

# EVALUACION DE UN ANTIGENO SOMATICO Y UNO METABOLICO DE *Fasciola hepatica* ADULTA EN EL DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO DE LA FASCIOLASIS EN OVINOS<sup>a b</sup>

CAMILA ARRIAGA DE MORILLA<sup>c</sup>

ALFREDO GOMEZ ARROYO<sup>c</sup>

CARLOS RAMON BAUTISTA<sup>d</sup>

ANTONIO MORILLA GONZALEZ<sup>c</sup>

## RESUMEN

Con el objeto de conocer cual antígeno y cual prueba son los más adecuados para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos, se comparó un antígeno somático (AS) y uno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica* adulta de origen bovino. Estos antígenos se evaluaron en las pruebas de hemaglutinación pasiva (HP), difusión doble en agar (DD), contra-inmuno-electroforesis (CIE), inmunoensayo en capa delgada (ICD) e intradermoreacción (IDR) y se determinó la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas. Se utilizaron 30 ovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica* y 33 ovinos libres del parásito. La prueba de IDR mostró la más alta sensibilidad de 90% con AS y 93% con AM y 97% de especificidad con ambos antígenos. De las pruebas serológicas, ICD fue la de mayor sensibilidad con 80% con AS y 83% con AM, y especificidad de 97% con AS y 100% con AM. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en las diversas pruebas con AS o AM fueron muy semejantes. Se concluyó que en ovinos las pruebas de IDR e ICD son las más confiables y que es posible la utilización indistinta de cualquiera de los dos antígenos.

a. Recibido para su publicación el 9 de Diciembre de 1987.

b. Proyecto financiado en parte por CONACYT.

c. Proyecto Inmunología Experimental del Cerdo. INIFAP-SARH. Carr. México-Toluca, km. 15.5 México, D.F. 05110.

d. Proyecto Fasciolosis, km. 12.5 Carr. Cuernavaca-Cuatla, Jiutepec, Edo. de Morelos.

## INTRODUCCION

Diversas técnicas inmunológicas han sido utilizadas para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos, tales como aglutinación en látex, fijación de complemento<sup>7</sup>, hemaglutinación pasiva<sup>6, 7</sup> difusión doble en agar<sup>6, 7</sup>, inmunofluorescencia indirecta<sup>9</sup> y la más reciente ELISA<sup>14</sup> o modificaciones de ésta como dot-ELISA<sup>3, 15</sup>.

En estas pruebas se han utilizado diversas preparaciones antigénicas como extractos crudos<sup>4, 6</sup>, fracciones purificadas<sup>7</sup> o antígenos metabólicos<sup>3, 15</sup>. Algunas de estas técnicas se han establecido en animales infectados en forma experimental mientras que otras se han utilizado en ovinos infectados en forma natural en el campo y los resultados en los dos casos pueden ser diferentes<sup>10</sup> lo que dificulta concluir cuál es el antígeno y la prueba más adecuada para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos.

En un trabajo anterior Gómez y Col<sup>6</sup>, compararon dos antígenos somáticos de *Fasciola hepatica*, un extracto crudo y un extracto deslipidizado, en cuanto a su sensibilidad y especificidad en las pruebas de hemaglutinación pasiva, difusión doble, inmunoensayo en capa delgada e intradermoreacción en ovinos y encontraron que los mejores resultados se obtuvieron con las pruebas de intradermoreacción y hemaglutinación pasiva, y no se observó diferencia en el comportamiento de los antígenos somáticos.

Recién se caracterizó el antígeno metabólico o de excreciones y secreciones de *Fasciola hepatica*<sup>11</sup> y se encontró que tienen menor número de componentes antigénicos que el extracto crudo; además se ha utilizado con buenos resultados en pruebas como inmunoensayo en capa delgada o contraelectroforesis en ovinos infectados en forma experimental<sup>10</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el comportamiento del antígeno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica* con el antígeno somático crudo (AS) antes utilizado, en las pruebas de hemaglutinación pasiva (HP), difusión doble en agar (DD), contraelectroforesis (CIE), inmunoensayo en capa delgada (ICD) e intradermoreacción (IDR), con utilización de ovinos infectados en forma natural, y determinar cuál antígeno y cuál prueba proporciona mejor sensibilidad y espe-

cificidad para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos.

## MATERIAL Y METODOS

### Animales.

Se obtuvieron muestras de heces y de sueros de 30 ovinos localizados en Tulancingo, Hgo., considerada como zona enzoótica de fasciolosis. Por medio de un examen coproparasitológico, se comprobó la presencia de huevos de *Fasciola hepatica* en las heces, como testigo se utilizaron 33 ovinos provenientes de Mérida, Yuc., zona donde hasta el momento no se ha encontrado este parásito; además los animales fueron negativos en el examen coproparasitológico.

### Antígenos.

Se prepararon dos tipos de antígenos a partir de fasciolas adultas obtenidas de hígados de bovino provenientes del rastro: un antígeno somático crudo (AS) y un antígeno metabólico o de excreciones y secreciones (AM). Para la preparación del AS se siguió el método ya establecido<sup>5</sup>. Las fasciolas liofilizadas se

molieron en un mortero y se extrajeron con cinco volúmenes de solución salina amortiguadora de fosfatos (SSA), pH 7.2, con agitación lenta por 24 h en frío. El extracto se centrifugó a 1800 g por 40 min y el sobrenadante se guardó en alícuotas a -70°C. El AM se preparó de acuerdo con la técnica descrita por Arriaga y Col<sup>1</sup>. Las fasciolas se lavaron con SSA con Timerosal al 0.01% y después se incubaron en solución estéril de Hedon-Fleig (1 fasciola/ml) durante 18 h a 37°C; el medio se centrifugó a 1800 g por 40 min y el sobrenadante, que constituye el AM, se almacenó en la forma indicada para el AS.

#### **Proteína.**

La cantidad de proteína de los antígenos se determinó por el método de Lowry y Col<sup>8</sup>.

#### **Pruebas Serológicas.**

Para las pruebas de hemaglutinación pasiva (HP), difusión doble en agar (DD), contraelectroforesis (CIE) e inmunoensayo

en capa delgada (ICD) se emplearon las técnicas antes descritas<sup>1</sup>.

**Intradermoreacción (IDR).** La prueba intradérmica se realizó según Gómez y Col<sup>6</sup>.

La sensibilidad o capacidad para determinar cantidades bajas de anticuerpos y la especificidad o capacidad de discriminar a los animales infectados se obtuvieron con las fórmulas utilizadas antes<sup>1</sup>:

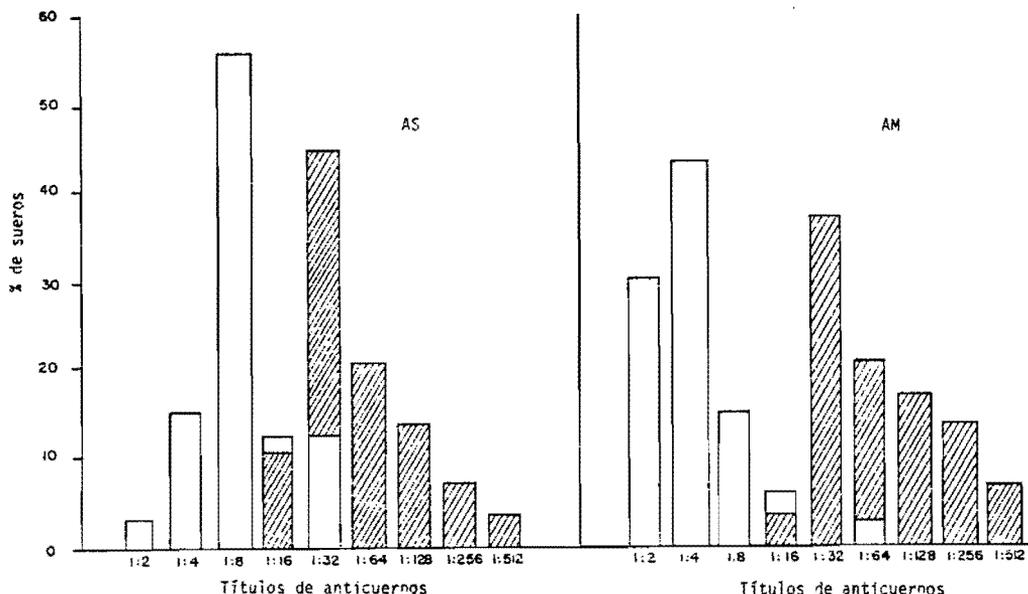
$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Núm. de animales con fasciolosis positivos a la prueba}}{\text{Núm. total de animales con fasciolosis}} \times 100$$

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

## **RESULTADOS**

El contenido de proteína de los antígenos fue de 10/mg/ml en AS y 3 mg/ml en AM. Para estandarizar los resultados se utilizó la misma concentración de proteína en cada una de las pruebas. La Figura 1 muestra la frecuencia de títulos de anticuerpos en la prueba de HP obtenidos con los sueros de los ovinos con AS o AM. Los

Figura 1. Frecuencia de títulos de anticuerpos obtenidos en hemaglutinación pasiva con sueros de ovinos utilizando un antígeno somático (AS) y un antígeno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica*.



30 ovinos de Tulancingo, Hgo., zona de alta incidencia de fascioliasis

33 ovinos de Mérida, Yuc., zona libre de fascioliasis.

animales de Tulancingo mostraron títulos entre 1:16 y 1:512 con cualquiera de los dos antígenos. Con los ovinos de Mérida se obtuvieron títulos entre 1:2 y 1:32 con el AS y entre 1:2 y 1:16 con el AM y sólo un animal dio un título de 1:64. Se consideraron positivos los sueros que dieron aglutinación hasta títulos de 1:64 o mayores.

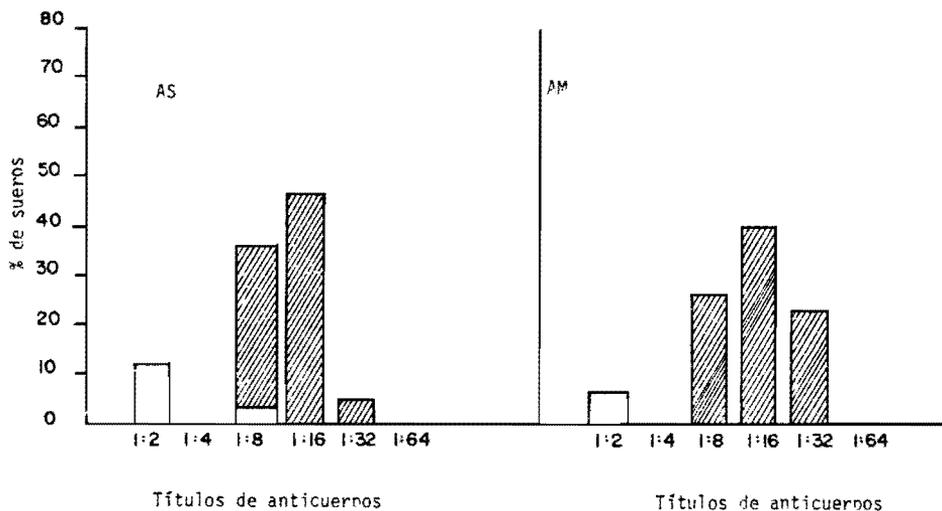
En ICD, los sueros de los ovinos de Tulancingo dieron títulos entre 1:8 y 1:32 con los dos antígenos mientras que los animales testigos en su mayoría fueron negativos y un pequeño porcentaje mostró títulos 1:2 con AS o con AM y sólo un animal dio título de 1:8 (Fig. 2). Se consideraron posi-

tivos los sueros que dieron títulos de 1:8 ó mayores.

La Figura 3 muestra los resultados de la prueba intradérmica. Los ovinos de Tulancingo mostraron un incremento máximo en el grosor de la piel a las 2 h postinoculación que en promedio fue de 7.2 mm con AS y 6,8 mm con AM. Los animales testigos mostraron un incremento en el grosor de la piel de menos de 1 mm a las 2 h después de la inoculación.

Las Tablas 1 y 2 muestran los porcentajes de animales positivos detectados por las distintas pruebas de diagnóstico y los porcentajes de sensibili-

Figura 2. Frecuencia de títulos de anticuerpos obtenidos en inmunoensayo en cana delnada (ICD) con sueros de ovinos utilizando un antígeno somático (AS) y un antígeno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica*.



30 ovinos de Tulancingo, Hgo., zona de alta incidencia de fascioliasis.

33 ovinos de Mérida, Yuc., zona libre de fascioliasis.

dad y especificidad de cada una de ellas. La prueba que mostró la más alta sensibilidad fue IDR (90% con AS y 93% con AM); la especificidad fue también muy alta, 97% con ambos antígenos. De las pruebas serológicas ICD fue la que dio mayor sensibilidad (80% con AS y 83% con AM) y especificidad (97% con AS y 100% con AM). Los resultados obtenidos con los dos antígenos fueron semejantes en la mayoría de las pruebas. Sin embargo, en la prueba de HP la sensibilidad con AS fue menor (47%) que con AM (60%). También en CIE se observó menor sensibilidad con AS que con AM (57 y 73%). La sensibilidad más baja se obtuvo con DD (43% con AS y 30% con AM) aunque fue una prueba muy específica.

## DISCUSION

En el establecimiento de las pruebas inmunológicas de diagnóstico es importante definir qué antígeno se va a utilizar. Los antígenos somáticos crudos de parásitos son por lo general mezclas muy complejas de distintos componentes antigénicos, mientras que los antígenos metabólicos o de excreciones y secreciones poseen un menor número de componentes, por lo que se esperaría una mayor especificidad cuando se

Figura 3. Respuesta inflamatoria de la piel de ovinos inoculados por vía intradérmica con un antígeno somático crudo (AS) y un antígeno metabólico (AM) de *Fasciola hepatica* adulta y como control solución salina amortiguada (SSA)

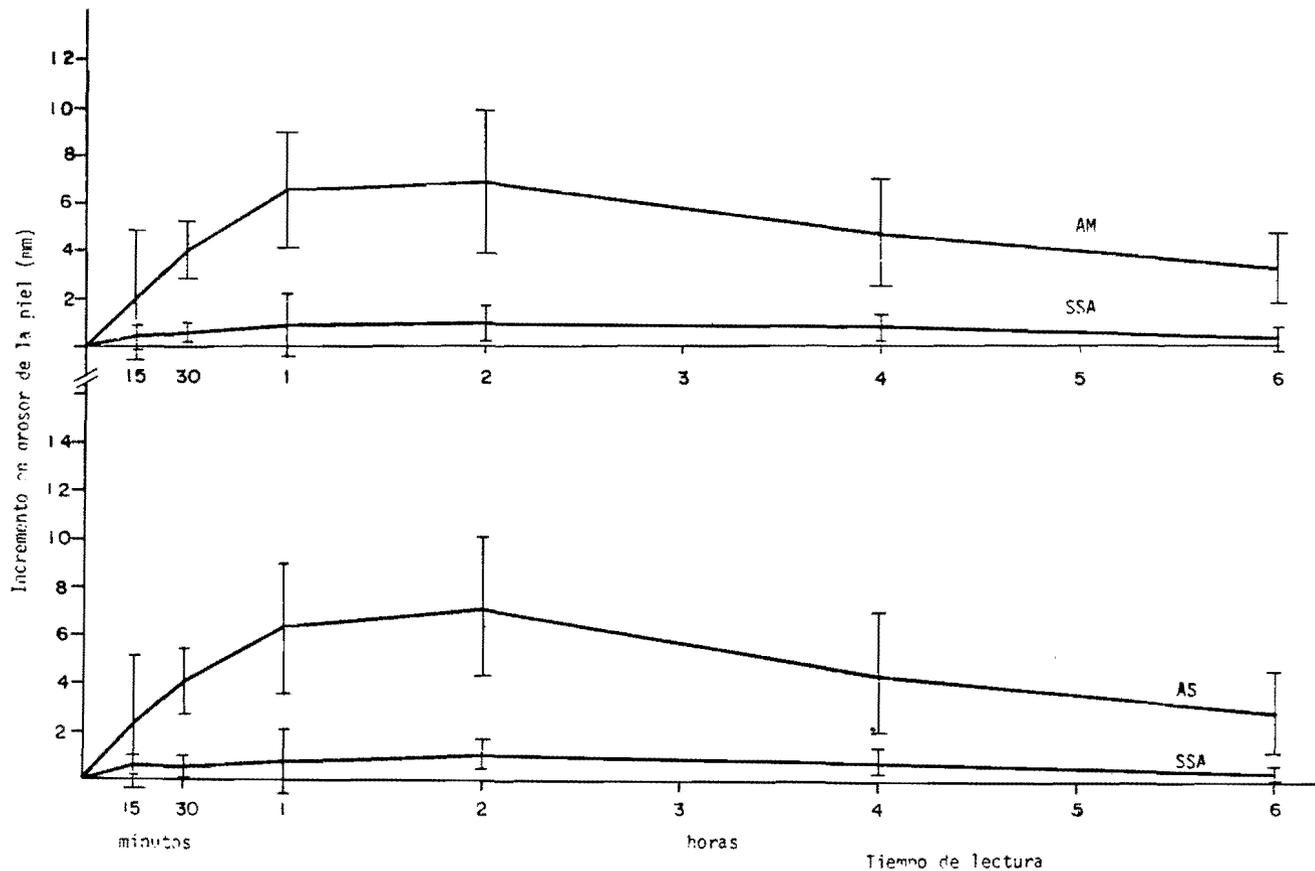


Tabla 1

Porcentaje de sueros de ovinos positivos a *F. hepatica*, detectados por distintas pruebas inmunológicas utilizando un antígeno somático crudo y un antígeno metabólico.

P R U E B A	Tulancingo <sup>1</sup>				Mérida <sup>2</sup>			
	AS <sup>3</sup>		AM <sup>4</sup>		AS		AM	
	%	+/Total	%	+/Total	%	+/Total	%	+/Total
Hemaglutinación pasiva (HP)	47	14/30	60	18/30	0	0/33	3	1/33
Difusión doble en agar (DD)	43	13/30	30	9/30	3	1/33	0	0/33
Contrainmunolectroforesis (CIE)	57	17/30	73	22/30	22	6/27	30	8/27
Inmunoensayo en capa delgada (ICD)	83	25/30	80	23/30	3	1/33	0	0/33
Intradermorreacción (IDR)	90	27/30	93	28/30	3	1/33	3	1/33
Coproparasitoscópico	100	30/30			0	0/33		

(1) Tulancingo, Hgo., zona de alta incidencia de fasciolosis

(2) Mérida, Yuc., zona libre de fasciolosis

(3) AS: antígeno somático crudo

(4) AM: antígeno metabólico

utilizan estos últimos en las pruebas por inmunolectrotransferencia de diagnóstico. La mayor complejidad mostró que 26 de éstos del AS y 10 del AS ha sido demostrado por Ruíz del AM son reconocidos por los sueros de ovinos infectados en forma de componentes proteínicos de los dos antígenos por electroforesis en geles de poliacrilamida y encontró 48 diferentes componentes en AS y 23 en AM; esta mayor complejidad, los valores

En el presente trabajo, a pesar de

Tabla 2

Porcentajes de sensibilidad y especificidad de distintas pruebas inmunológicas de diagnóstico en ovinos utilizando un antígeno somático crudo y un antígeno metabólico de *Fasciola hepatica*

P R U E B A	% Sensibilidad <sup>(1)</sup>		% Especificidad <sup>(2)</sup>	
	AS <sup>(3)</sup>	AM <sup>(4)</sup>	AS	AM
Hemaglutinación pasiva (HP)	47	60	100	97
Difusión doble en agar (DD)	43	30	97	100
Contrainmunolectroforesis (CIE)	57	73	78	70
Inmunoensayo en capa delgada (ICD)	80	83	97	100
Intradermorreacción (IDR)	90	93	97	97

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

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

(3) AS: antígeno somático crudo

(4) AM: antígeno metabólico

de sensibilidad y especificidad obtenidos con las diversas pruebas con AS o AM fueron muy semejantes, sólo en HP y en CIE se observó un aumento en la sensibilidad al utilizar AM. También en bovinos se ha encontrado que el comportamiento de las pruebas utilizando cualquiera de los dos antígenos es semejante<sup>1</sup>.

De las pruebas utilizadas, IDR fue la que mostró más alta sensibilidad y especificidad lo que corrobora los resultados obtenidos por Gómez y Col<sup>6</sup>. Cabe anotar que en bovinos el comportamiento de IDR es diferente pues aunque la sensibilidad es alta se presentan muchos falsos positivos<sup>1</sup>.

En cuanto a las pruebas serológicas ICD fue la que dio mejores resultados; esto concuerda con lo observado en ovinos infectados en forma experimental<sup>10</sup> en los que es posible detectar anticuerpos contra *F. hepática* a partir de la segunda semana postinfección. Por otra parte, Gómez y Col<sup>6</sup>, encontraron menor sensibilidad en esta prueba al utilizar AS lo que podría explicarse por la fluctuación en los títulos de anticuerpos que ocurre en el suero de animales con fasciola<sup>10, 12</sup>.

Esto mismo explicaría los resultados con HP que en el presente trabajo mostró menor sensibilidad con AS que la descrita por Gómez y Col<sup>6</sup>. Las fluctuaciones en los títulos de anticuerpos podrían ser debidas a la presencia de complejos inmunes circulantes, la que ha sido demostrada hace poco, en los

sueros de ovinos infectados con *F. hepática*<sup>2</sup>.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que es posible la utilización indistinta de AS o AM en las pruebas de diagnóstico y que IDR o ICD, debido a su alta sensibilidad y especificidad, son muy adecuadas para el diagnóstico de la fasciolosis en ovinos.

#### SUMMARY

In order to determine which antigen and which test are the most suitable for the immunological diagnosis of fascioliasis in sheep, a somatic (AS) and a metabolic (AM) antigen of adult *Fasciola hepática* were compared. These antigens were evaluated using indirect haemagglutination (IH), double immunodiffusion (DID), counterimmunoelectrophoresis (CIE), thin layer immunoassay (TIA) and intradermal test (IDT), and the sensitivity and specificity of each test was determined. For this, 30 sheep naturally infected with *Fasciola hepática* and 33 non infected sheep were used. The intradermal test showed the highest sensitivity of 90% with AS and 93% with AM, and 97% specificity with both antigens. Among the serological tests, TIA had the highest sensitivity, 80% with AS and 83% with AM, and specificity of 97% with AS and 100% with AM. The sensitivity and specificity of the different immunological tests were very similar using either AS or AM. It was concluded that either antigen could be used and that IDT and TIA were the most reliable tests in sheep.

#### LITERATURA CITADA

1. ARRIAGA, C., GOMEZ, A., BAUTISTA, C.R., y MORILLA, A., 1983. Evaluación de un antígeno somático y uno metabólico de *Fasciola hepática* en diferentes pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la fasciolosis en bovinos. *Téc. Pec. Méx.* 44: 41.
2. ARRIAGA, C., RUIZ-NAVARRETE, A., GOMEZ, A., FRAIRE, M., BAUTISTA, C.R. y MORILLA, A., 1987a. Complejos inmunes circulantes en ovinos infectados con *Fasciola hepática*. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 29:127.

3. ARRIAGA, C., PANIAGUA, R., RUIZ-  
-NAVARRETE, A., BAUTISTA, C.R. and  
MORILLA, A., 1987b. Comparison of dot  
enzyme-linked immunosorbent assay for the  
diagnosis of *Fasciola hepatica* natural or  
experimental infections in sheep. Remited to  
**Vet. Parasitol.**
4. BENEX, J., 1964. Le diagnostique serologique  
practique de la distomatose. **Bull. Soc. Path.  
Exotique.** 57: 495.
5. CENTER FOR DISEASE CONTROL, PARA-  
SITOLOGY DIVISION, 1975. Serodiagnosis  
of parasitic Diseases. P. 74 U.S. **Department  
of Health. Education and Welfare**, Atlanta,  
Georgia, U.S.A.
6. GOMEZ, A., ARRIAGA, C., SANCHEZ, A.,  
ESTRADA, A., MORILLA, A., 1984. Estu-  
dio comparativo de dos antígenos somáticos  
de *Fasciola hepatica* en el diagnóstico de fas-  
ciolosis en bovinos. **Veterinaria Méx.** 15: 193.
7. KORACH, S., and BENEX, J., 1966. A lipo-  
protein antigen in *Fasciola hepatica*. II Im-  
munological and immunochemical properties.  
**Espl. Parasit.** 19: 199.
8. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR,  
A.L. and RANDALL, R.J., 1951. Protein  
meaasurement with the folin phenol reagent.  
**J. Biol. Chem.** 193: 265.
9. MOVSESIJAN, M. and BOROJEVIC, R.,  
1973. Antigenic analysis of *Fasciola hepatica*:  
extraction and fractionation, In: Isotopes and  
Radiation in Parasitology III, pp: 11-12.  
**International Atomic Energy Agency.** Vienna.
10. RUIZ-NAVARRETE, A., ARRIAGA, C.,  
GOMEZ, A., BAUTISTA, C.R., y MORILLA  
A., 1985. Dinámica de la respuesta serológica  
de ovinos infectados experimentalmente con  
*Fasciola hepatica*. **Téc. Pec. Méx.** 49: 78.
11. RUIZ-NAVARRETE, M. M.A., 1987. Aná-  
lisis inmunológico de los antígenos de *Fas-  
ciola hepatica*. Tesis de Maestría en Micro-  
biología. Fac. Estudios Sup. Cuautitlán.  
UNAM. México.
12. 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 telaiden.** The Netherlands.
13. VAN TIGGELE, L.J. and OVER, N.J., 1976.  
Serological diagnosis of fascioliasis. **Vet.  
Parasit.** 1: 239.
14. ZIMMERMAN, G.L., JEN, L.W., CERRO,  
J.E., FARNSWORTH, K.L., and WECOTT,  
R.B., 1982. Diagnosis of *Fasciola hepatica*  
infections in sheep by an enzyme-linked  
immunosorbent assay. **Am. J. Vet. Res.**  
43: 2097.
15. ZIMMERMAN, G.L., NELSON, M.J., and  
CLARK, C.R.B. 1985. Diagnosis of ovine  
fascioliasis by a dot-enzyme-linked immuno-  
sorbent assay: A rapid microdiagnostic tech-  
nique. **Am. J. Vet. Res.** 46: 1513.