

CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL HACIA ANTIGENOS DE SECRECION EXCRECION DE *Fasciola hepatica* EN OVINOS TRATADOS CON ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND^a

Leticia García Casanova^b
Sergio D. Rodríguez Camarillo^c
Carlos Ramón Bautista Garfias^c

RESUMEN

Con objeto de identificar los antígenos de excreción/secreción (E/S) de *Fasciola hepatica*, reconocidos por los sueros de ovinos tratados con adyuvante completo de Freund (ACF), durante el curso de una infección experimental, se emplearon 30 ovinos en 6 grupos de 5 animales, que se infectaron en el día 0 con 250 metacercarias de *F. hepatica*. Los animales de los grupos 1 al 5, se inocularon intraperitonealmente (IP) con ACF los días 14 y 7 antes, y los días 0, 7 y 14 después de la infestación con las metacercarias. El grupo 6 fue testigo. Semanalmente, en 14 ocasiones, se les tomó muestra de suero que se tituló por medio de la prueba de hemaglutinación pasiva (HP) y se expuso a papel de nitrocelulosa, previamente transferido con antígenos de E/S, para analizar las proteínas reconocidas específicamente por IgM e IgG. Ambas técnicas se llevaron a cabo con antígeno de E/S del tremátodo. El inicio de la respuesta de anticuerpos por HP se observó a la semana 2 posinfección (PI), alcanzando títulos máximos en las semanas 3 y 5 PI. Para la semana 12 PI, los títulos descendieron sin llegar a los niveles iniciales. En la inmunoelectrotransferencia, 11 bandas antigénicas con pesos moleculares aparentes (PMA) superiores a 29 kDa, predominando las de 36, 45 y 57 kDa, fueron reconocidas por las IgM de los sueros de los animales, y solo 9 por las IgG, observándose principalmente las de PMA 135, 125, 44, 28, 26.5 y 25 kDa. A partir de la semana 2 PI, se apreciaron las de 25 a 28 kDa y desde la semana 6 PI, las de menos de 25 kDa. Los sueros de los 12 ovinos seleccionados reconocieron la banda de 44 kDa. Los patrones de reconocimiento que muestran los sueros de ovinos tratados con ACF e infectados con *F. hepatica* fueron semejantes a los del grupo testigo.

PALABRAS CLAVE: *Fasciola hepatica*, Antígenos, Inmunoelectrotransferencia, Ovinos, Hemaglutinación Pasiva, Adyuvante completo de Freund.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 34 No. 3 (1996).

INTRODUCCION

La identificación y aislamiento de antígenos de *Fasciola hepatica* es importante para la mejor comprensión de los mecanismos inmunes y la caracterización de antígenos específicos disponibles, para el diagnóstico y la protección contra la fasciolosis. Se ha encontrado que, cuando se fraccionan los productos de secreción/excreción (E/S) de *F. hepatica*, las fracciones de alto peso molecular reaccionan con suero de ovino, rata y conejo infectados con el tremátodo y que los de bajo peso molecular, solo reaccionan con el suero de conejo y ovino (1). Asimismo, Rivera y col. (2), mencionan que el suero de ovino infectado detecta predominantemente polipéptidos de 150-169 kDa y que polipéptidos de 25 a 30 kDa, constituyen candidatos excelentes para el diagnóstico de fasciolosis aguda. Por otra parte Hillyer y Soler

(3), mencionan que una proteína de 17 kDa es adecuada para el diagnóstico, ya que es específicamente detectada por los sueros de bovinos y ovinos infectados, no presentando reacción cruzada contra otros parásitos relacionados y desapareciendo la reactividad hacia este antígeno después de la quimioterapia exitosa.

Por otra parte, el efecto inmunoestimulante del adyuvante completo de Freund (ACF) sobre infecciones bacterianas y parasitarias ha sido ampliamente estudiado. A este respecto Bomford (4), al revisar el efecto ACF sobre las enfermedades parasitarias, encontró que en varias de estas infecciones hay un efecto potenciador del sistema inmune contra el agente parasitario. Asimismo, se ha observado que la aplicación intraperitoneal del ACF en ovinos, confiere resistencia parcial contra *Haemonchus contortus* (5) y *F. hepatica* (6,7). El ACF también aumenta niveles de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2, además de que la micobacteria componente

^a Recibido para su publicación el 29 de febrero de 1996.

^b CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR, Km 15.5, Carretera México-Toluca, Cuajimalpa, D.F., C.P. 05110.

^c CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP-SAGAR, A. P. 206 CIVAC, C.P. 62500, edo. de Morelos, México

de este adyuvante, estimula la activación de los macrófagos (8).

En el presente trabajo, se ensayaron sueros de ovinos infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica*, para tratar de caracterizar la respuesta humoral hacia los productos de E/S de *F. hepatica* adulta, a través del curso de una infección experimental, en animales tratados con ACF, e identificar la variación de los perfiles antigénicos de los productos de E/S, reconocidos por el mismo hospedero y entre hospederos durante la infección.

MATERIALES Y METODOS

Se emplearon 30 ovinos, de ambos sexos, de raza pelibuey, de 7 a 8 meses de edad, libres de *F. hepatica*, los cuales se mantuvieron bajo condiciones de semiconfinamiento. Todos los ovinos se desparasitaron con Clorhidrato de Levamisol, cada 21 días previos al inicio del experimento. El lote se dividió en seis grupos de cinco animales cada uno, cada grupo se identificó con números progresivos y los tratamientos se asignaron al azar. Los ovinos de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 se inocularon por vía intraperitoneal (IP), con 1 ml de ACF emulsificado en un volumen igual de solución salina amortiguadora de fosfatos (SSAF) por animal, de la siguiente manera: los grupos 1 y 2 se inocularon 14 y 7 días antes de la infección con *F. hepatica* respectivamente; el grupo 3 recibió el tratamiento el día de la infección y los grupos 4 y 5 lo recibieron 7 y 14 días posinfección (PI) respectivamente. Por último, el grupo 6 (testigo), sólo recibió 2 ml de SSAF por la misma vía. Todos los ovinos recibieron en el día 0, 250 metacercarias de *F. hepatica*, obtenidas bajo condiciones de laboratorio (9). Semanalmente, en 14 ocasiones (1 semana antes de la infección hasta 12 semanas PI), se tomaron muestras de sangre de cada uno de los animales para obtener el suero y este se almacenó a -20 C hasta su uso. A las 12 semanas PI, los ovinos fueron sacrificados, extrayendo el hígado para coleccionar fasciolas del parénquima, conductos

biliares y vesícula biliar.

Las muestras de suero se analizaron por medio de los ensayos de hemaglutinación pasiva (HP), de acuerdo a lo descrito por Bautista (10) para determinar los títulos de anticuerpos contra *F. hepatica*, y por inmunoelectrotransferencia (IET), según lo descrito por Towbin y col. (11), para determinar el reconocimiento de fracciones antigénicas. La electroforesis se desarrolló en geles discontinuos de poliacrilamida-SDS, de acuerdo a Laemli (12) en geles preparativos de 12.5% (12), usando marcadores preteñidos de peso molecular (SIGMA, St. Louis Missouri) con valores de 14.3 (lisozima) a 200 kDa (miosina). La transferencia de proteínas de los geles al papel de nitrocelulosa de 0.45 mm (Millipore, México D.F.), se realizó a voltaje constante (50 V) por 1 hora en solución amortiguadora de 0.025 M Tris/0.192 M Glicina /20% metanol, pH 8.3. La nitrocelulosa se incubó durante toda la noche a 4 C, en una solución amortiguadora de Tris-HCl pH 7.4/2% leche descremada (TBS-leche) para bloquear los sitios reactivos libres. Ya bloqueada, la nitrocelulosa se cortó en tiras de 5 mm de ancho y se incubaron por una hora con el suero diluido 1:100 en TBS-leche. Después de tres lavados con TBS/0.05% Tween 20, las tiras de nitrocelulosa se incubaron por una hora con los conjugados anti IgG (SIGMA) o anti IgM (CAPPEL) ovino, unido a peroxidasa de rábano, diluidos respectivamente 1:500 y 1:1000 en TBS-leche, respectivamente. Las tiras se lavaron como se describió anteriormente y se expusieron a una solución del sustrato (100mg 4-cloro-naftol; 33 ml metanol absoluto; 165 ml salina tamponada [20 mM Tris-HCl, 0.2M NaCl] y 66ml de H₂O al 30%), durante 10 minutos o hasta que la reacción se hiciera aparente. Para detener la reacción, las tiras se lavaron con agua destilada.

Todos los sueros se sometieron a la prueba de HP, mientras que con IET sólo se trabajaron las muestras de 12 animales. Para

esta prueba se seleccionaron muestras de sueros de dos animales de cada grupo, las cuales correspondieran a los ovinos con mayor y menor número de parásitos por grupo, pretendiendo con esto, abarcar una amplia gama de la respuesta inmune de cada grupo en particular. Para determinar el perfil de reconocimiento de antígenos por IgG, se examinaron los sueros desde el día de la infección hasta la semana 12 PI, además, se realizaron mezclas de sueros de los cinco animales del mismo grupo y se trabajaron las semanas 2, 4, 6, 8 y 10 PI. Para determinar los perfiles antigénicos reconocidos por IgM, se emplearon los sueros de los mismos 12 animales y de las mezclas de los sueros de los 5 ovinos de cada grupo, sólo se trabajaron las correspondientes a las semanas 0, 2, 4, 6 y 8 PI.

En ambas técnicas se empleó una mezcla de productos de E/S de *F. hepatica* adulta, preparada de acuerdo a Ruiz (13). El antígeno se concentró 5:1 por vacío, usando ultrafiltros de inmersión CX (Millipore México D.F.), con poro de corte de 10 kDa para poder ser usado en IET. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (14).

Para determinar la especificidad de las reacciones séricas de las muestras obtenidas, se realizaron pruebas cruzadas con antígeno somático de *Haemonchus contortus*, *Moniezia spp.* y antígeno de fluido vesicular de la fase larvaria de *Taenia solium*.

Para estas pruebas, se emplearon los sueros de las semanas 0, 4 y 8 PI, de dos animales que reconocieron el mayor número de bandas cuando se sometieron al antígeno de *F. hepatica*. De estos dos sueros, se hizo una mezcla la cual se adsorbió con los tres antígenos heterólogos; una fracción de la mezcla de los sueros se adsorbió por separado con el antígeno de *F. hepatica*.

El análisis estadístico de los valores de fasciolas recuperadas en el hígado, se analizaron mediante un diseño de bloques al azar 6 X 2, con 5 repeticiones, usando el paquete «General Linear Model» del SAS, y las diferencias entre las medias se sometieron a la prueba de Tukey (15).

RESULTADOS

Recuperación de fasciolas del hígado.

De las metacercarias administradas, a la necropsia, se localizaron un promedio de 39 ± 23.5 (desviación estándar) fasciolas por hígado, por ovino, para el grupo testigo, resultando esto en 15.5% de recuperación del total administradas. El grupo 2 presentó el menor número de fasciolas recuperadas con sólo 5.2 ± 6.2 fasciolas en promedio, correspondiendo a un porcentaje de recuperación de 13.3% con respecto del grupo control. De los grupos 1, 3, 4 y 5 se colectaron en promedio 19.8 ± 19.2 , 14.8 ± 21.9 , 12 ± 11 y 15.8 ± 13.7 fasciolas respectivamente. En el Cuadro 1, se presentan los resultados en

CUADRO 1. PROMEDIO DE FASCIOLAS RECUPERADAS DE HIGADO POR GRUPO DE OVINOS INFECTADOS Y TRATADOS CON ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND

GRUPO	DIA DE TRATAMIENTO*	PROMEDIO \pm D.E	REDUCCION (%)**
1	-14	19.8 ± 19.2 ^{ab}	49.2
2	-7	5.2 ± 6.4 ^b	86.7
3	0	14.8 ± 21.9 ^{ab}	62.0
4	7	12.0 ± 11.0 ^{ab}	69.2
5	14	15.8 ± 13.7 ^{ab}	61.5
6	-	39.0 ± 23.5 ^a	0.0

* Con respecto al día de la infección realizada el día 0 con 250 metacercarias de *F. hepatica* obtenida bajo condiciones de laboratorio.

^{ab} Diferentes literales en la misma columna indican diferencia significativa ($p < .05$).

** % de reducción = $100 - (\bar{x} \text{ parásitos del grupo} \times 100 / \bar{x} \text{ parásitos del grupo testigo})$

forma de porcentajes de reducción de establecimiento, con respecto de los testigos, notando que el grupo 2 fue el que mostró el mayor porcentaje de reducción de todos los grupos, siendo de 86.7%.

El análisis de varianza, aplicado al número de fasciolas encontradas en hígado, no fue estadísticamente significativo ($p > .05$), pero el valor crítico de «F» (2.64) se encontró muy cercano al valor de «F» calculado (2.11); por tal motivo, los datos se sometieron a la prueba de diferencia entre medias de Tukey (15), obteniéndose diferencia significativa ($p < .05$) entre el grupo 2, tratado una semana antes de la infección y el grupo testigo.

Títulos de anticuerpos por medio de Hemaglutinación Pasiva.

La resultados de la serología realizada por medio de la técnica de HP, utilizando productos de E/S para determinar los títulos de anticuerpos anti-*F. hepatica*, se transformaron a su logaritmo de base 2. En

la Figura 1, se observa que los animales comenzaron a reaccionar desde la semana 2 PI y con incrementos graduales en las semanas 3 y 4 PI en todos los grupos. Para la semana 12 PI los títulos descendieron sin llegar a los valores iniciales. Es importante hacer notar que, los mayores títulos de anticuerpos contra *F. hepatica* se observaron en los grupos 1, 4 y 5 y los menores fueron para los grupos 2 y 3.

Para el grupo 6 que no recibió tratamiento con ACF, el incremento de los títulos fue importante en las primeras semanas (semana 1 - 3), y presentó un decremento drástico a partir de la semana 6 y se mantuvo constante hasta la semana 12 PI.

Inmunoelctrotransferencia

Al análisis de la respuesta de IgG hacia los antígenos de E/S, en el grupo testigo que sólo recibió la infección sin el inmunoestimulante, y del cual se recuperaron el mayor número de parásitos adultos a la

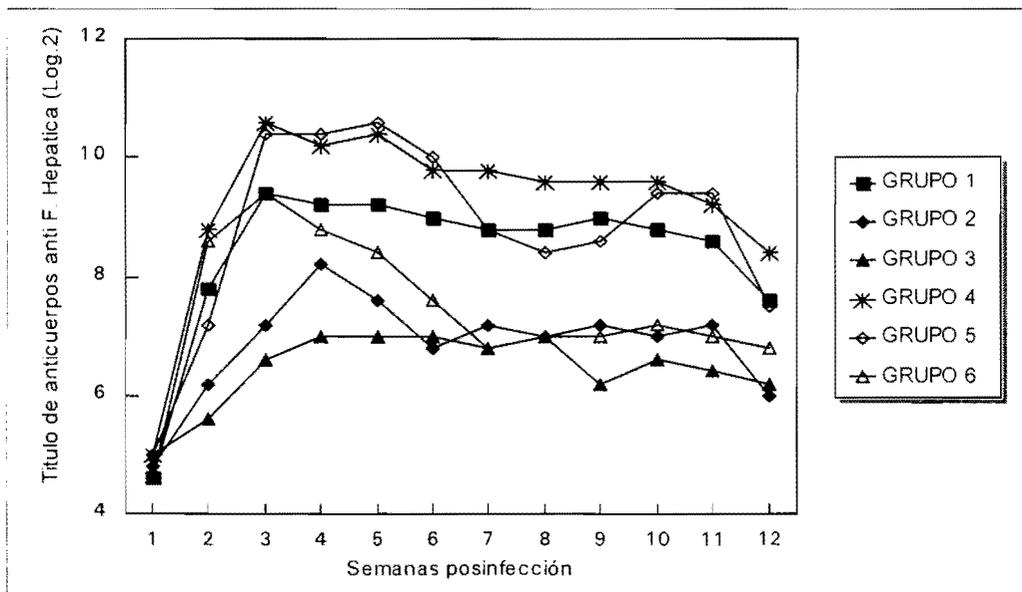


Figura 1. Promedio del título de anticuerpos (\log_2) determinados por hemaglutinación pasiva en ovinos infectados con *F. hepatica* y tratados con ACF a los -14 (Grupo 1; ■), -7 (Grupo 2; ◆), 0 (Grupo 3; ▲), +7 (Grupo 4; *) y +14 (Grupo 5; ◇) días antes de la infección. El grupo 6 (△) sirvió como testigo. Se emplearon glóbulos rojos formalinizados sensibilizados con productos de secreción/excreción de *F. hepatica*.

necropsia, en general se observó un mayor reconocimiento en el número de bandas, detectándose de manera relevante nueve bandas antigénicas con los siguientes pesos moleculares aparentes (PMA) 135, 125, 44 (compuesta por tres bandas), 28, 26.5, 25, 17, 12 y 11 kDa. En contraste, en el grupo 2 sólo se detectaron tres bandas (28, 26.5 y 25 kDa) y en algunas semanas se detectó la de 44 kDa. En todos los grupos, las dos bandas de alto peso molecular de 135 y 125 kDa aparecen alrededor de la semanas 4 y 5 posinfección y permanecen visibles hasta la semana 12. En todos los animales de los grupos 1, 3, 4 y 5 se manifestó la banda de 44 kDa entre la tercera y cuarta semana PI, el complejo de bandas de 28, 26.5 y 25 kDa aparecen desde la semana 2 PI, sin embargo, los sueros de cuatro animales la reconocen antes de la infección. Por último, la banda de aproximadamente 17 kDa se reconoció por sueros de 5 animales y aparece alrededor de la semana 6 o 7 PI (Figura 2). Al probar los sueros en IET por grupo, sólo permanecen visibles las bandas de 25, 26.5, 28 y 44 kDa (Figura 3).

Al análisis de la respuesta de IgM, se reconoció un máximo de 11 bandas, y en contraste con lo observado usando anti-IgG, se observó un menor reconocimiento de bandas en los animales con mayor número de fasciolas a la necropsia, reconociendo sólo 5 bandas de 36, 45, 57, 125 y 135 kDa. Los sueros de los dos ovinos seleccionados del grupo 1, fueron los que reconocieron el mayor número de bandas (11 bandas) y los sueros de los ovinos del grupo 6, sólo reconocieron las cinco bandas citadas (Figura 4). Las muestras séricas de 7 ovinos (7 de 12) reconocen la mayoría de las bandas entre las semanas 2 y 4 PI. Los sueros de los dos ovinos del grupo 2, reconocen componentes antigénicos desde la semana 2 PI. Las bandas de 125 y 135 kDa, fueron reconocidas con particular alta intensidad por los sueros de los animales de los grupos 3, 4 y 5. Al probar los sueros en IET por grupo, se observó que la respuesta disminuye en intensidad, detectándose sólo aquellas bandas comprendidas entre 36 y 57 kDa; por otra parte, la mezcla de sueros de los grupos 1, 2, 3, 4, y 5 reconoce solamente estas

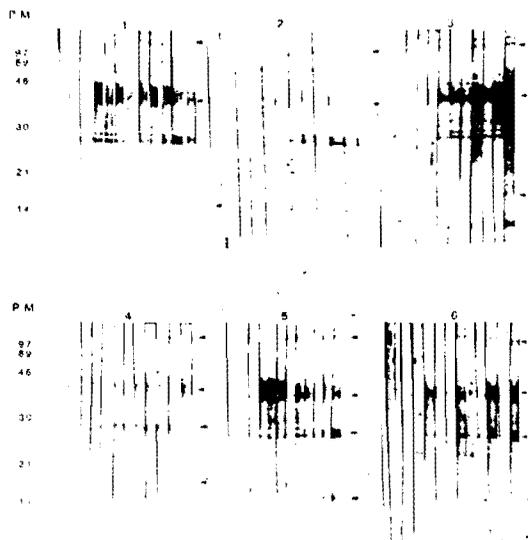


Figura 2. Reconocimiento de antígenos de E/S de *F. hepatica* por medio de inmunoelctrotransferencia con IgG por sueros de ovinos infectado 12 semanas con *F. hepatica* y tratados o no tratados con ACF. Cada serie de inmunotransferencias corresponde al perfil de reconocimiento de un ovino con mayor número de fasciolas en hígado por grupo.

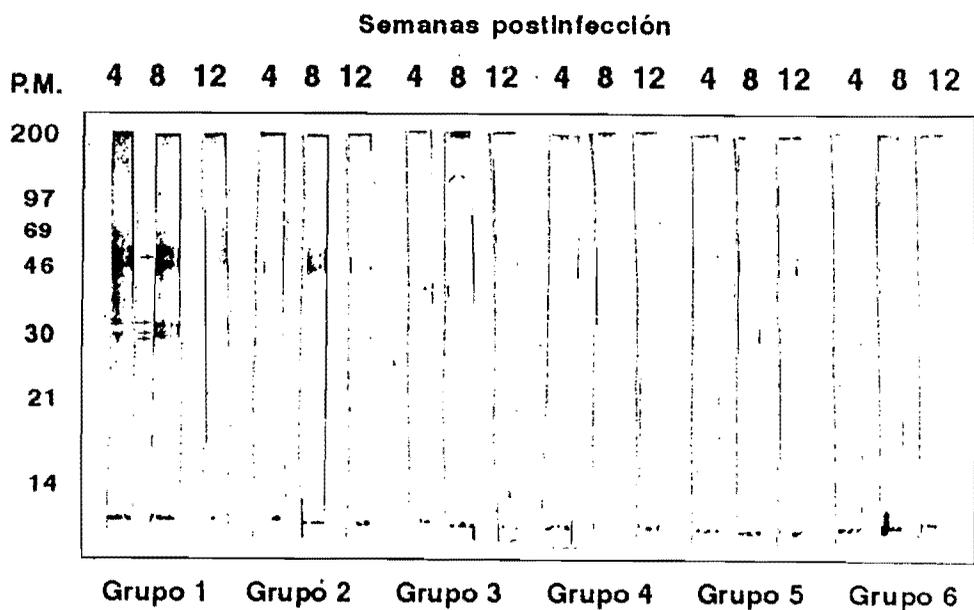


Figura 3. Reconocimiento de antígenos de E/S de *F. hepatica* por medio de inmunolectrotransferencia con IgG en sueros de ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica* durante 12 semanas y tratados con ACF a diferentes intervalos de la infección (Los animales de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 se inocularon intraperitonealmente con ACF a los -14, -7, o 7 y 14 días de la infección respectivamente, el grupo 6 fue testigo). Los perfiles observados representan la mezcla de sueros de los animales de cada grupo con mayor y menor número de fasciolas recuperadas a la necropsia.

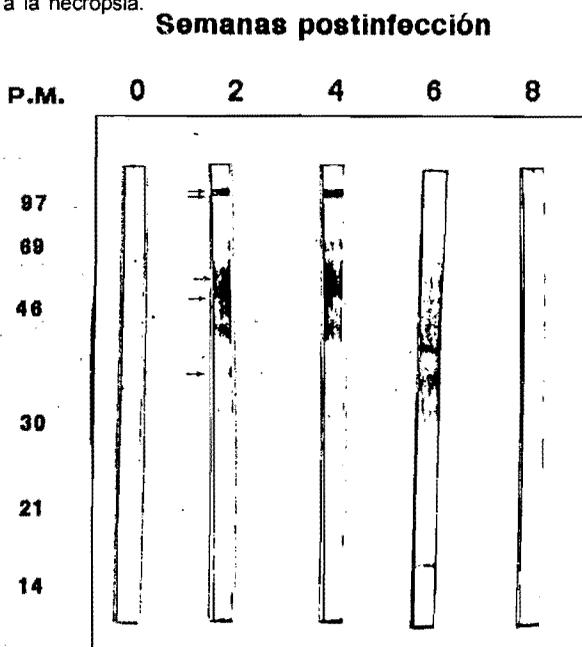


Figura 4. Reconocimiento de antígenos de E/S de *F. hepatica* por medio de inmunolectrotransferencia con IgM en el suero de un ovino del grupo 4 infectado durante 12 semanas con *F. hepatica* y tratado con ACF 7 días posinfección.

bandas entre las semanas 4 y 8 PI (Figura 5), mientras que, la mezcla de sueros del grupo 6, reconoce dos bandas (47 y 57 kDa) en la semana 4 PI.

Reacciones cruzadas por medio de IET

Al exponer la mezcla de los sueros de los dos ovinos infectados con *F. hepatica*, contra antígenos de *H. contortus*, *Moniezia spp* y *T. solium*, separados por electrotransferencia, las IgG de estos animales reconocen 19 bandas antigénicas, sólo cuando los sueros se confrontaron con el antígeno de fase larvaria de *T. solium* (Figura 6). No se encontró coincidencia entre el reconocimiento de bandas entre los diferentes antígenos por los sueros de los ovinos infectados con *F. hepatica*.

DISCUSION

En el presente trabajo se usó el adyuvante completo de Freund en ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica*, para tratar de determinar el efecto

inmunomodulador del adyuvante, sobre el número de parásitos en hígado y la respuesta inmune humoral de los hospederos. En el primer caso, se observó gran variación dentro de los grupos en el número de fasciolas recuperadas al sacrificio; de esta forma, la comparación de los porcentajes de parásitos en hígado, no representó una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.5$), sin embargo, consideramos que cuenta con importancia biológica, ya que en el grupo 2 se observó un 87% de reducción de parásitos, comparado con el grupo testigo.

Los títulos observados por medio de HP manifiestan un patrón similar al informado por Nájera (16), quien menciona que el incremento en la semana 2 PI, puede deberse al proceso de migración de las fasciolas inmaduras en el parénquima hepático y que el descenso entre las semanas 9 y 10, es una consecuencia del establecimiento de los parásitos en los ductos biliares, donde el estímulo antigénico se reduce marcadamente.

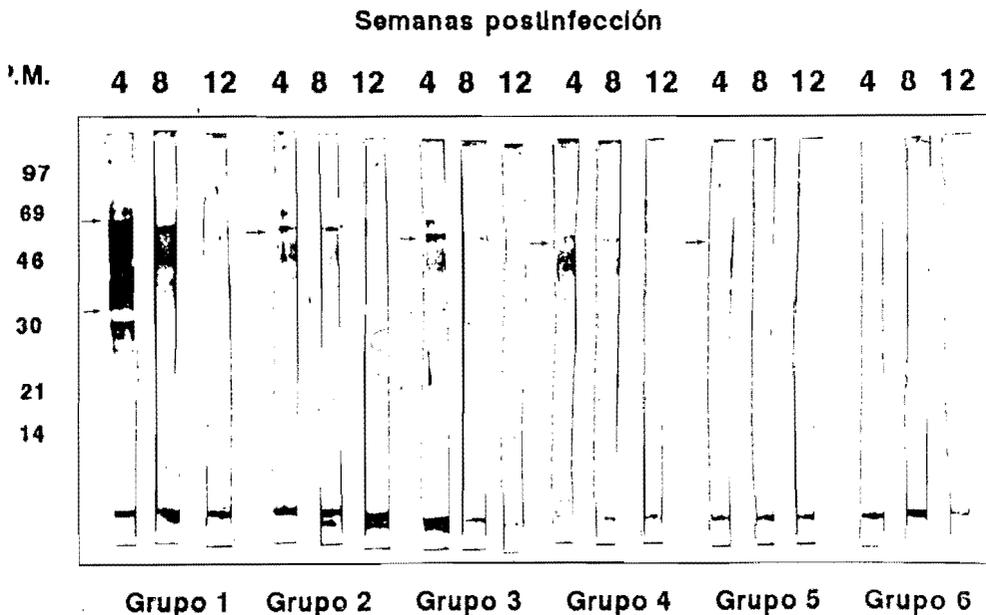


Figura 5. Reconocimiento de antígenos de E/S de *F. hepatica* por medio de inmunolectrotransferencia con IgG en sueros de ovinos infectados experimentalmente con *F. hepatica* durante 12 semanas y tratados con ACF a diferentes intervalos de la infección (Los animales de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5 se inocularon intraperitonealmente con ACF a los -14, -7, 0, 7 y 14 días de la infección respectivamente, el grupo 6 fue testigo).

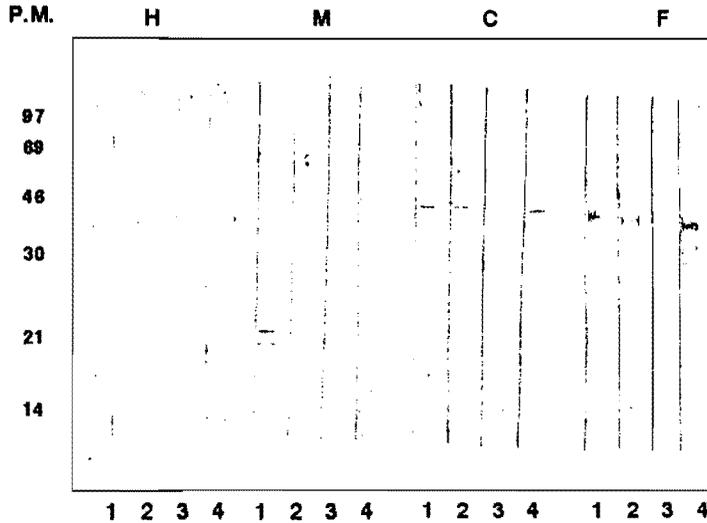


Figura 6. Respuesta de IgG de la mezcla de dos sueros de ovinos infectados con *F. hepática*, probados para especificidad con antígenos de parásito completo de *Haemonchus contortus* (H), macerado de *Moniezia spp.* (M), fluido vesicular de *Cisticercus cellulosae* (C) y antígenos de excreción/secreción de *F. hepática* (F), Línea 1. suero adsorbido con H, M y C; línea 2. suero adsorbido con F, línea 3. suero negativo y línea 4 suero positivo.

En el presente estudio se caracterizó parcialmente el reconocimiento de antígenos parasitarios a través del curso de una infección experimental con *F. hepatica*. La respuesta de IgG anti-*F. hepatica*, se inicia desde la semana 3 PI, con máxima actividad de reacción después de la semana 9 PI. Las bandas detectadas mostraron un amplio rango de PM aparente, que varió entre alto (135-125 kDa), medio (44-25 kDa) y bajo (menores de 25 kDa). Estas bandas de reacción concuerdan con las identificadas por Sexton y col. (17), quienes en su trabajo de caracterización de antígenos metabólicos y somáticos de *F. hepatica*, determinan que el mayor número de bandas reconocidas se encuentran entre 29 y 43 kDa. El estudio de los perfiles de reconocimiento de dichos sueros indica que, bandas menores de 25 kDa se revelan desde las cuatro semanas PI, lo cual concuerda con la presentación crónica de la fasciolosis. Al respecto Ruiz (13), menciona que algunas de las bandas de peso molecular bajo, no son específicas de *F. hepatica*, porque son reconocidas tanto por grupos infectados como no infectados,

efecto que se observó en el presente trabajo con algunos animales, y en otros hasta la semana 4 o 5 PI. Estos mismos antígenos no fueron detectados por Solano y col. (18) quienes informaron de la detección de proteínas con peso molecular superior a 29 kDa. La banda que se manifiesta con un PMA de 44 kDa fue reconocida por todos los animales infectados con *F. hepatica*, y ninguno de los sueros la detectó antes de la infección; por lo tanto, este antígeno podría ser de características relevantes para el diagnóstico de fasciolosis crónica en los ovinos.

Solano y col. (18), en su caracterización de anticuerpos monoclonales contra *F. hepatica*, mencionan la observación de bandas de reacción en forma de complejos dobles, ellos muestran los siguientes complejos: 180/160, 93/63, 53/50 y 32/29. En el presente estudio también se observaron complejos semejantes, pero de diferente peso molecular. Estas diferencias podrían deberse a cualquiera de las siguientes opciones: un proceso proteolítico que degrade las mismas bandas, haciéndolas aparecer como de menor

peso; proteínas independientes, recordando que los anticuerpos monoclonales pueden diferenciar un mayor rango de antígenos diferentes de las observadas por los anticuerpos policlonales en el suero de los ovinos; o deberse a diferencias de glicosilación o representar dos moléculas con epitopos parecidos. Asimismo, la diferencia entre bandas, puede deberse a que estos autores usaron inmunoprecipitación, que es un proceso diferente a IET, o posiblemente al tipo de antígeno empleado, pudiendo ser diferentes en cuanto al proceso de obtención y conservación o a la adición de inhibidores enzimáticos. Con respecto a la influencia de inhibidores, ésta se descarta pues el antígeno que se empleó no requirió de inhibidores, ya que a diferentes lapsos se corrió electroforéticamente el antígeno y se encontraron las mismas bandas proteicas, al ser teñidas con azul de Coomassie.

Por otra parte, se observó que el menor reconocimiento de bandas antigénicas de *F. hepatica* por IgG fue para el grupo 2, que se trató con ACF una semana antes de la infección, manifestándose sólo las de 26.5, 28 y 44 kDa. Posiblemente, en este grupo se estimuló la inmunidad celular y no lo suficiente la inmunidad humoral, siendo esta última una respuesta no protectora, considerando que se ha encontrado que los niveles de anticuerpos no presentaron una correlación con la protección contra *F. hepatica* en ovinos (19).

La respuesta de IgM determinada por IET se manifestó de manera temprana, ya que solo se observó en las primeras semanas (semana 2 a la 8), a diferencia de la respuesta de IgG, la cual se observó de manera más consistente hasta la semana 12. Con respecto a la respuesta de IgM, se encontró reactividad contra componentes antigénicos de PM aparente superior a 36 kDa. Solano y col. (18), al caracterizar anticuerpos monoclonales hacia antígenos de secreción y excreción de *F. hepatica* por IET, determinan que los isotipos IgM positivos, reaccionan contra

bandas antigénicas mayores a 29 kDa y no presentan reactividad contra componentes antigénicos de peso molecular inferior, consistente con este trabajo.

El reconocimiento de componentes del antígeno de fluido vesicular de la fase larvaria de *Taenia solium*, puede deberse a reactividad del suero de los ovinos experimentales con otros parásitos, como es la fase larvaria de *Taenia hydatigena*. Es importante mencionar que al sacrificio de los ovinos del presente trabajo, no se detectó ningún otro tipo de parásito, pero las reacciones pudieron deberse a que los anticuerpos residuales contra otros parásitos infectantes del borrego pueden persistir hasta por varias semanas (13); por otra parte, se ha demostrado que el suero de bovinos infectados con *F. hepatica*, reaccionan con antígenos de fluido vesicular del quiste de *Taenia hydatigena* (20) y *Ostertagia ostertagi* (21) en IET, y con la fase larvaria de *Taenia saginata* (22) y *Dyctiocaulus viviparus* (1) en ELISA.

Los resultados presentados, sugieren una respuesta inmune humoral importante hacia ciertos antígenos de *F. hepatica*; que esta respuesta es determinada parcialmente por la carga parasitaria y que la administración del ACF si afectó la carga parasitaria, pero no la respuesta humoral, de acuerdo a como se midió en el presente trabajo. Queda así por determinar el efecto del ACF sobre la respuesta celular dirigida hacia las fasciolas.

CHARACTERIZATION OF THE ANTIBODY RESPONSE OF *Fasciola hepatica*-EXPERIMENTALLY INFECTED SHEEP TREATED WITH FREUND'S COMPLETE ADJUVANT TO *F. hepatica* EXCRETORY/SECRETORY ANTIGENS.

SUMMARY.

To assess the effect of Freund's complete adjuvant (FCA) treatment on the antibody response to excretory-secretory (E/S) components of *F. hepatica*-experimentally infected sheep, 30 animals were allotted into 6 groups with 5 each, and infected with 250 *F. hepatica*-metacercariae on day 0. Groups 1 to 5 received FCA intraperitoneally on one occasion at -2, -1, 0, 12 and 3 weeks postinfection respectively. Group 6 served as control and received

only saline solution. Serum samples were collected weekly for 14 weeks initiating 1 week before infection, and tested by passive hemagglutination (PH) and western blot (WB) using *F. hepatica* E/S products as source of antigen. The antibody response, as tested by PH initiated at about 2 weeks post-infection (pi) and reached peak titers from 3 to 5 weeks pi. Titers decreased by 12 weeks not decreasing to initial levels. Eleven bands with molecular weight above 29 kDa were recognized by the animals' IgM. Conversely only 9 bands were recognized by their IgG's, with the strongest reactions at 135, 125, 44, 28, 26.5 and 25 kDa. From week 2 pi both a 25 and a 28 kDa bands were recognized. Likewise, at 6 weeks pi a 44 kDa band was recognized by all infected animals regardless of treatment. This 44 kDa band may be useful as immunodiagnostic agent.

KEYWORDS: *Fasciola hepatica*, Western blot, Passive haemagglutination, Freund's complete adjuvant, Sheep, Antibody, IgM, IgG.

REFERENCIAS

- Lehner R P, Sewell M M. A study of the antigens produced by adult *Fasciola hepatica* maintained *in vitro*. *Parasite Immunol.* 1990; 2: 99.
- Rivera M C A, Santiago N, Hillyer G. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 1988; 74:646.
- Hillyer G V, Soler DeGales M. Identification of a 17 kilodalton *Fasciola hepatica* immunodiagnostic antigen by the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique. *J. Clin. Microb.* 1988; 26:2048.
- Bomford R. Adjuvants for anti-parasite-vaccines. *Parasitol. Today.* 1989; 5:41.
- Bautista G, Flores H, Quiroz R. Non-specific resistance of sheep against *Haemonchus contortus* with Freund's complete adjuvant. *Parasite Immunol.* 1991; 13:565.
- Bautista G, Gomez A, Morilla G, Vera MA, Ibarra V. Inducción de resistencia inespecifica contra la infección por *Fasciola hepatica* en ovinos con adyuvante completo de Freund. *Rev. Mex. Parasitol.* 1992; 3:1.
- García C L. Efecto del Adyuvante Completo de Freund sobre la infección experimental con *Fasciola hepatica* en ovinos. Tesis Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos. 1992; 76.
- Sánchez R, Lynburke R, Oit G, VanNest G. The effect of adjuvants on the efficacy of recombinant herpes simplex virus glycoprotein vaccine. *J. Immunol.* 1988; 141:1720.
- Forey J, Todd A. Experimental infection of Lymnaeid snails in Wisconsin with miracidia of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.* 1978; 64:1132.
- Bautista G C. Prueba de hemaglutinación pasiva o directa. en Morilla A. y Bautista G C. *Manual de Inmunología*. Ed. Diana Técnico. México 1986; 81-88
- Towbin H, Theophil S, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Acad. Natl. Sci. USA.* 1979; 76:4350.
- Laemli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.* (London) 1970; 227:680.
- Ruiz N M. Análisis inmunológico de los antígenos de *Fasciola hepatica*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1987; 190.
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:242
- Steel R, Torrie J. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. McGraw-Hill 1986; 179.
- Nájera R. Respuesta inmune humoral en ovinos infectados con *Fasciola hepatica*. *Tec. Pecu. Mex. Suplemento.* 1983; 10:55.
- Sexton J L, Milner A R, Cambell N J. *Fasciola hepatica*: immunoprecipitation analysis of biosynthetically labelled antigens using sera from infected sheep. *Parasite Immunol.* 1981; 13:105.
- Solano M, Ridley R K, Minocha H C. Production and characterization of monoclonal antibodies against excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1991; 40:227.
- Rickard MD, Howell M J. Comparative aspects of immunity in fasciolosis and cysticercosis in domesticated animals. en: Symons L E A, Donald A D, Dineen J K (eds) *Biology and Control of Parasites*. Sydney. Academic Press. 1982; 343.
- Huyanga E, Summer R. Isolation and purification of a diagnostic antigen for bovine cysticercosis by hydrophobic chromatography. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991; 28:57
- Cross D A, Klesius P H, Williams J C. Preliminary report: immunodiagnosis of pre-type II ostertagiasis. *Vet. Parasitol.* 1988; 27:151.
- Belezzerou S, Napisanova L. Diagnostic efficacy of an enzyme immunoassay in *Cysticercus bovis* infections of cattle under farmig conditions. *Byulleten' Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologii im K.I. Skryabina.* Rusia. 1989; 52:9.