

IDENTIFICACION DE ANTIGENOS DE DIFERENTES FASES DE DESARROLLO DE *Fasciola hepatica* ^a

Estefan Miranda Miranda ^b

Zeferino Garcia Marquez ^b

RESUMEN

Se hizo la identificación de los antígenos presentes en extractos provenientes de las fases de desarrollo de huevo, redia, metacercaria, juvenil y adulto de *Fasciola hepatica*, por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunoelectrotransferencia, utilizando sueros de conejos infectados experimentalmente. Se identificaron dos antígenos con un peso molecular de 24 y 29 kDa que parecen ser comunes a todas las fases de desarrollo del parásito. Los estados adulto y juvenil mostraron además antígenos compartidos de 10, 12, 15, 17, 21, 42, 45, 66 y 88 kDa. También se detectaron antígenos de 21, 31 y 43 kDa, en metacercarias y de 21 kDa en huevos. Todos los extractos fueron evaluados para verificar su potencial serodiagnóstico por medio de el ELISA, en sueros de conejos y ovinos infectados experimentalmente y suero de bovino con infección natural, se observó una diferencia estadísticamente significativa $p > 0.05$ al comparar los títulos de anticuerpos de conejo anti *Fasciola hepatica*, con los extractos de *Fasciola hepatica* provenientes de las fases juvenil, metacercaria y redia con respecto a la fase adulta, el primer grupo de extractos fué 6.33 veces más sensible en el ensayo que con el extracto de adulto. Estas diferencias también se observaron a menor escala con los sueros de ovinos y bovinos.

PALABRAS CLAVE: *Fasciola hepatica*, Inmunoelectrotransferencia, Antígenos, ELISA.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 33 No.1, (1995)

INTRODUCCION

La relación huésped parásito durante la infección de *Fasciola hepatica*, implica aspectos inmunológicos muy complejos cuyo estudio es vital para la prevención y control de esta infección en animales de interés pecuario y el hombre, los actuales métodos de inmunodiagnóstico e inmunoprofilaxis, son constantemente analizados ya que el mejoramiento de estas técnicas prometen alternativas de análisis y nuevos enfoques de trabajo en la investigación de esta enfermedad.

Se ha informado que hay una respuesta de anticuerpos en animales infectados experimentalmente contra antígenos de diferentes estadios infectantes de *F. hepatica*. El suero inmune de oveja produce

in vitro un precipitado al estar en contacto con las metacercarias, que son la fase infectante para el hospedero definitivo, sugiriendo una reacción de anticuerpos específicos contra el tegumento de esta fase parasitaria (1). Otros resultados experimentales sugieren que las fases parasitarias de *F. hepatica*, que migran por el parénquima hepático son los principales portadores de antígenos funcionales durante infecciones en ratas y ratones (2). Además existen evidencias de que los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* producidos entre ocho y siete días de edad, son responsables de la resistencia adquirida en contra de la infección en ratones (3), estudios posteriores mencionan la existencia de un antígeno soluble presente sólo en estas fases juveniles del parásito (4).

Se han localizado varios antígenos en extractos totales de *F. hepatica* adulta reconocidos durante una infección experimental en conejos (5,17). Los huevos han mostrado ser portadores de antígenos

a Recibido para su publicación el 6 de julio de 1994.

b Centro Nacional de Investigaciones en Parasitología Veterinaria. INIFAP-SAGDR, Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla Col. Progreso. Jiutepec, Morelos. Apartado Postal 206 CIVAC, C.P. 62500, Edo. de Morelos, México.

reconocibles por los sueros de animales infectados pese a no ser una fase infectante del hospedero definitivo, lo que sugiere la existencia de proteínas antigénicas compartidas en diferentes fases de desarrollo (6). No existe información sobre la existencia de antígenos compartidos en la fase de redia aunque la probabilidad de su existencia es alta. El presente estudio tuvo como objetivo identificar antígenos de diferentes fases de desarrollo de *F. hepatica* potencialmente útiles para serodiagnóstico.

MATERIALES Y METODOS

***Fasciola hepatica* Adulta:** Se obtuvieron fasciolas adultas vivas del rastro de la Ciudad de Cuernavaca y se trasladaron al laboratorio de producción Salina Amortiguadora de Fosfatos (SSAF), se hicieron tres lavados de los parásitos en la misma solución para remover el exceso de sangre. Se maceraron en un homogenizador Ten Brock sumergido en hielo. El material insoluble fue removido centrifugando a 5000 g durante 10 minutos; se hizo la determinación de proteínas por el método de Lowry (7), y se almacenó a -50°C hasta su uso.

***Fasciola hepatica* juvenil:** Se infectaron tres conejos Nueva Zelanda con 200 metacercarias por vía oral cada uno, a los 21 días posinfección fueron sacrificados y se aislaron del parénquima del hígado las fasciolas juveniles, procesándose éstas en la forma descrita para las fasciolas adultas.

Metacercarias y redias: Fueron proporcionadas por el laboratorio de Helminología del Centro Nacional de Parasitología Animal, de Jiutepec Morelos y se obtuvieron a partir del cultivo de laboratorio de *F. hepatica*, en el caracol *Lymnaea bulimoides*. Las metacercarias y redias se homogenizaron y procesaron como en los casos anteriores.

Huevos: Se obtuvieron por sedimentación de las heces de dos ovinos

experimentalmente infectados, se hicieron varios lavados con agua destilada, hasta la eliminación de materia fecal y se homogenizaron como en los casos anteriores.

Los componentes proteínicos de cada uno de los extractos se separaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida; para ello, se aplicaron 50 µg de cada extracto en geles discontinuos al 12.5% en 0.2% de duodecil sulfato de sodio (SDS) de acuerdo al método de Laemmli (8); los patrones electroforéticos se tiñeron con azul brillante de Coomassie, se utilizó una preparación comercial de marcadores de peso molecular y se realizó una curva de calibración, para determinar los pesos moleculares de cada banda de los cinco extractos.

Sueros inmunes de conejo: Se infectaron cinco conejos Nueva Zelanda por vía oral con 200 metacercarias cada uno, se hizo un grupo testigo sin infectar con la misma cantidad de conejos. Ambos grupos fueron sangrados doce veces por la oreja en un lapso de 53 días, con intervalos de cuatro días entre sangrados iniciando los sangrados en el momento de la infección oral. Los sueros obtenidos se almacenaron a -50°C hasta su uso.

Sueros de bovinos: Se obtuvieron 17 sueros de bovinos de un área endémica naturalmente infectados, a los cuales se les demostró la infección por medio de pruebas coproparasitológicas de sedimentación. Se usaron además 10 sueros de bovinos mantenidos en condiciones testificadas como libres de la enfermedad.

Sueros de ovinos: Se utilizaron seis sueros de ovinos infectados experimentalmente con metacercarias por vía oral y cuatro sueros de ovinos mantenidos bajo condiciones testigo libres de la enfermedad.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA): Se desarrolló el ensayo de acuerdo al método descrito por Hyllier *et al.* (10) con algunas modificaciones: las placas se sensibilizaron

con cada uno de los cinco extractos, a una concentración de 10 µg/ml, en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato 0.1 M pH 9.5; se depositaron 50 µl de solución de antígeno en cada pozo de una placa de poliestireno y se incubó por 12 horas a 4 C. se probaron primero los sueros de los conejos infectados experimentalmente y del grupo testigo negativo obtenidos durante las 12 fechas de sangrado, haciendo diluciones dobles seriadas desde 1:50 hasta 1:250,000 en SSAF, de los sueros probados se depositaron 50 µl de cada dilución/pozo, y se incubó durante una hora a 37 C. Los sueros de ovinos y bovinos se procesaron de la misma forma. Posteriormente se les añadió el conjugado de peroxidasa-anticuerpo anti IgG de conejo, anti IgG de ovino y anti IgG de bovino diluidos 1:6000 respectivamente y se incubaron a 37 C. durante una hora. La solución de sustrato constituida por 40 µM de ácido 2,2'-Azinobis-3-etilbencil-tiazolinesulfónico, 10 µM de peróxido de hidrógeno en amortiguador de citratos pH 4 100 mM se aplicó 50 µl en cada pozo y se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiental. Posteriormente se obtuvo la absorbancia de cada pozo en el lector de ELISA Dynatech Minireader I, a 414 nm. Se hizo la determinación de las diferencias de absorbancia de los sueros de conejos infectados y de los testigos obtenidos a los 21 días posinfección, y confrontados con los cinco extractos, los resultados se sometieron a un análisis de varianza.

Inmunolectrotransferencia: Se hizo de acuerdo al método descrito por Towbin y Gordon (9). Brevemente, los extractos separados electroforéticamente se transfirieron del gel a membranas de nitrocelulosa a corriente constante de 400 mA., durante cuatro horas, los extractos transferidos y bloqueados en solución de gelatina al 0.5 p/v en SSAF, se incubaron con los sueros de conejos del día 21 postinfección, seguido de una incubación en conjugado anti IgG de conejo marcado con

peroxidasa, las bandas antigénicas fueron reveladas con solución de diaminobenzidina-H₂O₂. 100µM y 10µM de peróxido de hidrógeno en SSAF. A las bandas antigénicas detectadas se les determinó el peso molecular por comparación con el patrón electroforético de las proteínas totales, a las que previamente se les había determinado los pesos moleculares.

RESULTADOS

Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunolectrotransferencia.

Fase Adulta: Se identificaron 28 bandas proteínicas comprendidas en un rango de peso molecular entre 100 y 10 kDa. (Fig 1-IA), de este patrón proteínico se identificaron 13 antígenos, con pesos moleculares de 10, 12, 15, 17, 21, 24, 29, 42, 45, 55, 66, 88 y 97 kDa (Fig. 1-IIA).

Fase Juvenil: El patrón de proteínas totales, permitió identificar 18 bandas (Fig. 1-IB), de las cuales 11 mostraron actividad antigénica; los pesos moleculares que se determinaron fueron 10, 12, 15, 17, 21, 24, 29, 42, 45, 66 y 88 kDa. (Fig. 1-IB).

Metacercarias: Esta fase mostró alrededor de diez bandas proteínicas (Fig. 1-IC), de las cuales cinco tuvieron un peso molecular de 21, 24, 29, 42 y 45 kDa. y todas mostraron actividad antigénica (Fig. 1-IIC).

Redias: El patrón proteínico de esta fase mostró 30 bandas, con una clara sobreexpresión de un grupo de cuatro proteínas con un peso molecular entre los 24 y 35 kDa (Fig. 1-ID), solo se encontraron dos antígenos de peso molecular de 24 y 29 kDa (Fig. 1-IID).

Huevos: Se identificaron al menos 18 bandas de proteínas entre los 10 y 90 kDa (Fig. 1-IE), solo las bandas con peso molecular de 21 y 29 kDa mostraron actividad antigénica (Fig. 1-IIE).

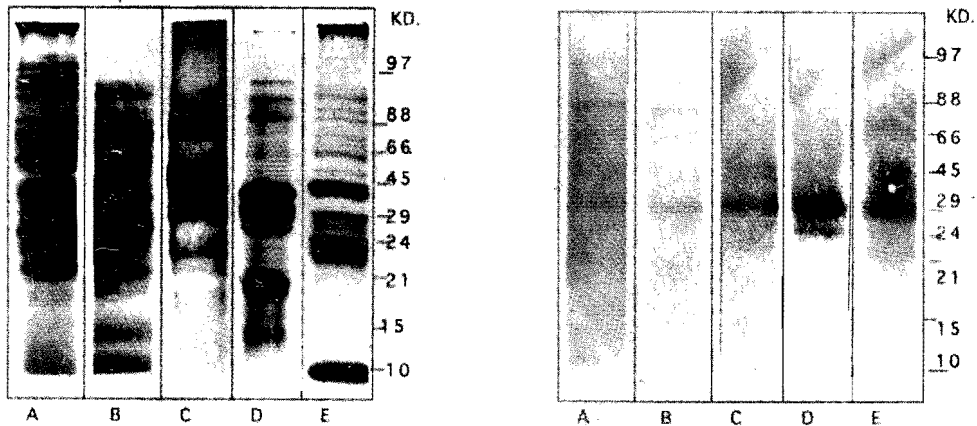


Fig.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida e Inmunolectrotransferencia (IET) de los extractos antigénicos de las diferentes fases de desarrollo de *Fasciola hepatica*. I. Patrón de proteínas totales de las 5 fases de desarrollo de *Fasciola hepatica*. II. Antígenos identificados por IET en las diferentes fases de desarrollo; se utilizó una mezcla de sueros de conejos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica* y obtenidos día el 21 posinfección. A. Fase adulta B. Fase juvenil. C. Metacercaria D. Redia E.Huevo.

Ensayos inmunoenzimáticos.

Los cinco extractos preparados a partir de los diferentes estadios de desarrollo de *F. hepatica* y confrontados con los sueros de los conejos infectados experimentalmente, por medio de el ELISA, se observó que a partir del séptimo día postinfección, se inició la detección de anticuerpos circulantes en contra de los cinco extractos empleados. En la Fig. 2 se muestra el incremento de los títulos de anticuerpos del grupo de conejos infectados, con respecto al tiempo de infección, comparados con el grupo testigo libre de infección, los puntos de cada dato representa la media del título de anticuerpos, transformados a su correspondiente valor en logaritmo base 10, con cinco conejos en cada grupo. Los valores de absorbancia de los cinco sueros de conejos infectados muestran una tendencia a incrementarse diferenciándose claramente de los sueros del grupo testigo negativo. Los valores máximos de las medias del título de anticuerpos se encuentran en los días 30-40 postinfección en los cinco extractos probados. En la figura 3 se señala la dilución en la cual los valores de los sueros positivos y negativos muestran la máxima separación de valores de absorbancia y fué utilizado como corte de positividad. La confrontación

de los sueros de los dos grupos de conejos con los diferentes extractos antigénicos, mostró diferentes niveles de detección de anticuerpos anti *F. hepatica*, al graficar los valores de absorbancia obtenidos contra el logaritmo de la dilución del suero a los 21 días postinfección, se observó una mayor detección de anticuerpos con los extractos de las fases juvenil y de metacercaria; esto permitió determinar el coeficiente de extinción colorimétrica que ubica el nivel de absorbancia en 0.1 que separa los valores positivos de los negativos (A414 nm), así como la mínima dilución de suero a usar en el ensayo, que en la figura 3 se localiza en 1:500, se puede observar que las diluciones más altas de los sueros negativos (señalados con una flecha), al ser confrontados con los extractos de las fases adulta y juvenil, se encuentran en el umbral del corte por lo que se podrían interpretar como falsos positivos; este fenómeno no se observó en los demás extractos.

La confrontación de los sueros provenientes de bovinos y ovinos infectados y los correspondientes grupos de sueros testigos negativos, con los extractos antigénicos de todas las fases de desarrollo, probados por el ELISA, mostraron que en los cinco extractos se detectan anticuerpos circulantes

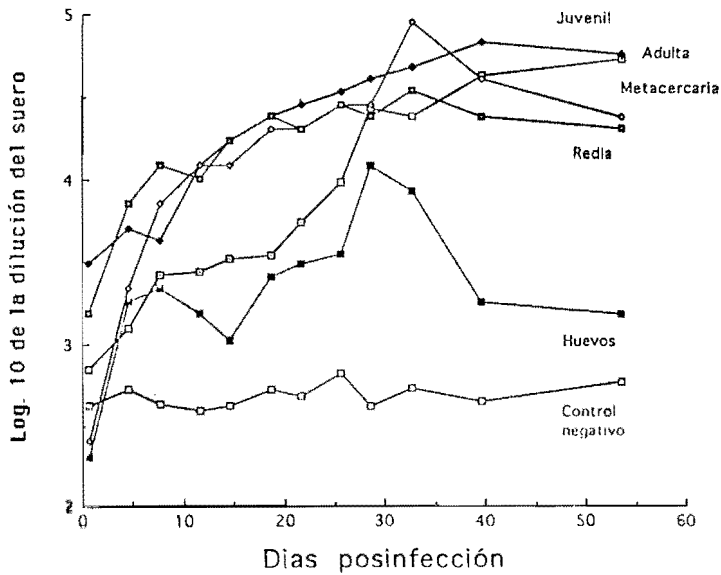


Fig. 2. Determinación por ELISA de los anticuerpos circulantes anti *Fasciola hepatica* en sueros de conejos infectados experimentalmente y sueros de conejos no infectados. Se utilizaron los extractos antigénicos de las diferentes fases de desarrollo para monitorear la cinética de los anticuerpos durante el desarrollo de la infección. Los puntos representan las medias de los títulos de anticuerpos encontrados a diferentes intervalos de tiempo.

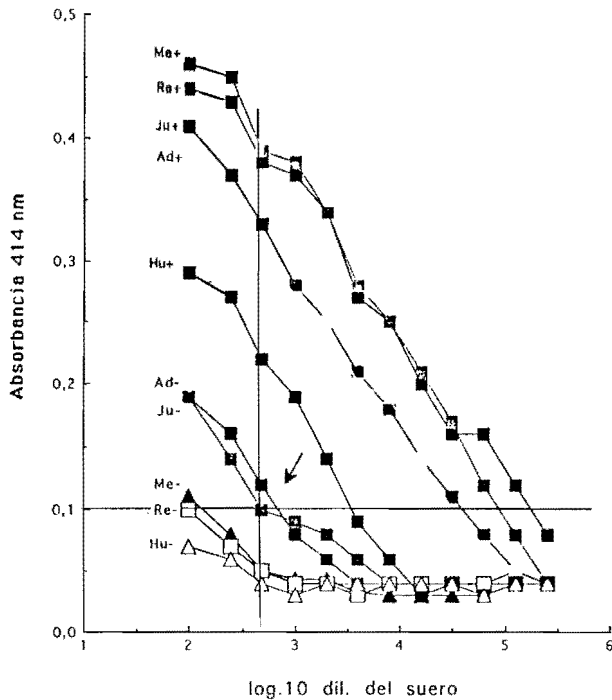
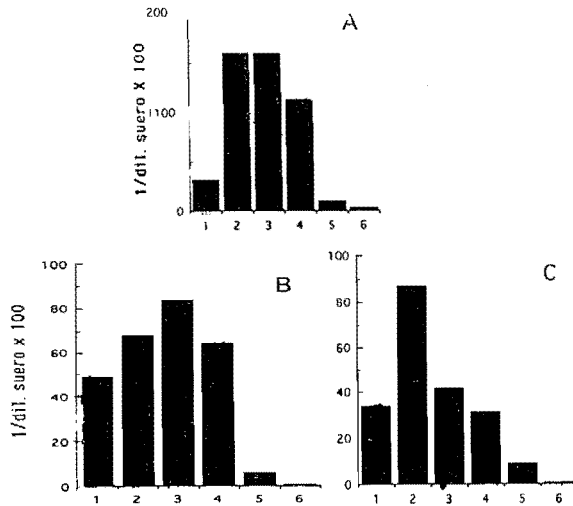
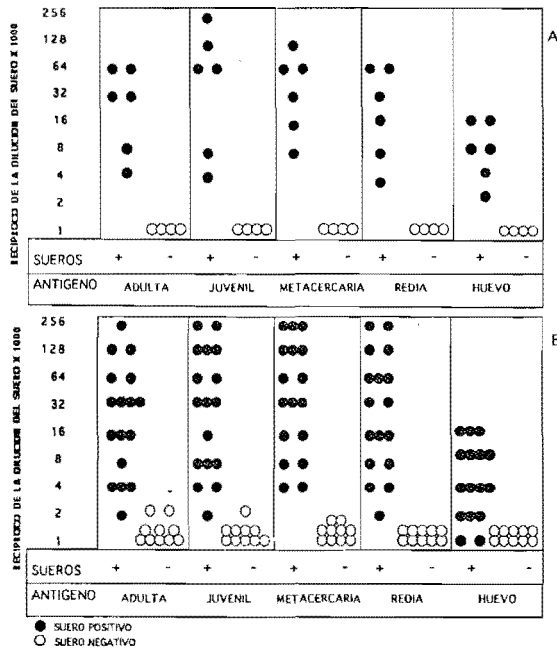


Fig. 3. Identificación de los niveles de corte de dilución y absorbancia para sueros de conejos positivos y negativos a *Fasciola hepatica*, confrontados contra los 5 diferentes extractos. Las líneas cruzadas señalan una absorbancia de 0.1 y una dilución de 1:500 como cifras mínimas significativas en la discriminación entre sueros positivos y negativos. La flecha señala el punto en el cual los extractos correspondientes a las fases adulta y juvenil, producen falsas reacciones positivas al confrontarse con los sueros negativos. El extracto utilizado se representa en la gráfica con las dos primeras letras de cada fase y los símbolos que preceden a las siglas indican la confrontación con sueros positivos (+) o negativos (-).



anti, *F. hepatica* (Fig. 4). Los promedios de títulos de anticuerpos obtenidos con sueros de conejo, ovino y bovino utilizando los cinco extractos, se muestran en la figura 5, donde se puede apreciar que los extractos de las fases juvenil y metacercaria permiten detectar títulos más altos en los sueros de las tres especies de animales estudiadas.

DISCUSION

Estudio de la ultraestructura de *F. hepatica* han demostrado que ocurren cambios durante el desarrollo del parásito en las células tegumentarias que secretan glicocalix en la superficie de *F. hepatica*. Los ensayos inmunológicos que utilizan suero de animales infectados y anticuerpos monoclonales, indican que los cambios están relacionados con péptidos de naturaleza antigénica (11). La inmunoelectrotransferencia confirma que se incrementa la complejidad antigénica conforme el parásito avanza hacia su madurez sexual, de hecho se hace evidente que existe un incremento súbito de antígenos detectados que coinciden con la fase de metacercaria, este incremento se mantiene durante el resto del desarrollo del parásito; sin embargo, ciertos antígenos se mantienen constantes durante todas las fases de desarrollo; se observó la constancia de un grupo de antígenos comprendidos entre los 21 y 29 kDa. (Fig 1-IA-E) que se mantienen como distintivos en esta especie de parásito. Esta observación es similar a la informada por otros autores en el sentido de que *F. hepatica* pueda tener antígenos comunes a todos los estadios del ciclo de vida (1). Este grupo antigénico fué identificado por los sueros de ovinos infectados por *F hepatica*, encontrando que existen antígenos inmunodominantes en diferentes fases de desarrollo del parásito con un peso molecular de 29-31 kDa (16). En trabajos previos se identificaron antígenos de peso molecular de 29 y 24 kDa en ventosa ventral y

tegumento respectivamente, de la fase juvenil de *F hepatica* (13), que podrían estar relacionados con los antígenos del mismo peso molecular identificados en este estudio. La diversidad de proteínas y antígenos identificadas por otros estudios han sido de glicoproteínas de 200 a 180 kDa en fases juveniles recién desenquistadas; en *F. hepatica* inmadura se han encontrado antígenos de 110,94 y 70 kDa, y en las formas maduras de 200, 150 y 25 kDa, así como proteínas de diversos pesos moleculares, lo cual concuerda en parte con el presente estudio (15, 12,11).

Los ensayos inmunoenzimáticos permiten detectar niveles circulantes de anticuerpos específicos anti *F hepatica* en conejos, con períodos muy breves de infección, de hecho los títulos se hicieron significativos a partir de los siete días post-infección. Existe una cierta tendencia a detectar anticuerpos tempranos al utilizar extractos provenientes de las fases juveniles o aquellos originados por metacercarias y redias, por esto se decidió utilizar los sueros obtenidos a los 21 días posinfección de los conejos, para detectar los antígenos tempranos, ya que es en este período cuando las diferencias en los títulos de anticuerpos se hacen mas marcadas como se observa en la figura 2; esto coincide con los datos informados previamente (1). Existen algunos antígenos que sólo se expresan en una fase temprana de desarrollo; pero el patrón de antígenos inmunoelectrotransferidos no permitió una identificación precisa de estos. Los datos obtenidos por el ELISA, al comparar la reactividad del suero de conejos infectados muestran que el antígeno proveniente de parásitos juveniles, metacercarias y redias, ofrecen mayor sensibilidad en la detección de infección aguda temprana, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$), al compararse las medias de los títulos de anticuerpos a los 21 días posinfección confrontados con los extractos antigénicos provenientes de las fases juvenil,

metacercaria y adulta (Fig. 5-A). Los mismos datos demuestran que las redias y los huevos comparten antígenos con estadios posteriores, corroborando informes previos (12). El efecto de detección de anticuerpos tempranos atribuibles a los extractos de fases juveniles y metacercarias, también fué observado en ovinos y bovinos (Fig. 5-B y C). Todos los extractos antigénicos muestran valor potencial para ser utilizados en ensayos inmunodiagnósticos, pese a la variabilidad de los valores de absorbancia de la fracción antigénica proveniente de huevos, los restantes extractos son capaces de diferenciar con gran sensibilidad los sueros de los bovinos y ovinos infectados, de los sueros testigos. Las diferencias detectadas en los ensayos inmunoenzimáticos pueden ser atribuidos a los antígenos identificados en las diferentes fases de desarrollo, existe la probabilidad que los antígenos comprendidos en el intervalo de los 21 a los 29 kDa tenga un papel preponderante en los eventos inmunológicos desencadenados durante la infección de *F. hepatica*.

En estudios previos el ELISA ha sido utilizado para el diagnóstico de la infección de *F. hepatica* en bovinos y ovinos experimentalmente infectados (14), aunque los resultados muestran que el ensayo tiene una aplicación práctica, el presente estudio hace notar que es necesario examinarlo nuevamente para determinar sus limitaciones en condiciones naturales de la infección. Es probable que el uso de los antígenos con un intervalo de 21 a 29 kDa sean firmes candidatos a ser utilizados en el ELISA que permitan detectar anticuerpos específicos, no importando si se encuentra al inicio de la infección, en la fase aguda o en la fase crónica; esta ventaja ayudaría en pruebas de monitoreo epidemiológico a reducir el número de falsas reacciones positivas y negativas.

IDENTIFICATION OF ANTIGENS FROM DIFFERENT STAGES OF DEVELOPMENT OF *Fasciola hepatica*

SUMMARY

Antigens from eggs, redia, metacercariae, juvenile and adult *Fasciola hepatica* were identified by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot techniques. Sera from experimentally infected rabbits with *F. hepatica* were used. Two antigens with molecular weight (MW) of 24 kiloDaltons (kDa) and 29 kDa were identified to be common to all the developmental stages studied. Adult and juvenile stages also shared common antigens of MW 10, 12, 15, 17, 21, 42, 66 and 88 kDa. In addition, three antigens of MW 21, 42 and 45 kDa were detected in metacercariae and one of 45 kDa in eggs. All the crude antigens from the different stages were evaluated by the ELISA test with sera from rabbits and sheep experimentally infected with *F. hepatica* and sera from naturally infected cattle. There was a statistically significant difference $P < 0.05$, in the antibody titers of infected rabbits with *Fasciola hepatica* when tested against the five different antigens in that antigens from redia, metacercariae and juvenile detected 6.33 times greater titers than antigens from adults. The differences were also observed with cattle and sheep sera but to a lesser extent.

KEY WORDS: *Fasciola hepatica*, Antigens, Electrophoresis, Immunoblot, ELISA.

REFERENCIAS

1. Sandeman R M, Howell M J. *In vitro* studies of the response of sheep to infection with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1980. 6:347
2. Harness E, Hughes D L, Doy T G. Demonstration of prehepatic immune response to *Fasciola hepatica* in the mouse. *Int. J. Parasitol.* 1976. 6:15
3. Doy T G, Hughes D L, Harness E. Resistance of the rat to reinfection with *Fasciola hepatica* and possible involvement of intestinal eosinophils leucocytes. *Res. Vet. Sci.* 1978. 25:41
4. Lang B Z, Donen N D. Host-Parasite relationship 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.* 1972. 62:232
5. Bennett C E. The identification of soluble adult antigen on the tegumental surface of juvenile *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* 1978. 34:85
6. Santiago N, Hillyer G V, Garcia-Rosa M., Morales M H. Identification of functional *Fasciola hepatica* antigens in experimental infections in rabbits. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1986. 35:135
7. Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951. 193:265.
8. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970. 227:680.
9. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to

- nitrocellulose sheets. Proc. Natl. Acad. Sci. 1979 76:4350.
10. Santiago N, Hillyer V G. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 1988 74(5):810.
 11. Dalton P J, Joyce P. Characterization of surface glycoproteins and proteins of different developmental stages of *Fasciola hepatica* by surface radiolabeling. J. Parasitol 1987. 73(6):1281.
 12. Reddingon J J, Leid R W, Wescott R B. A review of antigens of *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol. 1984. 14:209.
 13. Miranda-Miranda. E, García-Vázquez Z. Aislamiento e identificación *in situ* de antígenos de *Fasciola hepatica*. Vet. Mex. 1994. 25(3) 267.
 14. Wescott R B, Farrel C J, Shen D T. Diagnosis of naturally occurring *Fasciola hepatica* infections in cattle with an enzyme-linked immunosorbent assay. Am. J. Vet. Res. 1984. 45(1):178.
 15. Bennett E C, Joshua W P, Hughes L D. Demonstration of juvenile specific antigens of *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 1982. 68(5):791.
 16. Sexton L J, Milner A, Campbell J N. *Fasciola hepatica*: immunoprecipitation analysis of biosynthetically labelled antigens using sera from infested sheep. Parasite Immunol. 1991. 13:105.
 17. Ruiz-Navarrete M A, Arriaga C, Bautista C R, Morilla A. *Fasciola hepatica*: Characterization of Somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep. Rev. Lat.-Amer. Microbiol. 1993. 35:301