

Evaluación diagnóstica de fracciones cromatográficas de *Fasciola hepatica* mediante Western Blot y ELISA en animales infectados*

F. FREDES, M.V., M.Sc.; T. GORMAN, M.V., M.P.V.M.; M. SILVA, T.M.; H. ALCAINO, M.V., Ph.D.

Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Casilla 2, Correo 15, Santiago, Chile. Fax 56-2 5416840. E-mail: ffredes@abello.dic.uchile.cl

SUMMARY

Diagnostic evaluation of chromatographic fractions of *Fasciola hepatica* by Western Blot and ELISA in infected animals

The antigenic components of excretory-secretory products of adult *F. hepatica*, were separated by gel filtration chromatography (Sephacryl S-300) and then analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by Western Blot (WB). In order to evaluate the sensitivity, specificity and predictive value of the selected fractions an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used with sera from sheep, swine and horses infected with *F. hepatica*, as well as with control sera (uninfected animals).

The chromatographic curve presented up to 5 peaks, representing polypeptides with a molecular weight of 2000, 400, 150, 29 and less than 29 kDa, according to the interpolation with a standard curve of commercial polypeptide molecular weights. The results obtained with SDS-PAGE and WB using sera from the three species, indicated that those fractions of 400, 150, 29 and <29 kDa contained polypeptides, specifically recognized only by infected animals. When these fractions were evaluated with sheep, horse and swine sera by means of ELISA, the most efficient fraction was the 29 kDa, exhibiting an average sensitivity and specificity of 94.5% and 93.5%, respectively in the three species. The SDS-PAGE and WB assay of this fraction showed the presence of two immunoreactive bands, a 29 kDa and another of 14 kDa.

According to these results, it is concluded that the polypeptides contained in the 29 kDa chromatographic fraction would be suitable specific antigens, since they discriminate between infected and non infected *F. hepatica* animals. This fraction was also efficient in diagnosing fasciolosis in the prepatent stage of the infection in sheep. Therefore this fraction should be further studied and purified as it constitutes a prominent immunodiagnostic fraction which may be used for mass screening studies of fasciolosis using an ELISA test.

Palabras claves: fasciolosis, diagnóstico, SDS-PAGE, Western Blot, ELISA.

Key words: fasciolosis, diagnosis, SDS-PAGE, Western Blot, ELISA.

INTRODUCCION

La fasciolosis en Chile ha desplazado a la hidatidosis como la zoonosis de mayor prevalen-

cia en los animales de abasto beneficiados en los mataderos controlados por los servicios de salud. Su agente etiológico, *Fasciola hepatica*, es el único tremátodo de importancia médico-veterinaria y de salud pública en nuestro país.

La infección por el parásito se presenta a lo largo de todo el territorio nacional, con la sola excepción de la XII Región. Las zonas más afectadas son las ubicadas entre la IV y X Regiones (Chile, 1989).

Accepted: 13.08.97.

* Financiado por Depto. de Post-Grado y Post-Título de la Universidad de Chile, Beca Nº 042-94, y FONDECYT Proyecto Nº 194-0245.

La mayor importancia de esta parasitosis radica fundamentalmente en que reduce la productividad de los animales. Así por ejemplo, se ha estimado que un animal puede producir menos carne debido a que consume en promedio un 15% menos de alimento (Ferre y col., 1994).

El examen coprológico se utiliza rutinariamente en los animales como método diagnóstico, sin embargo, no logra detectar el 100% de los casos infectados (Gorman y col., 1991). Además, no es útil para diagnosticar la etapa prepatente de la infección (fase aguda), ya que los parásitos por ser inmaduros no producen huevos (Zimmerman y col., 1982). Otro procedimiento diagnóstico, pero inespecífico, es la medición de enzimas celulares tales como son la transaminasa glutámica oxalacética, la aspartato aminotransferasa y la sorbitol dehidrogenasa, cuyos niveles aumentan en el período prepatente de la infección, pudiendo dar una evidencia circunstancial y no específica sobre la presencia de *F. hepatica* (Sykes y col., 1980; Hawkins, 1984; Ferre y col., 1994). También se ha descrito como procedimiento diagnóstico inespecífico la medición de la respuesta inmune celular expresada por una eosinofilia periférica (Hillyer, 1993). Al respecto se ha descrito que la proteína básica mayor, derivada de eosinófilos, tiene *in vitro* un elevado efecto destructor de fasciolas (Meeusen y col., 1995).

Investigaciones recientes en busca de alternativas diagnósticas más eficientes y de aplicación a gran escala han demostrado que con las técnicas inmunológicas se puede realizar un diagnóstico temprano de la parasitosis. Esto tiene el beneficio de permitir adelantar las medidas de control a fechas oportunas para evitar que los parásitos puedan contaminar los hábitats de los caracoles huéspedes intermediarios con sus huevos.

La prueba de ELISA es la que ha probado ser la más eficiente en el diagnóstico de las infecciones por *F. hepatica*. Sin embargo, si se lograra purificar de los extractos antigénicos aquellas fracciones de mayor sensibilidad y especificidad contra las formas maduras e inmaduras del parásito, esta eficiencia aumentaría aún más (Gorman y col., 1991).

Un método que se ha usado bastante en investigación y para confirmar el resultado de una prueba de ELISA es la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y su posterior Western Blot (WB) (Tsang y col., 1983; Margni y Malchiodi, 1989). Mediante SDS-PAGE y pos-

terior WB se han identificado polipéptidos de bajo peso molecular que son sensibles y específicos para *F. hepatica*.

En el presente trabajo se pretende continuar con la caracterización antigénica de este parásito, semipurificando aquellos polipéptidos que han demostrado ser inmunológicamente relevantes (Gorman y col., 1991), para luego mediante ELISA evaluar el comportamiento de ellos en animales infectados.

MATERIAL Y METODOS

Antígenos (Ag). Se obtuvieron fracciones antigénicas de productos de excreción-secreción (E-S) de fasciolas adultas recuperadas desde el hígado de animales beneficiados en un matadero de la Región Metropolitana. Para ello, las fasciolas vivas recolectadas fueron lavadas en suero fisiológico estéril y luego incubadas durante 16-18 h a 37° C, en solución Hedon-Fleig estéril (Morilla y Bautista, 1986). El sobrenadante fue dializado en agitación contra agua desionizada, durante 24 h a 4° C, luego fue sometido a ultracentrifugación (15.000 x g por 20 minutos) y liofilización hasta un volumen de 1 ml. El sobrenadante fue almacenado en alícuotas, a -70° C, previa determinación de la concentración proteica (Bradford, 1976).

Cromatografía. El extracto E-S fue semipurificado por fraccionamiento cromatográfico de exclusión por tamaño molecular o filtración en geles (Stites y Terr, 1991).

Se cargaron 5 ml del Ag E-S (4 µg/µl de proteína) previamente filtrados a través de membrana de nitrocelulosa (poro 0.45 µm), en una columna de Sephacryl S-300 (Sigma), de 2.5 cm de diámetro y 90 cm de largo, cuya fase líquida fue buffer PBS 0.01 M con azida 0.03% p/v (pH: 7.4). La detección fue a 280 nm en un detector de flujo continuo (Pharmacia). Las fracciones fueron colectadas en un colector automático (Pharmacia) e inmediatamente liofilizadas hasta obtener un volumen final aproximado de 500 µl al cual se le agregaron 500 µl de una mezcla de inhibidores enzimáticos.

Se obtuvo, además, una curva cromatográfica patrón con polipéptidos comerciales cuyos pesos moleculares (PM) oscilaron entre los 2.000.000 a los 29.000 (azul dextrano 2.000 kDa; tiroglobu-

lina bovina 669 kDa; apoferritina esplénica equina 443 kDa; alcohol dehidrogenasa 150 kDa; albúmina sérica bovina 66 kDa y anhidrasa carbónica 29 kDa), en un tiempo de corrida inferior a las 24 h desde que se cargó la muestra. De esta manera se obtuvo una estimación del PM de los polipéptidos constituyentes del preparado antigénico en su forma nativa.

Análisis de fracciones cromatográficas. Se analizó la curva cromatográfica y las fracciones colectadas, correspondientes a los "peaks" con más alta absorbancia, mediante SDS-PAGE y su posterior WB. Se emplearon sueros de animales infectados y no infectados con *F. hepatica*, agrupados en "pools" de 10 muestras cada uno. Los sueros detectores fueron de ovinos sin *F. hepatica*, ovinos infectados naturalmente, ovinos sin *F. hepatica*, pero con quistes hidatídicos o *Thysanosoma actinioides*, equinos sin *F. hepatica*, equinos infectados naturalmente, porcinos sin *F. hepatica*, porcinos infectados naturalmente y porcinos sin *F. hepatica*, pero con *Cysticercus cellulosae*.

La infección natural de los ovinos se realizó trasladando corderos procedentes de la Estación Experimental Hidango del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA del Ministerio de Agricultura) a un predio de la VII Región, donde la fasciolosis es endémica (Alcaño y col., 1992). Luego ellos fueron transportados a dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, para su estudio. Mediante exámenes coprológicos se estableció la patencia de la infección.

SDS-PAGE y WB. La técnica se realizó en mini-gel (8 x 7 x 1.5 mm) a una concentración de 12%, en una cámara vertical (Mini-Protean II, BIO-RAD), en condición denaturante, con peina discontinua y a una diferencia de potencial de 100 V (Tsang y col., 1983). En el carril central se incluyó un peso molecular comercial estándar, con un rango de 14.2 a 66 kDa, mientras que en los otros carriles se colocaron los diferentes eluidos seleccionados. Algunos de los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o plata y otros fueron electrotransferidos.

Los polipéptidos separados por peso molecular fueron transferidos a 100 V por 90 minutos, a 4° C, a membranas de nitrocelulosa. Estas fueron incubadas con los sueros detectores, diluidos 1:100 en PBS-Tween 20, posteriormente se in-

cubaron en una solución conteniendo el conjugado anti-IgG antiespecie específica, marcadas con peroxidasa (Sigma) y PBS-Tween 20 según titulación previa. Luego fueron reveladas con el sustrato (diaminobenzidina, PBS y H₂O₂). Una vez aparecidas las bandas, las membranas se lavaron en agua destilada. El WB permitió la identificación y separación de aquellas fracciones cromatográficas conteniendo los polipéptidos considerados relevantes desde el punto de vista diagnóstico para cada especie animal.

Aplicación de la prueba de ELISA. Se empleó una técnica de ELISA en microplaca, para evaluar la eficiencia diagnóstica de las fracciones así seleccionadas. Para ello se usaron sueros individuales de animales infectados y no infectados con *F. hepatica* distribuidos en sueros de 10 ovinos con fasciolosis en etapa prepatente, 37 ovinos con fasciolosis en etapa crónica, 35 ovinos sin infección, 40 equinos con fasciolosis crónica, 40 equinos sin infección, 40 porcinos con fasciolosis crónica y 40 porcinos sin infección.

Los sueros de ovinos, porcinos y equinos sin infección con *F. hepatica* fueron obtenidos de animales de la XII Región y de mataderos de la Región Metropolitana que al examen *post mortem* no demostraron la infección. Los sueros de ovinos con quistes hidatídicos o infectados con *T. actinioides* pero sin infección con *F. hepatica* también se obtuvieron de animales de la XII Región, mientras que los sueros de los cerdos infectados con *C. cellulosae* se obtuvieron de mataderos de la Región Metropolitana previa inspección *post mortem*, para demostrar la ausencia de fasciolas. Los sueros de ovinos en fase prepatente de la infección se obtuvieron de 10 corderos naturalmente infectados. Los sueros en fase patente o con infección crónica, de las diferentes especies animales, provenían de animales de matadero, en que mediante examen *post mortem* se verificó la presencia de la infección. Se utilizaron como controles negativos un "pool" de sueros de animales de la XII Región y como controles positivos, un "pool" de sueros de las diferentes especies animales con infección crónica.

La prueba de ELISA se realizó en microplacas de fondo plano de 96 pocillos (12 x 8). Previa titulación en duplicado de cada una de las diferentes fracciones antigénicas, de los sueros y del conjugado, se seleccionaron sólo aquellas fracciones que demostraron discriminación entre las

densidades ópticas (PO) de los controles negativos y los controles positivos.

Con cada fracción cromatográfica seleccionada se sensibilizaron dos placas de poliestireno por especie animal. Estas fueron diluidas en una solución tampón (pH: 9.6) para lograr una concentración proteica de 4 µg/ml. Siempre se dejó en la misma ubicación un pocillo vacío como blanco. Luego las placas se lavaron y se bloquearon con leche descremada al 3% en PBS-T20 0.05% v/v, se sellaron y se mantuvieron en congelación (-70° C) hasta su uso.

Todos los sueros en estudio se diluyeron (1/64) en una solución de leche descremada al 3% en PBS-T20 0.05% v/v y se agregaron 100 µl a cada pocillo en duplicado. Las placas se incubaron por una hora a 37° C en cámara húmeda. Luego se lavaron, se incubaron con 100 µl de una anti-IgG peroxidasa especie específica, diluida al 1/4000 en PBS-T20 0.05% v/v, por una hora a 37° C en cámara húmeda. Luego se lavaron y en cada pocillo se agregaron 100 µl del sustrato ortofenilendiamina, buffer citrato, H₂O₂ y se incubaron por 10 a 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción enzimática se detuvo adicionando a cada pocillo 25 µl de H₂SO₄ 0.25 M. La lectura de cada placa se realizó a 492 nm con un lector automático de ELISA (BDSL Imunoskan Plus).

El criterio que se empleó para interpretar el resultado de las lecturas fue uno de los indicados por Voller y col. (1979), en que se considera positivo a aquel suero que ofrece una densidad óptica (DO) superior o igual a dos veces la lectura promedio de los sueros controles negativos. Cada

placa incluyó 3 controles negativos en duplicado. Este criterio entregó un valor "cut off" para cada placa. Se analizaron y compararon los resultados obtenidos por ELISA y el examen *post mortem* mediante la prueba de Mc Nemar para proporciones correlacionadas o dependientes (Remington y Schork, 1970).

El análisis de los resultados permitió establecer la sensibilidad y especificidad de las fracciones seleccionadas, así como los correspondientes valores predictivos positivo y negativo, para una proyección práctica en un diagnóstico inmunológico de rutina (ELISA) de las infecciones naturales con *F. hepatica*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al analizar los resultados de este estudio, examinado a la selección y caracterización de antígenos de relevancia diagnóstica, se corroboró la alta complejidad proteica y antigénica de *F. hepatica* (Gorman y col., 1992). Sin embargo, esta complejidad influye en forma negativa en el rendimiento de las pruebas inmunodiagnósticas, por las reacciones cruzadas o inespecíficas generadas por los determinantes antigénicos compartidos con otras parasitosis (Gorman y col., 1994, 1995). Es por ello que la separación y purificación de estos antígenos parasitarios surge como necesaria para aumentar los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas.

El método cromatográfico de exclusión por tamaño molecular y el tipo de relleno utilizado (Sephacryl S-300, con rango de fraccionamiento

Cuadro 1

Bandas de reconocimiento antigénico específico reconocidas por sueros de animales infectados mediante western blot empleando fracciones cromatográficas de productos de E-S de *Fasciola hepatica*.

Specific bands recognized by infected animal sera tested by western blot with *Fasciola hepatica* chromatographic fractions of excretory-secretory products.

Fracción cromatográfica	Bandas específicas (kDa)		
	Ovinos	Equinos	Porcinos
2.000	-	-	-
400	29	-	-
150	29	-	29
29	29 y 14	29 y 14	29 y 14
<29	29	29 y 14	29 y 14

para proteínas globulares de 10.000 a 1.500.000), permitió diferenciar hasta 5 "peaks" medianamente resueltos, aunque el último de ellos correspondió a péptidos muy pequeños (fig. 1).

La interpolación con la curva cromatográfica estándar permitió calcular aproximadamente los pesos moleculares de aquellos polipéptidos obtenidos en los diferentes eluidos cromatográficos, correspondiendo a 2.000-400-150-29 y menores de 29 kDa, en su forma nativa (fig. 1). Este rango de valores concuerda con los obtenidos por Zimmerman y Clark (1986), quienes también purificaron y fraccionaron antígenos de parásitos empleando un preparado antigénico E-S de *F. hepatica* y diferentes métodos cromatográficos. Ellos usaron una columna Sephacryl S-200 obteniendo hasta 4 "peaks" y con una columna de Superosa-6 (FPLC) obtuvieron 9 "peaks". Sin embargo, por el primer método, ellos determinaron pesos moleculares aproximados de 376.000, 202.000, 70.000 y 40.000 respectivamente, valores que en sí difieren con los del presente estudio, probablemente debido a diferentes marcadores comerciales utilizados, así como al tipo de columna empleada (Sephacryl S-200), la cual resuelve proteínas globulares de 5.000 a 250.000. El quinto "peak" que describimos, por su pequeño tamaño, puede corresponder sólo a péptidos de degradación del material antigénico original. Esto se confirma al observar en la figura 2 el co-

respondiente análisis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de cada eluido, al encontrar sólo bandas que fueron arrastradas de la fracción anterior, fenómeno que ocurre cuando los "peaks" son medianamente resueltos.

Estos mismos autores al emplear Dot-ELISA (una variación de ELISA que utiliza como soporte membranas de nitrocelulosa) encontraron fracciones reaccionantes sólo en los eluidos cromatográficos del tercer y cuarto "peak", vale decir, en los 70 kDa y 40 kDa. Así también Rivera y col. (1988) obtuvieron mediante HPLC una fracción muy abundante de 150-160 kDa y otra de 25-30 kDa, que adaptadas a un Dot-ELISA resultaron ser detectadas por los sueros de conejos con fasciolosis aguda y crónica. Estos resultados son similares a los que describimos en este estudio, analizando los eluidos del tercer y cuarto "peak", mediante WB y con los del cuarto "peak" evaluado mediante ELISA en microplaca con sueros de animales detectores.

La evaluación de las diferentes fracciones cromatográficas mediante SDS-PAGE confirmó la presencia de varias bandas, la mayoría entre los 66 y 14 kDa (fig. 2), rango descrito por una serie de investigadores (Zimmerman y Clark, 1986; Santiago y Hillyer, 1988; Hillyer y col., 1988; Sexton y col., 1990; Hillyer, 1993; Ruiz-Navarrete y col., 1993; Gorman y col., 1994, 1995).

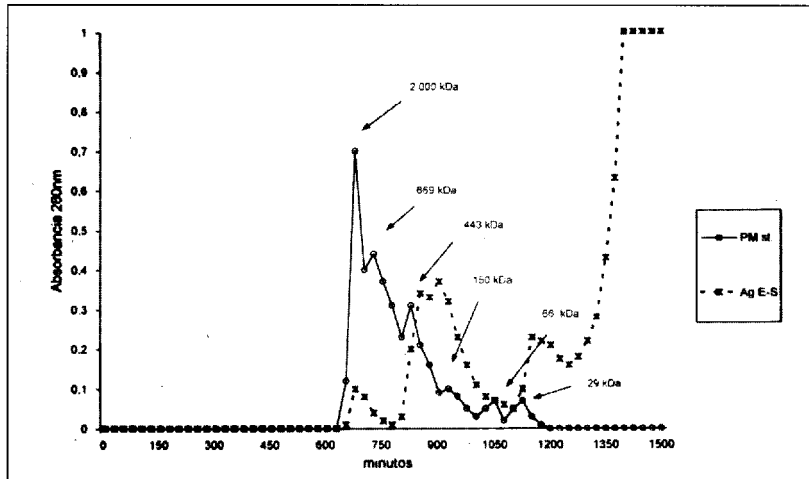


Figura 1. Separación de los polipéptidos comerciales (Pm st) y de antígenos E-S de *F. hepatica* (Ag E-S) mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular. Sephacryl S-300 separation of *F. hepatica* E-S antigens (Ag E-S) and molecular weight standards.

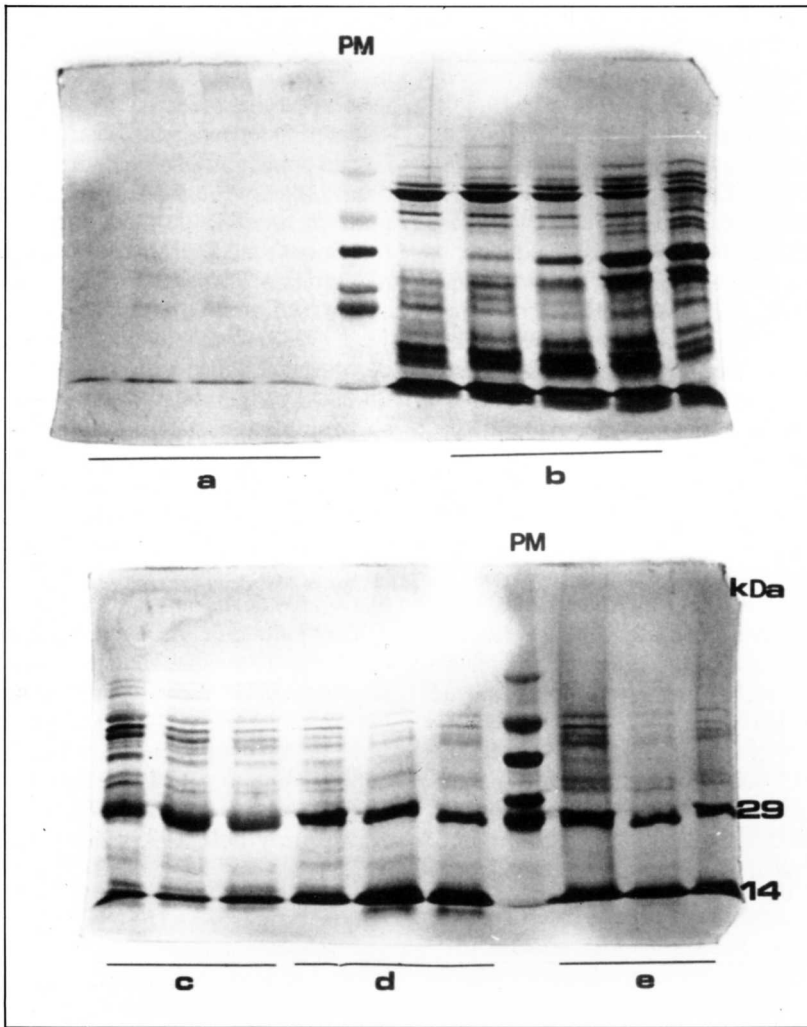


Figura 2. SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de antígenos E-S de *F. hepatica*, teñidas con plata (a: 2000, b: 400, c: 150, d: 29, e: <29; PM: peso molecular estándar).

SDS-PAGE of chromatographic *F. hepatica* E-S fractions stained with silver (a: 2000, b: 400, c: 150, d: 29, e: <29; PM: weight markers).

Así también, al utilizar los sueros detectores de animales infectados y no infectados con *F. hepatica*, junto con los sueros de animales con otras parasitosis (hidatidosis o *Thysanosoma actiniooides* en ovinos y *Cysticercus cellulosae* en porcinos), se constató la presencia de aquellos polipéptidos de 14 y 29 kDa descritos como específicos y sensibles, al ser reconocidos sólo por aquellos sueros de los animales con fasciolosis (fig. 3). Cada fracción cromatográfica, excepto la 2.000

kDa, presentó una o más de estas bandas. En las fracciones cromatográficas de 400 y 150 kDa se reconoció sólo la banda de 29 kDa, hecho evidenciable en la especie ovina y porcina; mientras que en las fracciones cromatográficas de 29 y <29 kDa se identificaron las bandas de 29 y 14 kDa en las tres especies en estudio (cuadro 2).

La repetición de bandas en las fracciones 29 y <29 kDa puede deberse a dos razones: es posible que cuando las diferentes proteínas nativas cons-

Cuadro 2

Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de cada fracción cromatográfica, mediante ELISA en el diagnóstico de la fasciolosis ovina en fase prepatente.

Sensitivity, specificity and predictive value of each chromatographic fraction in the diagnosis of prepatent fasciolosis by ELISA in sheep.

Fracción	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo	
			(+)%	(-)%
< 29 kDa	60	95	75	90
29 kDa	90	90	69	97
150 kDa	90	75	47	97
400 kDa	50	90	56	88

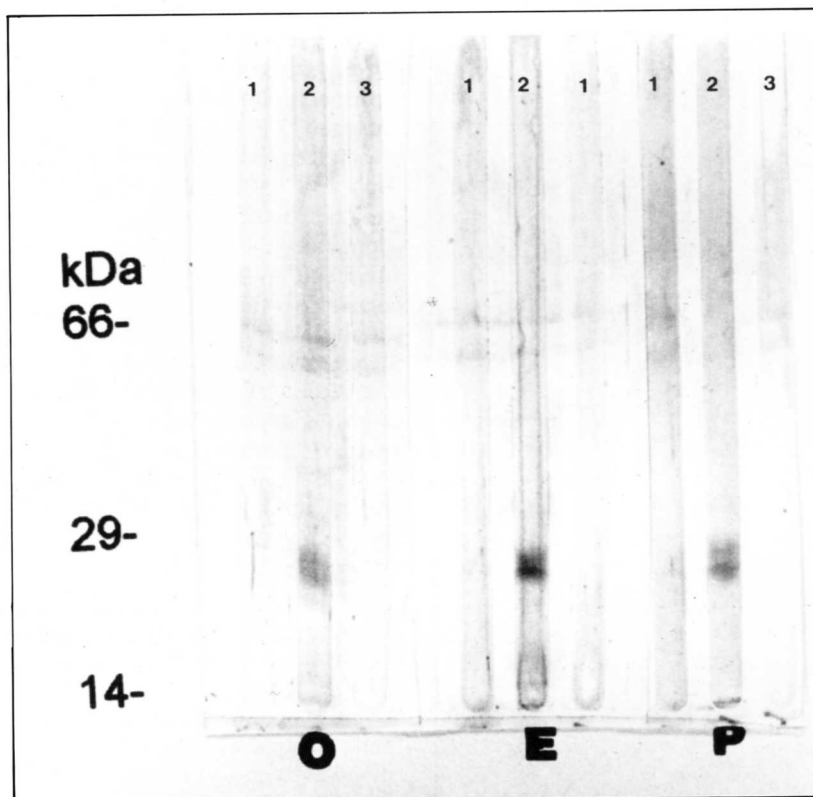


Figura 3. WB de la fracción cromatográfica de 29 kDa, de antígenos E-S de *F. hepatica*, en ovinos (O), equinos (E) y porcinos (P).

Carril 1: pool animales sin fasciolosis; carril 2: pool animales con fasciolosis; carril 3: pool animales con otras parasitosis (hidatidosis o *Thysanosoma actinioides* en ovinos y *Cysticercus cellulosae* en porcinos).

WB of the 29 kDa chromatographic fraction of *F. hepatica* E-S antigens using sheep (O), horse (E) and pig (P) sera.

Lane 1: pool sera from non infected animals; lane 2: pool sera from fasciolosis infected animals; lane 3: pool sera from animals with other parasitic infections (hidatidosis or *Thysanosoma actinioides* in sheep and *Cysticercus cellulosae* in swine).

titutivas de las fracciones se someten a condiciones denaturantes, ellas originen moléculas de igual peso, que se sobreponen en una misma banda. O bien que al estar cada "peak" medianamente resuelto por un efecto de traslape de curvas y arrastre aparezcan las mismas proteínas en alguna fracción pero en menor concentración. Por lo anterior, conviene destacar que resultaron más concentradas las bandas de 29 y 14 kDa en la fracción cromatográfica llamada 29 (fig 4).

Las bandas reconocidas por los "pools" de sueros de las diferentes especies animales estudia-

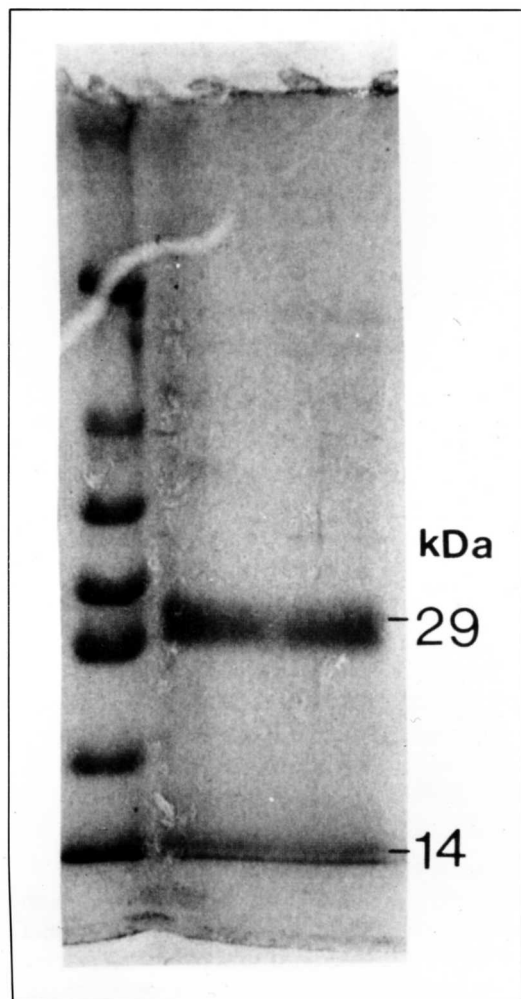


Figura 4. SDS-PAGE de la fracción cromatográfica denominada 29, de antígenos E-S de *F. hepatica*, teñida con azul de Coomassie.

SDS-PAGE of the 29 kDa chromatographic fraction of *F. hepatica* E-S antigens stained with Coomassie blue.

das y analizadas por WB se distribuyeron en los rangos de pesos moleculares de polipéptidos ya identificados por otros autores (fig. 3).

Nuestra fracción cromatográfica de 29 kDa, por su peso y origen, podría ser o estar muy relacionada con polipéptidos que se han logrado purificar, caracterizar e incluso clonar y secuenciar el DNA de algunos de ellos. Tal es el caso de una cisteína proteinasa (CP) de 27 kDa que fue purificada de un homogeneizado de fasciolas adultas y que ha sido clonada, secuenciada, evaluada y reconocida mediante ELISA usando sueros de humanos con fasciolosis (Yamasaki y Aoki, 1993; Heussler y Dobbelaere, 1994). Otro polipéptido descrito con reacción protectora cruzada entre los géneros parasitarios *Fasciola* y *Schistosoma*, que determina una respuesta inmune variada según la especie animal afectada, es la glutatión S-transferasa (GST) de 28 kDa, también proveniente de fasciolas adultas (Sexton y col., 1990; Hillyer y col., 1992a; Panaccio y col., 1992). Otro polipéptido que podría relacionarse con el de 14 kDa reconocido, en este estudio, en forma específica mediante WB con los sueros de animales con fasciolosis fue aislado por Hillyer y col. (1988), también de parásitos adultos, demostrando reacción cruzada, diagnóstica y protectora frente a otro tremátodo no existente en Chile, *Schistosoma mansoni*. Este ha sido caracterizado como una proteína unida a ácido graso ("fatty acid binding protein") de 12 kDa (Fh 12) de la cual incluso se ha llegado a producir la proteína recombinante designada rFh 15, por ser de 15 kDa (Hillyer, 1995).

Los estudios de Espino y col. (1987) y los de Santiago y Hillyer (1988) ya habían demostrado la eficacia inmunodiagnóstica de la prueba de ELISA en la fasciolosis humana y animal, utilizando los productos de excreción-secreción de *F. hepatica* adulta como antígeno. Así también, evaluando diversos métodos diagnósticos para la fasciolosis animal, entre ellos ELISA, empleando un macerado total del parásito adulto, hemos logrado además detectar respuesta inmune en corderos infectados muy precozmente, al mes y medio p.i. Sin embargo la sensibilidad por especie fue inferior a 65%. En cambio, la sensibilidad promedio de 94.5%, que ahora describimos al emplear ELISA con las fracciones mencionadas, sería muy similar a los encontrados por Hillyer y col. (1992b), quienes llegaron a un nivel óptimo de sensibilidad de un 95%, usando FAST-ELISA

en humanos. No obstante, cabe hacer notar que en la especie humana la respuesta no es tan compleja, pues por lo general no se encuentran poliparasitados como los animales, por lo que nuestros resultados en ellos cobran mayor importancia aún, ya que siendo portadores de otras parasitosis y sin fasciolosis no presentaron respuesta inmune cruzada.

En el presente estudio se estableció que en las tres especies animales la fracción cromatográfica de 29 kDa correspondería, según los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos, la de mayor interés según lo detallan los cuadros 3, 4, 5 y 6. Con ella fue incluso posible identificar a más del 90% de los ovinos infectados, sin importar en qué etapa de la infección se encon-

Cuadro 3

Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de cada fracción cromatográfica, mediante ELISA en el diagnóstico de la fasciolosis ovina en fase patente.

Sensitivity, specificity and predictive value of each chromatographic fraction in the diagnosis of patent fasciolosis by ELISA in sheep.

Fracción	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo	
			(+)%	(-)%
< 29 kDa	80	95	94	83
29 kDa	95	90	90	95
150 kDa	85	75	77	83
400 kDa	18	90	64	52

Cuadro 4

Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de cada fracción cromatográfica, mediante ELISA en el diagnóstico de la fasciolosis porcina.

Sensitivity, specificity and predictive value of each chromatographic fraction in the diagnosis of pig fasciolosis by ELISA.

Fracción	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo	
			(+)%	(-)%
< 29 kDa	68	97	96	69
29 kDa	93	97	97	91
150 kDa	98	100	100	97
400 kDa	0	100	0	43

Cuadro 5

Sensibilidad, especificidad y valor predictivo de cada fracción cromatográfica, mediante ELISA en el diagnóstico de la fasciolosis equina.

Sensitivity, specificity and predictive value of each chromatographic fraction in the diagnosis of horse fasciolosis by ELISA.

Fracción	Sensibilidad %	Especificidad %	Valor predictivo	
			(+)%	(-)%
<29 kDa	33	100	100	58
29 kDa	100	97	98	100
150 kDa	33	100	100	58
400 kDa	8	100	100	51

traran (prepatente o patente). Aún más, cabe destacar que la fracción cromatográfica de 150 kDa tampoco presentó diferencias diagnósticas significativas, en las especies ovina y porcina, entre el examen *post mortem* y ELISA ($p < 0.05$).

Lo anterior demostraría que la fracción inmunogénica de 29 kDa sería conservada en el transcurso de la infección. La mayor eficiencia de esta fracción corrobora que la pureza de los determinantes antigénicos en el rendimiento de esta prueba es esencial. No así cuando se emplea un extracto crudo del parásito, el cual presentaría una infinidad de epitopos, algunos probablemente compartidos con otros vermes y otros que pueden ofrecer reacciones inespecíficas.

Por otra parte, dado que los valores predictivos positivos y negativos logrados en este estudio fueron muy adecuados, se demuestra que la fracción cromatográfica de 150 kDa (en porcinos) y sobre todo la de 29 kDa en las tres especies animales, son relevantes en el inmunodiagnóstico de esta parasitosis. Esta conclusión se ve aún más reforzada al no observar con estas fracciones diferencias diagnósticas significativas ($p < 0.05$) entre el examen *post mortem* y ELISA.

Por los resultados promisorios obtenidos, resulta interesante continuar con esta línea de investigación para contribuir al desarrollo tecnológico y el control de importantes enfermedades parasitarias presentes en el país.

RESUMEN

La fasciolosis causada por *Fasciola hepatica* se diagnostica rutinariamente mediante el examen coprológico. Debido a que este examen no es 100% sensible y además es ineficaz en la etapa prepatente, se realizó este trabajo con el objeto de caracterizar y seleccionar fracciones antigénicas de valor diagnóstico de extractos de excreción-secreción del parásito.

Se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño molecular (Sephacryl S-300), electroforesis en geles de poliacrilamida en ambiente reductor (SDS-PAGE) y posterior western blot (WB), además de un método de "enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA) en microplaca. Para evaluar el valor diagnóstico de los antígenos se usaron sueros de las especies ovina, porcina y equina en tres estados (sanos, con otras parasitosis y naturalmente infectados con *F. hepatica*).

Mediante el método cromatográfico se obtuvieron hasta 5 "peaks", que interpolados en una curva patrón representaron polipéptidos de pesos aproximados de 2.000, 400, 150, 29 y menores a 29 kDa. De éstos, los inmunorreactivos específicos para la enfermedad en las tres especies animales, bajo los criterios de SDS-PAGE y posterior WB, fueron los de 400, 150, 29 y <29.

La evaluación mediante ELISA en microplaca, de estas fracciones con los sueros de las tres especies animales infectadas, indicó que la fracción de 29 kDa ofreció valores de sensibilidad y especificidad de 94.5% y 93.5%, respectivamente. Similares valores de sensibilidad y especificidad se determinaron al enfrentar esta fracción antigénica con sueros de ovinos en la etapa prepatente de la infección. Esta misma fracción analizada por el criterio de SDS-PAGE y luego por WB dio dos bandas de reconocimiento específico, una de 29 kDa y otra de 14 kDa aproximados. Con estos resultados concluimos que la fracción cromatográfica de 29 kDa sería capaz de discriminar en las especies ovina, porcina y equina, entre aquellos animales sanos, con otras parasitosis y con fasciolosis. Además fue también eficiente para diagnosticar la infección en etapa prepatente en ovinos. Por ello se constituye en una fracción promisoriosa para ser purificada y empleada en estudios epidemiológicos mediante ELISA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar sus agradecimientos a: los Dres. Patricia Avalos, José Naranjo y Rigofredo Veneros, Médicos Veterinarios del Servicio Agrícola y Ganadero, por facilitar los sueros de animales de la XII Región.

Al Departamento de Post-grado y Post-título de la Universidad de Chile, Beca N° 042-94.

A FONDECYT Proyecto N° 194-0245.

BIBLIOGRAFIA

- ALCAINO, H., W. APT, F. VEGA, T. GORMAN, P. APT. 1992. Fasciolosis animal en la VII Región de Chile: áreas de distribución e infección en caballos y conejos silvestres, *Parasitol. al Día* 16(1-2): 11-16.
- BRADFORD, O. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

- protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- CHILE. 1989. Información estadística de las principales enfermedades detectadas en los animales beneficiados en los mataderos del país en 1988. Ministerio de Salud, Depto. Programas sobre el Ambiente, Ord. N° 5877.
- ESPINO, A.M., B. DUMENIGO, R. FERNANDEZ, C. FINLAY. 1987. Immunodiagnosis of human fasciolosis by enzyme-linked immunosorbent assay using excretory-secretory products, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37(3): 605-608.
- FERRE, Y., J.P. BARRIO, J. GONZALEZ-GALLEGO, F.A. ROJO-VAZQUEZ. 1994. Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica*, *Vet. Parasitol.* 55: 71-79.
- GORMAN, T., P. MORENO, M. LORCA, L. IBARRA, H. ALCAINO. 1991. Inmunodiagnóstico de la fasciolosis animal mediante una prueba inmunoenzimática (ELISA), *Parasitol. al Día* 15: 87-93.
- GORMAN, T., V. CONCHA, H. ALCAINO, F. FREDES, H. GONZALEZ, A. FERREIRA. 1992. Caracterización de antígenos de *Fasciola hepatica* mediante inmunoprecipitación en agarosa, *Parasitol. al Día* 16: 81-86.
- GORMAN, T., V. CONCHA, F. FREDES, A. FERREIRA, A. VALDES, H. ALCAINO. 1994. Detección de antígenos de interés diagnóstico en infecciones animales por *Fasciola hepatica*, *Parasitol. al Día*. 18(1-2): 26-32.
- GORMAN, T., A. VALDES, F. FREDES, A. FERREIRA, H. ALCAINO. 1995. Reconocimiento antigénico de ovinos naturalmente infectados con *Fasciola hepatica*, monitoreado a través de inmunoelectrotransferencia enzimática (Western Blotting), *Arch. Med. Vet.* 27(2): 33-40.
- HAWKINS, C. 1984. The use of haemoglobin, packed-cell volume and serum sorbitol dehydrogenase as indicators of the development of fascioliasis in sheep, *Vet. Parasitol.* 15: 125-133.
- HEUSSLER, V., A.E. DOBBELAERE. 1994. Cloning of a protease gene family of *Fasciola hepatica* by the polymerase chain reaction, *Mol. Biochem. Parasitol.* 64: 11-23.
- HILLYER, G. 1993. Serological diagnosis of *Fasciola hepatica*, *Parasitol. al Día* 17(3-4): 130-136.
- HILLYER, G. 1995. Comparison of purified 12 kDa and recombinant 15 kDa *Fasciola hepatica* antigens related to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein, *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 90(2): 249-253.
- HILLYER, G., M. SOLER DE GALANES, M. GARCIA, F. MONTEALEGRE. 1988. Acquired immunity in schistosomiasis with purified *Fasciola hepatica* cross-reactive antigens, *Vet. Parasitol.* 29: 265-280.
- HILLYER, G., M. SOLER DE GALANES, G. BATTISTI. 1992a. *Fasciola hepatica*: Host responders and non responders to parasite Glutathione S-Transferase, *Exp. Parasitol.* 75: 176-186.
- HILLYER, G., M. SOLER DE GALANES, J. RODRIGUEZ-PEREZ, J. BJORLAND, M.S. SILVA DELAGRAVA, S. RAMIREZ, R.T. BRYAN. 1992b. Use of the Falcon assay screening test-enzyme-linked immunosorbent assay (FAST-ELISA) and the enzymelinked immunotransfer blot (EITB) to determine the prevalence of human fasciolosis in the bolivian altiplano, *J. Trop. Med. Hyg.* 46(5): 603-609.
- MARGHI, R., E. MALCHIODI. 1989. Electroforesis en gel de poliacrilamida, isoelectroenfocado, inmunoelectrotransferencia ("immunoblotting"). En: MARGNI, R. Inmunología e inmunquímica. Ed. Med. Panamericana, Bs. As., 644-657.
- MEEUSEN, E., C.S. LEE, M.D. RICKARD, M.R. BRANDON. 1995. Cellular responses during liver fluke infection in sheep and its evasion by the parasite, *Paras. Immunol.* 17: 37-45.
- MORILLA, A., C. BAUTISTA. 1986. Manual de inmunología. Edit. Diana, México, 397 pp.
- PANNACCIO, M., L. WILSON, S. CRAMERI, G. WIJFFELS, T. SPITHILL. 1992. Molecular characterization of cDNA sequences encoding Glutathione S-Transferases of *Fasciola hepatica*, *Exp. Parasitol.* 74: 232-237.
- REMINGTON, R.D., M.A. SCHORK. 1970. Chi-square Test for frequency data. In: Statistics with applications to the biological and healthy sciences. Englewood Cliffs, N. J. Prentice-Hall, 240-244.
- RIVERA, C., N. SANTIAGO, G. HILLYER. 1988. Evaluation of immunodiagnostic antigens in the excretory-secretory products of *Fasciola hepatica*, *J. Parasitol.* 74(4): 646-652.
- RUIZ-NAVARRETE, M.A., C. ARRIAG, C.R. BAUTISTA, A. MORILLA. 1993. *Fasciola hepatica*: Characterization of somatic and excretory-secretory antigens of adult flukes recognized by infected sheep, *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* 35:301-307.
- SANTIAGO, N., G. HILLYER. 1988. Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with *F. hepatica*, *J. Parasitol.* 74(5): 810-818.
- SEXTON, J.L., A. MILNER, M. PANACCIO, J. WADDINGTON, G. WIJFFELS, D. CHANDLER, C. THOMPSON, L. WILSON, T. SPITHILL, G. MITCHELL, N. CAMPBELL. 1990. Glutathione S-transferase novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep, *J. Immunol.* 145(11): 3905-3911.
- STITES, D., A.I. TERR. 1991. Basic and clinical immunology. Ed. Lange Medical Publications. Seventh D. East Norwalk, Connecticut, pp. 228-251.
- SYKES, A.R., R.L. COOP, M.G. ROBINSON. 1980.

- Chronic subclinical ovine fascioliasis; plasma glutamate dehydrogenase, gamma-glutamyl transpeptidase and aspartate aminotransferase activities and their significance as diagnostic aids, *Res. Vet. Sci.* 28: 71-75.
- TSANG, V. K., J.M. PERALTA, A.R. SIMONS. 1983. Enzyme-linked immunotransfer blot technique (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis, *Methods in Enzymology* 92: 377-391.
- VOLLER, A., D.E. BIDWELL, A. BARTLETT. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Alexandria-Virginia. Dynatech Laboratories, Inc.: 23-33.
- YAMASAKI, H., T. AOKI. 1993. Cloning and sequence analysis of the major Cysteine protease expressed in the trematode parasite *Fasciola* sp., *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31(3): 537-542.
- ZIMMERMAN, G.L., C.R.B. CLARK. 1986. Separation of parasite antigens by molecular exclusion, anion exchange, and chromatofocusing utilizing FPLC protein fractionation systems, *Vet. Parasitol.* 20: 217-228.
- ZIMMERMAN, G.L., L.W. JEN, J.E. CERRO, K.L. FARNSWORTH, R.B. WESCOTT. 1982. Diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in sheep by an enzyme-linked immunosorbent assay, *Am. J. Vet. Res.* 43(12): 2097-2100.