol.*, 7:51.

BURDEN, D.J., HUGHES, D.L. and HAMMET, N.C., 1982. **Fasciola hepatica**: antibody coating of juvenile flukes in the intestinal lumen of resistant rats. *Res. Vet. Sci.*, 32:44.

BURDEN, D.J., HARNESS, E. and HAMMET, N.C., 1982. **Fasciola hepatica**: Attempts to

immunise rats and mice with metabolic and somatic antigens derived from juvenile flukes. *Vet. Parasitol.*, 9:261.

CAMPBELL, N.J., GREGG, P., KELLY, J.D. and DINEEN, J.K., 1978. Failure to induce homologous immunity to *Fasciola hepatica* in sheep vaccinated with irradiated metacercariae. *Vet. Parasitol.*, 4:143.

DAVIES, C., RICKARD, M.D., SMITH, J.D. and HUGHES, D.L., 1979. Attempts to immunise rats against infection with *Fasciola hepatica* using *in vitro* culture antigens from newly excysted metacercariae. *Res. Vet. Sci.*, 26:259.

DAWES, B., 1954. Maintenance *in vitro* of *Fasciola hepatica*. *Nature* (Lond.) 174:654.

GOOSE, J., 1978. Possible role of excretory/secretory products in evasion of host defenses by *Fasciola hepatica*. *Nature* (Lond.), 275 (5677): 216.

HALL, R.F. and LANG, B.Z., 1978. The development of an experimental vaccine against *Fasciola hepatica* in cattle. En: Proceedings of the 82nd Annual Meeting of the United States Animal Health Association. Richmond, Virginia. p. 56.

HOPE CAWDERY, M.J. and RUANE, M., 1971. Sedimentation method for the demonstration of eggs of *Fasciola hepatica* in faeces. *Laboratory Practice*, 20:935.

HUSBAND, A.J., 1978. An immunization model for the control of infectious enteritis. *Res. Vet. Sci.*, 25:173.

HUSBAND, A.J., 1980. Intestinal immunity following a single intraperitoneal immunization in lambs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1:277.

HUSBAND, A.J., BEH, K.J. and LASCELLES, A.K., 1979. IgA-containing cells in the ruminant intestine following intraperitoneal and local immunization. *Immunology*, 37:597.

KAGAN, I.G. and NORMAN, L., 1976. Serodiagnosis of parasitic diseases. In: Manual of Clinical Immunology. N.R. Rose and H. Friedman (editors). American Society for Microbiology. Washington, D.C. p382.

LANG, B.Z. and HALL, R.F., 1977. Host-parasite relationship 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.

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

MURRAY, M., ROBINSON, P.B., GRIERSON, C. and CRAWFORD, R.A., 1979. Immunization against *Nippostrongylus brasiliensis* in the rat. A study on the use of antigen extracted from adult parasites and the parameters which influence the level of protection. *Acta Tropica*, 36:297.

NANSEN, P., 1975. Resistance in cattle to *Fasciola hepatica* induced by γ -ray attenuated larvae: results from a controlled field trial. *Res. Vet. Sci.*, 19:278.

OLDHAM, G., 1983. 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.

OLDHAM, G., 1985. Immune responses in rats and cattle to primary infections with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.*, 34:357.

OLDHAM, G. and HUGHES, D.L., 1982. *Fasciola hepatica*: Immunization of rats by intraperitoneal injection of adult fluke antigen in Freund's adjuvant. *Exp. Parasitol.*, 54:7.

ONAWUNMI, O.A. and COLES, G.C., 1980. Attempts to immunize sheep with culture antigens of *Taenia hydatigena*. *Res. Vet. Sci.*, 29:122.

OROZCO, A.M., 1986. Efecto de la infección experimental por *Fasciola hepatica* en ovinos sobre la respuesta inmune humoral a antígenos timo dependientes. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Edo. de México, UNAM.

RAJASEKARIAH, G.R., MITCHELL, G.F., CHAPMAN, C.B. and MONTAGUE, P.E., 1979. *Fasciola hepatica*: attempts to induce protection against infection in rats and mice by injection of excretory/secretory products of immature worms. *Parasitology*, 79:393.

RICKARD, M.D., BODDINGTON, E.B. and McQUADE, M., 1977. Vaccination of lambs against *Taenia ovis* infection using antigens collected during *in vitro* cultivation of larvae: passive protection via colostrum from vaccinated ewes and the duration of immunity from a single vaccination. *Res. Vet. Sci.* 23:368.

RUIZ-NAVARRETE, M.A., 1987. Análisis Inmunológico de los antígenos de *Fasciola hepatica*. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Edó. de México, UNAM.

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

WAKELIN, D., 1984. Evasion of the immune response: survival within low responder individuals of the host population. *Parasitology*, 88:639.

ZIMMERMAN, G.L., ISAACSON KERKVLIT, N., BRAUNER, J.A. and CERRO, J.E., 1983. Modulation of host immune responses by *Fasciola hepatica*: responses of peripheral lymphocytes to mitogens during liver fluke infections of sheep. *J. Parasitol.*, 69:473.